



No. 13-272849- -00000-0000

Fecha: 2013-11-20 14:48:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105



INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: ALFA GLUCOSIDASA ACIDA MODIFICADA CON
PROCESAMIENTO ACELERADO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 9/24, A61K 38/47

71. SOLICITANTE: GENZYME CORPORATION

DOMICILIO: 500 Kendall Kendall Street, Cambridge,
Massachusetts 02142, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

20 NOV. 2013

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-272849- -00000-0000 Fecha: 2013-11-20 14:48:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 105
---	--

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de Invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/034479	Fecha 20/04/2012
Publicación Internacional No.		WO2012/145644 A1	Fecha 26/10/2012
3	(54) TITULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ALFA GLUCOSIDASA ACIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO			
4	CLASIFICACION INTERNACIONAL (51) CIP		
C12N 9/24, A61K 38/47			
5	(71) SOLICITANTE(S) ☐ Esta persona también es inventor ☐ Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS O RAZON SOCIAL GENZYME CORPORATION		NOMBRE	IDENTIFICACION TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCION CIUDAD DEPARTAMENTO/ESTADO PAIS DE RESIDENCIA		500 Kendall Kendall Street Cambridge MA 02142	No. TELEFONO E-MAIL NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCION
7	(72) INVENTOR(ES) ☐ Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS 1. CANFIELD 2. MORELAND 3. KUDO 4. 5.		NOMBRES William, M. Rodney, J. Mariko	NACIONALIDAD Estadounidense Estadounidense Japonesa
DIRECCION DE CORREO ELECTRONICO:			
8	DATOS INVENTOR(ES)		
PAIS RESIDENCIA 1. ESTADOS UNIDOS 2. ESTADOS UNIDOS 3. ESTADOS UNIDOS 4. 5.		DEPARTAMENTO/ESTADO OK 73116 MA 01772 OK 73112	CIUDAD Oklahoma City Southborough Oklahoma City
		DIRECCION 7108 Brentwood Road 2 David Henry Gardner Lane 2220 Nw 56th Terrace	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en una hoja a continuación			
9	(74) ☐ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS CASTELLANOS ABONDANO		NOMBRES MARGARITA	IDENTIFICACION C.C. 39.779.654 T.P. 70.819
DIRECCION Calle 94A No. 7A-09		No. TELEFONO 7560770 E-MAIL castellanos@castellanosyco.co	
CIUDAD BOGOTA		No. DE PROTOCOLO	
PAIS COLOMBIA		EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
1.	(33) PAIS DE ORIGEN ESTADOS UNIDOS	CODIGO PAIS US	(31) NUMERO 61/478,336
2.			(32) FECHA (AAA/MM/DD) 2011/04/22
3.			
11	DECLARACION SOBRE USO DE RECURSOS GENETICOS O BIOLOGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCION DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	
Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		Copia de registro vigente en Cámara de Comercio. Hoja de información complementaria. Otros, especificar.	
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deber ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.			
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRONICO	N° 13-0079572	Fecha: Agosto 9 de 2013
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)			
 MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO - APODERADO 20 NOV. 2013			
16	ORDEN Y RELACION DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD		
Documentación Técnica		Documentación Jurídica	
Solicitud Internacional en Castellano			
1.	☒ Descripción N° de folios: 27	9.	☒ Poderes, si fuera el caso.
2.	☒ Reivindicaciones N° de reivindicaciones: 30	10.	☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
3.	☒ Dibujos y/o figuras N° de folios: 7	11.	☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
4.	☒ Resumen	12.	☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
5.	☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.	13.	☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
6.	☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.	14.	☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
7.	☒ Arte final 12 x 12	15.	☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
8.	☒ Anexo formato digital.	16.	☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
CD QUE CONTIENE LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL Y LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES		17.	☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0079572

Bogotá D.C., Agosto 09 de 2013 - 15:50:31

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	504475716	09/08/2013	1.500.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-272849- -00000-0000

Fecha: 2013-11-20 14:48:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 9 de 2013 - 15:50:31

COLOMBIA

PODER

El (los)

Domiciliados en

Nombran por el presente a XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A. abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas de certificación o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- ~~b) Para la obtención de protección de variedades vegetales~~
- ~~c) Para la obtención de registros sanitarios;~~
- d) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- e) Para obtener registros y transferencias de nombres de dominio
- f) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned GENZYME CORPORATION

Of 500 Kendall Kendall Street
Cambridge, Massachusetts 02142
United States

hereby grant(s) Power of Attorney to XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective, certification and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- ~~b) For the obtainment of plant variety protection~~
- ~~c) For the obtainment of Sanitary registrations;~~
- d) For the obtainment of copyright registrations
- e) For domain name registrations and assignment
- f) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 13th day of May 2013

in Antony

by Catherine GILLES-FORT
Proxy Holder

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APRIL 17, 2012

PTAS

JEFFREY M. JACOBSTEIN/FINNEGAN
55 CAMBRIDGE PARKWAY
SUITE 700
CAMBRIDGE, MA 02142

501889182

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 04/16/2012

REEL/FRAME: 028050/0979
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
CANFIELD, WILLIAM M.

DOC DATE: 04/11/2012

ASSIGNOR:
MORELAND, RODNEY J.

DOC DATE: 04/04/2012

ASSIGNOR:
KUDO, MARIKO

DOC DATE: 04/12/2012

ASSIGNEE:
GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142

APPLICATION NUMBER: 61478336

FILING DATE: 04/22/2011

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

WHEREAS We, the below named inventors (hereinafter referred to as Assignors) have made an invention entitled:

MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING

for which We filed an application for United States Letters Patent on April 22, 2011 (Application No. 61/478,336); and

WHEREAS, GENZYME CORPORATION, a corporation of the Commonwealth of Massachusetts whose post office address is 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of securing the entire right, title, and interest in and to this invention in all countries throughout the world, and in and to the application for United States Letters Patent on this invention and the Letters Patent to be issued upon this application;

NOW THEREFORE, be it known that, for good and valuable consideration the receipt of which from Assignee is hereby acknowledged, We, as Assignors, have sold, assigned, transferred, and set over, and do hereby sell, assign, transfer, and set over unto the Assignee, its lawful successors and assigns, our entire right, title, and interest in and to this invention, provisional Application No. 61/478,336, filed April 22, 2011, and this application, and all divisions, and continuations thereof, and all Letters Patent of the United States which may be granted thereon, and all reissues thereof, and all rights to claim priority in any foreign country on the basis of the above provisional application (if any), as well as all rights to claim priority on the basis of this application in any foreign country, and all applications for Letters Patent which may hereafter be filed for this invention in any foreign country and all Letters Patent which may be granted on this invention in any foreign country, and all extensions, renewals, and reissues thereof; and We hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States and any official of any foreign country whose duty it is to issue patents on applications as described above, to issue all Letters Patent for this invention to Assignee, its successors and assigns, in accordance with the terms of this Assignment;

AND, WE HEREBY covenant that We have the full right to convey the interest assigned by this Assignment, and We have not executed and will not execute any agreement in conflict with this Assignment;

AND, WE HEREBY further covenant and agree that We will, without further consideration, communicate with Assignee, its successors and assigns, any facts known to us respecting this invention, and testify in any legal proceeding, sign all lawful papers when called upon to do so, execute and deliver any and all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to this invention in said Assignee, its successors or assigns, execute all divisional, continuation, and reissue applications, make all rightful oaths and generally do everything possible to aid Assignee, its successors and assigns, to obtain and enforce proper patent protection for this invention in the United States and any foreign country, it being understood that any expense incident to the execution of such papers shall be borne by the Assignee, its successors and assigns.

SOLE/JOINT INVENTION
(Worldwide Rights)
Attorney Docket No. 07680.6075-00000

IN TESTIMONY WHEREOF, We have hereunto set our hands.

County of Oklahoma)
)

Name: William M. Canfield

33.

Address: 7108 Brentwood Road

State of Oklahoma

Oklahoma City, OK

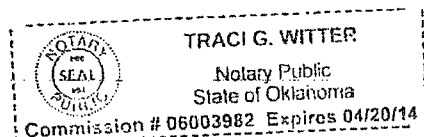
73112

Bv:

Date:

Subscribed and sworn to before me this 11 day of April, 2012

Jacki L. Witten, Notary Public



County of _____)
_____)

Name: Rodney J. Moreland

SS.

Address:

State of

By:

Date:

Subscribed and sworn to before me this _____ day of _____, 2012

, Notary Public

County of _____)
_____)

Name: Mariko Kudo

SS.

Address:

State of

Oklahoma City, OK

By:

Date:

Subscribed and sworn to before me this _____ day of _____, 2012

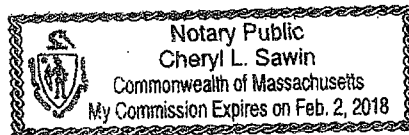
Notary Public

County of _____)
 _____)
 ss. Name: William M. Canfield
 Address: _____

 State of _____)
 _____)
 By: _____
 Date: _____

County of Middlesex)
)
 ss. Name: Rodney J. Moreland
 Address: 2 David Henry Gardner Lane
 Southborough, MA 01772
 Southborough, MA
 State of Massachusetts)
) By: Rodney J. Moreland
 Date: 4-4-12

Cheryl L. Sawin



County of _____)
)

State of _____)
)

ss. Name: Mariko Kudo
 Address: _____

 Oklahoma City, OK
By: _____
Date: _____

Subscribed and sworn to before me this _____ day of _____, 2012
_____, Notary Public

IN TESTIMONY WHEREOF, We have hereunto set our hands.

County of _____)
 _____)
 ss. Address: _____

 State of _____)
 _____)
 By: _____
 Date: _____

Subscribed and sworn to before me this _____ day of _____, 2012
_____, Notary Public

County of _____)
 _____) ss. Name: Rodney J. Moreland
 Address: _____

 State of _____)
 _____) By: Southborough, MA
 Date: _____

Subscribed and sworn to before me this _____ day of _____, 2012
_____, Notary Public

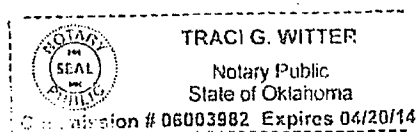
County of Oklahoma)
State of Oklahoma)

ss. Name: Mariko Kudo
Address: 2220 NW 56th TER
Oklahoma City, OK 73112
By: Mariko Kudo
Date: 4/12/2012

Subscribed and sworn to before me this 12 day of April, 2012

 Notary Public

Wm. H. Hall



OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

En nombre del Subsecretario de Comercio para la Propiedad
Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos de Norteamérica

ABRIL 17 DE 2012.

JEFREY M. JACOBSTEIN/FINNEGAN

501889182

55 CAMBRIDGE PARKWAY

SUITE 700

CAMBRIDGE, MA 02142

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
NOTIFICACION DE INSCRIPCION DE DOCUMENTO DE CESIÓN.

EL DOCUMENTO ANEXO HA SIDO INSCRITO ANTE LA DEPENDENCIA DE
INSCRIPCIÓN DE CESIONES DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. UNA COPIA COMPLETA DEL MISMO SE
ENCUENTRA DISPONIBLE EN EL CUARTO DE BÚSQUEDA DE CESIONES, BAJO
LOS NÚMEROS DE CARRETE Y MARCO ABAJO INDICADOS.

FAVOR REVISAR TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN LA PRESENTE
NOTIFICACION. LA INFORMACION CONTENIDA EN LA PRESENTE
NOTIFICACION DE INSCRIPCION REFKEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL

11

SISTEMA DE CESIONES DE MARCAS Y PATENTES. DE ENCONTRAR ALGUN ERROR O TENER ALGUNA INQUITUD EN RELACION CON LA PRESENTE NOTIFICACION, DEBERÁ PONERSE EN CONTACTO CON LA OFICINA DE INSCRIPCION DE CESIONES EN EL NÚMERO 571-272-3350. FAVOR REMITIR SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, CORREO: OFICINA DE INSCRIPCION DE CESIONES, P.D. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 04/16/2012

CARRETE/MARCO:

028050/0979

NÚMERODE PÁGINAS: 5

ESCRITO: CESION DE CEDENTES INTERESADOS (VER DOCUMENTO CON DETALLES)

CEDENTE:

CANFIELD, WILLIAM M.

FECHA DEL DOCUMENTO:

04/11/2012

CEDENTE:

MORELAND, RODNEY J.

FECHA DEL DOCUMENTO:

04/4/2012

CEDENTE:

KUDO, MARIKO.

FECHA DEL DOCUMENTO:

04/12/2012

CECIONARIO:

GENZYME CORPORATION.

500 KENDALL STREET

CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142

SOLICITUD No. 61478336

FECHA DE SOLICITUD:

04/22/2011

NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE CONCESION:

TÍTULO: ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO
ACELERADO

OFICINA DE INSCRIPCION DE CESIONES

DIVISION DE INSCRIPCIONES PÚBLICAS.

CESIÓN

POR CUANTO, los inventores nombrados a continuación (en adelante los CEDENTES) han desarrollado la invención titulada:

"ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO"

Respecto de la cual se ha presentado una Solicitud de Patente en los Estados Unidos en Abril 22 de 2011 (solicitud No. **61/478.336**); y

POR CUANTO, **GENZYME CORPORATION**, una sociedad de la Comunidad Autónoma de Massachusetts, cuya dirección de correo es 500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142 (en adelante la CESIONARIA), desea asegurar todos los derechos, títulos, e intereses sobre la presente invención en todos los países alrededor del mundo, y sobre la solicitud de patente Estadounidense relativa a dicha invención, y sobre las patentes otorgadas a partir de la mencionada solicitud;

AHORA POR LO TANTO, como es sabido que por contraprestación onerosa y suficiente, cuyo recibo por parte de la cesionaria es reconocida por virtud de la presente cesión, nosotros, en calidad de Cedentes hemos vendido, cedido y transferido, y en este acto vendemos, cedemos y transferimos a la Cesionaria, sus sucesores y asignatarios, la totalidad de los derechos, títulos e intereses,

para los Estados Unidos y en otras partes, sobre la presente invención y sobre la solicitud provisional de patente No. 61/478.336, presentada el 22 de Abril de 2011, y sobre todas las divisiones y continuaciones de la misma, y todas las patentes que sean otorgadas en los Estados Unidos respecto de las mismas, así como sobre todas las reexpedidas y el derecho a reivindicar prioridad con base en la presente solicitud en cualquier país extranjero, y todas las patentes que sean otorgadas en cualquier país extranjero respecto de la referida invención, y todas las extensiones, renovaciones y re expediciones de las mismas; y por virtud del presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, y a cualquier entidad oficial de cualquier país extranjero, cuyo deber sea el otorgamiento de patentes sobre solicitudes como las arriba describas, conceder todas las patentes sobre la presente invención a la cesionaria, sus sucesores y asignatarios, en concordancia con los términos de la presente cesión;

Y, NOSOTROS, POR VIRTUD DEL PRESENTE convenimos que tenemos pleno derecho a transferir los intereses cedidos por medio de esta Cesión; y que no hemos otorgado ni otorgaremos ningún documento en conflicto con los términos de la presente cesión;

Y, NOSOTROS, POR VIRTUD DEL PRESENTE acordamos y convenimos que sin consideraciones adicionales, comunicaremos con la cesionaria, sus

sucesores y asignatarios, cualquier hecho o información que conozcamos respecto de la presente invención, y testificaremos en cualquier proceso legal, firmaremos y enviaremos documentos cuando así nos sea requerido por ser ello necesario o deseable a fin de perfeccionar la titularidad de la presente invención en cabeza de la cesionaria, sus sucesores o asignatarios, efectuar todas las solicitudes divisionales, continuaciones y solicitudes de re expedición, efectuar todos los juramentos necesarios y en general, llevar a cabo todo aquello que sea posible a fin de asegurar a la cesionaria, sus sucesores y asignatarios, la obtención y ejercicio idóneo de la protección por vía de patente de su invención en los Estados Unidos y en cualquier país del extranjero, siendo entendido que cualquier gasto incidental relacionado con el otorgamiento de dichos documentos, será asumido por la cesionaria, sus sucesores y asignatarios.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, hemos suscripto esta cesión.

Condado de Oklahoma	Nombre: William M. Canfield
	Dirección: (Ilegible)
	Ciudad de Oklahoma
Estado de Oklahoma	Por: [Firmado Ilegible]
	Fecha: 4-11-2012

Suscrito y otorgado ante mí este 11 de Abril de 2012.
[Firmado Ilegible], Notaria Pública

Sello de Notario
TRACI G. WITTER
Notaria Pública
Estado de Oklahoma
Comisión #060003982
Expira: 04/20/2014

Condado de _____	Nombre: Rodney J. Moreland
	Dirección: _____
	Southborough, MA
Estado de _____	Por: _____
	Fecha: _____

Suscrito y otorgado ante mí este _____ de _____ de _____.

Notaria Pública

Condado de Middlesex

Nombre: William M. Canfield

Dirección:

Ciudad de Oklahoma, OK

Estado de Massachusetts

Por: _____

Fecha: _____

Suscrito y otorgado ante mí este ____ de ____ de ____.

____ Notaria Pública

Condado de Oklahoma

Nombre: Rodney J. Moreland

Dirección: 2 David Henry Gardner Lane

Southborough, MA 01772

Estado de Oklahoma

Por: [*Firmado Ilegible*]

Fecha: 4-4-2012

Suscrito y otorgado ante mí este 4 de Abril de 2012.

[*Firmado Ilegible*], Notaria Pública

Sello de Notario

CHERYL L. SAWIN

Comunidad Autónoma de Massachusetts

Mi Comisión expira en Febrero 2 de 2018.

Condado de Middlesex

Nombre: Mariko Kudo

Dirección:

Ciudad de Oklahoma, OK

Estado de Massachusetts

Por: _____

Fecha: _____

Suscrito y otorgado ante mí este ____ de ____ de ____.

____ Notaria Pública

Condado de Middlesex

Nombre: William M. Canfield

Dirección:

Ciudad de Oklahoma, OK

Estado de Massachusetts

Por: _____

Fecha: _____

Suscrito y otorgado ante mí este ____ de ____ de ____.

____ Notaria Pública

Condado de _____

Nombre: Rodney J. Moreland

Dirección: _____

Southborough, MA

Estado de _____

Por: _____

Fecha: _____

Suscrito y otorgado ante mí este ____ de ____ de ____.

Notaria Pública

Condado de Oklahoma

Nombre: Mariko Kudo

Dirección: 2220 NW 56th TER

Ciudad de Oklahoma, OK 73112

Estado de Oklahoma

Por: [*Firmado Ilegible*]

Fecha: 4-12-2012

Suscrito y otorgado ante mí este 12 de Abril de 2012.

[*Firmado Ilegible*], Notaria Pública

Sello de Notario

TRACI G. WITTER

Notaria Pública

Estado de Oklahoma

Comisión #060003982

Expira: 04/20/2014

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 October 2012 (26.10.2012)

WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2012/145644 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 9/24 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/034479

(22) International Filing Date:
20 April 2012 (20.04.2012)

(25) Filing Language:
English

(26) Publication Language:
English

(30) Priority Data:
61/478,336 22 April 2011 (22.04.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CANFIELD, William, M. [US/US]; 7108 Brentwood Road, Oklahoma City, OK 73116 (US). MORELAND, Rodney, J. [US/US]; 2 David Henry Gardner Lane, Southborough, MA 01772 (US). KUDO, Mariko [JP/US]; 2220 Nw 56th Terrace, Oklahoma City, OK 73112 (US).

(74) Agents: MCDONELL, Leslie, A. et al.; Finnegan, Herder-son, Farabow, Garrett & Dunner LLP, 901 New York Avenue, NW, Washington, DC 20001 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

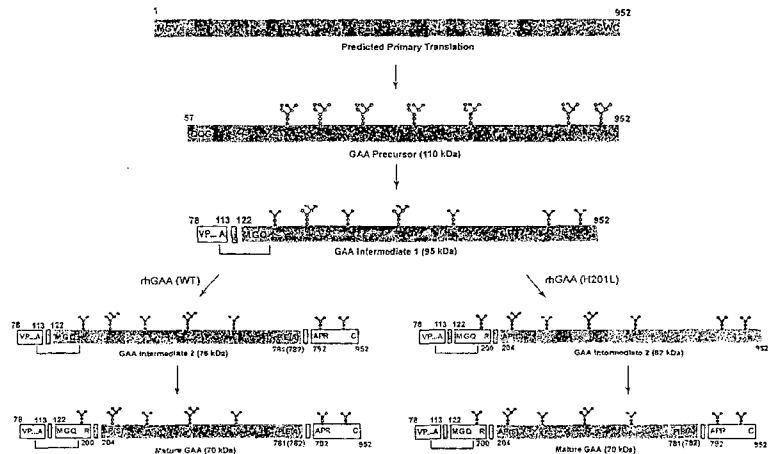
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING

FIG. 7



(57) Abstract: A modified human acid alpha-glucosidase polypeptide having increased hydrophobicity at or near the N-terminal 70 kDa processing site is provided, as well as methods of making and using the modified human acid alpha-glucosidase to treat glyco-gen storage disorders.

**MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED
PROCESSING**

[001] This application claims the benefit of priority of U.S. Provisional Patent Application No. 61/478,336, filed April 22, 2011, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[002] This disclosure relates in general to modified human acid alpha-glucosidase and its use in treating glycogen storage diseases.

[003] Pompe disease, also known as glycogen storage disease (GSD) type II and acid maltase deficiency, is an autosomal recessive metabolic myopathy caused by a deficiency of the lysosomal enzyme acid alpha-glucosidase (GAA). GAA is an exo-1,4 and 1,6- α -glucosidase that hydrolyzes glycogen to glucose in the lysosome. Deficiency of GAA leads to glycogen accumulation in lysosomes and causes progressive damage to respiratory, cardiac, and skeletal muscle. The disease ranges from a rapidly progressive infantile course that is usually fatal by 1-2 years of age to a more slowly progressive and heterogeneous course that causes significant morbidity and early mortality in children and adults. Hirschhorn RR, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 3: 3389-3420 (2001, McGraw-Hill); Van der Ploeg and Reuser, *Lancet* 372: 1342-1351 (2008).

[004] The steps involved in the biosynthesis, targeting, and lysosomal processing of GAA are complex. The primary translation product of human GAA is a 952 amino acid polypeptide containing seven consensus *N*-glycosylation sites. Moreland et al., *J. Biol. Chem.* 280: 6780-6791 (2005). The *N*-glycans on GAA include complex and high-mannose type glycans, some of which are modified by mannose 6-phosphate. GAA is targeted to the

lysosome via the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. In the lysosome, the enzyme undergoes further processing by proteases and glycosidases, resulting in a mature peptide capable of increased glycogen clearance.

[005] Figure 1 shows a schematic of the GAA processing pathway. Moreland et al., 2005. Typically, GAA undergoes up to four cleavage events during processing. First, the primary GAA translation product is cleaved at around amino acid 57 to form a precursor with an apparent molecular weight of 100 to 110-kDa. Next, the 100 to 110-kDa precursor is cleaved around amino acids 113 and 122 to form a 3.9-kDa (aa 78-113) and a 95-kDa (aa 122-952) portion. The 95-kDa polypeptide may then be cleaved around amino acids 781 and 792 to yield 76-kDa (aa 122-781) and 19.4-kDa (aa 792-952) fragments. The 76-kDa species remains associated with the 19.4- and 3.9-kDa polypeptides. An additional proteolytic cleavage converts the 76-kDa to a 70-kDa (aa 204-781) species that remains associated with 19.4-, 10.4-, and 3.9-kDa polypeptides.

[006] Current human therapy for treating Pompe disease involves administration of recombinant human GAA (e.g., MYOZYMETM). Although recombinant human GAA effectively reduces glycogen accumulation in patients, it is not fully processed to the 70-kDa form upon administration. Because the affinity of GAA for glycogen may significantly increase as a result of protease processing (Moreland et al., 2005; Wisselaar et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2223-2231 (1993)), increasing the rate of recombinant human GAA processing could allow for improved therapeutic efficacy of GAA, including lower doses and/or less frequent administration of GAA therapy.

[007] Accordingly, we herein describe modified GAA polypeptides that are processed more rapidly than unmodified human GAA.

[008] Certain embodiments include a human acid alpha-glucosidase or a catalytically-active fragment thereof having a modification at or near an N-terminal 70-kDa processing site. In some embodiments, a polypeptide is provided comprising a human acid alpha-glucosidase (GAA) or a catalytically-active fragment thereof having a modification at or near an N-terminal 70-kDa processing site. The catalytically-active fragment may be chosen from a 70-kDa, 76-kDa, 82-kDa, 95-kDa or any other catalytically-active fragment. In certain embodiments, the polypeptide further comprises a receptor targeting sequence. In some embodiments, the receptor targeting sequence is an IGF2 sequence.

[009] In certain instances, the modification results in increased hydrophobicity at or near an N-terminal 70-kDa processing site. In some instances, the polypeptide is modified at one or more amino acids corresponding to positions 195-209 of SEQ ID NO: 1. In further embodiments, the modification is at one or more amino acids corresponding to amino acid positions 200-204 of SEQ ID NO: 1. In certain embodiments, the modification is at the amino acid corresponding to position 201 of SEQ ID NO: 1. In further embodiments, the modification is substitution of one or more amino acids with a more hydrophobic amino acid. In other embodiments, the modification is insertion of one or more hydrophobic amino acids. In even further embodiments, the hydrophobic amino acid is chosen from leucine and tyrosine.

[010] In certain embodiments, the polypeptide has at least 80% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1. In some instances, the polypeptide has at least 90% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1. In other instances, the polypeptide has at least 95% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1.

[011] In certain embodiments, the polypeptide exhibits more rapid lysosomal protease processing when compared to an unmodified human acid alpha-glucosidase. In some embodiments, at least 50% of the polypeptide is proteolytically processed to a 70-kDa form within 20 hours of administration. In other embodiments, substantially all the polypeptide is proteolytically processed to a 70-kDa form within 55 hours of administration.

[012] Some embodiments include polypeptides conjugated to an oligosaccharide comprising at least one mannose-6-phosphate.

[013] In certain embodiments, a nucleic acid is provided encoding a modified GAA polypeptide. In further embodiments, a host cell stably transfected with the nucleic acid is provided. In further embodiments, the host cell is capable of secreting modified GAA.

[014] In certain embodiments, a method of reducing or preventing glycogen accumulation in a tissue is provided, comprising administering an effective amount of a polypeptide as described herein to a patient in need thereof. In further embodiments, the patient has a glycogen storage disease. In still further embodiments, the glycogen storage disease is Pompe disease.

[015] In other embodiments, a method is provided for treating a glycogen storage disease, comprising administering a therapeutically effective amount of a modified GAA to a patient in need thereof. In further

embodiments, the glycogen storage disease is Pompe disease. In other embodiments, a pharmaceutical composition is provided, comprising a modified GAA as described herein for use in treating a glycogen storage disease. In some embodiments, the polypeptide is lyophilized.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[016] **Fig. 1** is a diagram showing a model for the maturation of native human GAA.

[017] **Fig. 2** shows SDS-PAGE of recombinant GAA (lane 1), human placental GAA (lane 2), and bovine testes GAA (lane 3).

[018] **Fig. 3A** shows an alignment of human GAA from amino acids 197 to 206 with GAAs from mouse, hamster, bovine, and quail. **Fig. 3B** shows the results of a western blot comparing different processed GAAs. Lane 1 shows human GAA purified from placenta. Lanes 2 and 3 are control GAAs purified from 293T cells transfected with wild-type human GAA constructs. Lanes 4-7 are modified GAAs purified from 293T cells transfected with human GAA constructs where the histidine at amino acid 201 was changed to the following amino acids: arginine (lane 4), leucine (lane 5), tyrosine (lane 6), and lysine (lane 7).

[019] **Fig. 4** shows the biosynthesis of rhGAA(H201L) and rhGAA (WT) in stably transfected CHO cells.

[020] **Fig. 5** shows Pompe fibroblast uptake and processing of rhGAA (WT) and rhGAA (H201L).

[021] **Fig. 6** shows the results of Western blots probed with anti-GAA 183-200 (**Fig. 6A**) and monoclonal antibody GAA1 (**Fig. 6B**).

[022] **Fig. 7** is a schematic of a processing model for rhGAA(H201L).

DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

[023] To assist in understanding the present disclosure, certain terms are first defined. Additional definitions are provided throughout the application.

[024] As used herein, the term “N-terminal 70-kDa processing site” refers to the recognition site for the proteolytic enzyme(s) that cleave GAA at the position corresponding to amino acids 200 to 204 of SEQ ID NO: 1 (native human GAA).

[025] As used herein, the term “modified GAA” refers to human GAA and GAA variants having at least one amino acid at or near the N-terminal 70-kDa processing site that differs from the amino acid found in native human GAA. Modified GAA is also referred to as “modified human GAA” in the description. The term “modified GAA” includes full-length GAA polypeptides that contain signal sequences, as well as partially-processed GAA polypeptides as secreted from cells.

[026] As used herein, the singular forms “a,” “an,” and “the” include plural referents unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to a method containing “a compound” includes a mixture of two or more compounds. The term “or” is generally employed in its sense including “and/or” unless the content clearly dictates otherwise.

[027] Throughout the specification, protein and polypeptide sizes are provided in “kDa” units. One of skill in the art will recognize that these sizes are based on apparent molecular weight of polypeptides in electrophoresis assays such as SDS-PAGE (see, e.g., Moreland et al., 2005). Exact molecular weights will depend on glycosylation state and other parameters

such as association with other polypeptides, and can be determined by various methods that are well-known to those of skill in the art.

[028] All references cited herein are incorporated by reference in their entirety. To the extent publications and patents or patent applications incorporated by reference contradict the invention contained in the specification, the specification will supersede any contradictory material.

I. Acid alpha-glucosidase (GAA)

[029] As described above, GAA is a lysosomal enzyme involved in clearance of glycogen. The term GAA encompasses both full-length, wild-type forms of the protein, as well as other catalytically-active variants. Catalytically-active GAA and GAA variants will at least retain catalytic activity toward glycogen. Numerous variants of native human GAA are known to those of skill in the art, including those that have been truncated, fused or conjugated to other polypeptides, altered in their amino acid sequences, or altered recombinantly or chemically. For instance, it is known that at least 77 N-terminal amino acids can be removed from native human GAA (SEQ ID NO: 1) without losing activity. Moreland et al., 2005. In addition, conjugates and fusion proteins have been described. In some embodiments, a GAA or catalytically-active fragment of GAA can be conjugated or fused to a receptor targeting sequence. In some instances, the receptor targeting sequence can be recognized by a cellular receptor. For example, a truncated GAA may be fused to an IGF2 domain as described in U.S. Patent 7,785,856, which is incorporated by reference in its entirety. GAA has also been altered to add synthetic moieties, carbohydrate moieties and/or increased levels of mannose-6-phosphate. For example, lysosomal enzymes with modified

carbohydrate moieties containing increased levels of mannose-6-phosphate are described in U.S. Patent 7,001,994; 7,723,296; 7,786,277; U.S. Patent Publication 2010/0173385; and PCT Publication 2010/075010, which are incorporated by reference in their entirety.

[030] In certain embodiments, the GAAs described herein have at least 80%, 90%, 95%, or 99% identity to a human GAA or GAA variant. In some instances, the GAA has at least 80%, 90%, 95%, or 99% identity to at least 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, or 900 amino acids of SEQ ID NO: 1.

[031] Any of the catalytically-active human GAAs described in this section can be used as the base sequence for a modified GAA described herein. One of skill in the art will recognize which GAA variants are suitable for use in the invention. Where a base GAA sequence has a different length or glycosylation pattern compared to native human GAA, the processed polypeptides will have sizes that vary accordingly.

II. Modified GAA

[032] In various embodiments, a polypeptide comprising a modified human GAA is provided that is modified at or near the N-terminal 70-kDa processing site. The region "near" the N-terminal 70-kDa processing site includes up to 5 amino acids upstream or downstream of the N-terminal 70-kDa processing site. In certain embodiments, the region at or near the N-terminal 70-kDa processing site includes the amino acids corresponding to positions 195-209 of SEQ ID NO: 1.

[033] The modified GAAs described herein are processed more rapidly than unmodified GAA. In certain embodiments, the modified GAA has

increased hydrophobicity at or near the N-terminal 70-kDa processing site. In some embodiments, the modified GAA has a faster rate of proteolytic processing to a 70-kDa mature form. In some embodiments, and depending on the starting sequence, the modified GAA is processed to a variant of the 70-kDa mature form. The modified GAA may be processed such that the mature polypeptide remains associated with additional polypeptide fragments. In certain embodiments, the modified GAA is processed via the same pathway as unmodified GAA. In other embodiments, the modified GAA is processed via different intermediates compared to unmodified GAA. For example, a modified full-length GAA may be processed via 76-kDa or 82-kDa intermediates, or both. The modified GAA may be recognized by the same proteases as unmodified GAA, and processed in the same or a different order.

[034] In certain embodiments, GAA is modified to increase its hydrophobicity at or near the N-terminal 70-kDa processing site by substituting at least one amino acid with a more hydrophobic amino acid. In some embodiments, the substitution may be made within 5 amino acids upstream or downstream of the N-terminal 70-kDa processing site. In certain examples, the amino acid substitution may be made at an amino acid corresponding to position 195 to 209 of SEQ ID NO: 1. In other instances, the amino acid substitution may be made at an amino acid corresponding to position 200 to 204 of SEQ ID NO: 1. In further embodiments, the modified human GAA contains a hydrophobic amino acid at the position corresponding to amino acid position 201 of SEQ ID NO: 1. In some embodiments, GAA is modified by inserting one or more hydrophobic amino acids at or near the N-

terminal 70-kDa processing site. Additional modifications include deletion of one or more amino acids at or near the N-terminal 70-kDa processing site.

[035] In certain embodiments, a modified human GAA is provided containing a hydrophobic amino acid (natural or synthetic) at more than one position at the N-terminal 70-kDa processing site, or within 5 amino acids of the N-terminal 70-kDa processing site. In one embodiment, one of the modified amino acids is at the position corresponding to amino acid 201 of SEQ ID NO: 1.

[036] In various embodiments the hydrophobic amino acid is chosen from valine, leucine, isoleucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, cysteine or alanine. In further embodiments, the hydrophobic amino acid is leucine or tyrosine. In some embodiments, the modified human GAA contains a synthetic or non-natural amino acid that exhibits hydrophobic properties. Generally, the substituted amino acid is more hydrophobic than the wild-type amino acid, and thus increases the hydrophobicity at or near the N-terminal 70kDa processing site.

[037] In one exemplary embodiment, the modified GAA has a leucine at the position corresponding to amino acid 201 of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, the modified GAA has a tyrosine at the position corresponding to amino acid 201 of SEQ ID NO: 1.

[038] In certain embodiments, modified human GAAs are provided having at least 80%, 90%, 95%, or 99% homology to at least 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, or 900 amino acids of SEQ ID NO: 1, and wherein the modified human GAA has at least one amino acid in the N-terminal 70-kDa processing site substituted with a more hydrophobic amino acid.

[039] In some embodiments, at least 50% of the modified human GAA is processed to a 70-kDa form in the lysosome within 20, 30, or 40 hours. In still further embodiments, substantially all of the modified human GAA is processed to a 70-kDa form in the lysosome within 55, 65, or 75 hours.

[040] In certain embodiments, a modified human GAA of the invention can be identified by its more rapid proteolytic processing to a mature 70-kDa form, or a corresponding variant thereof. In other embodiments, a modified human GAA as described herein can be identified by the production of an 82-kDa intermediate polypeptide that is not produced during proteolytic processing of native human GAA. In further embodiments, a modified human GAA can be identified by the absence of a 76-kDa intermediate polypeptide that is produced during proteolytic processing of unmodified human GAA.

III. Production of Modified GAA

[041] In various embodiments, a modified GAA polypeptide can be produced according to methods known to one of skill in the art. For example, a modified GAA polypeptide can be expressed and secreted from cell lines stably transfected with nucleic acids encoding modified GAA. Suitable cell lines include fibroblast cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, 293T cells, or plant cells, among others recognized by those of skill in the art. Exemplary cell lines and production methods are described in U.S. Patent Nos. 7,351,410 and 7,138,262; and U.S. Patent Publication No. 2010/0196345, which are hereby incorporated by reference in their entirety. In certain embodiments, a nucleic acid encoding a modified GAA is inserted in a plasmid or vector containing the appropriate promoters and regulatory

sequences for expression from a cell line. Promoters useful for producing modified GAA in mammalian cell lines include the rpS21 and beta-actin promoters (see, e.g., U.S. Patent No. 7,423,135), among many others recognized by those of skill in the art. In certain embodiments, modified GAA is further altered to increase or decrease levels of glycosylation or mannose 6-phosphate, thereby enhancing secretion and/or lysosomal targeting.

IV. Pharmaceutical Compositions

[042] In certain embodiments, the modified GAA is present in a pharmaceutical composition comprising at least one additive such as a filler, bulking agent, disintegrant, buffer, stabilizer, or excipient. Standard pharmaceutical formulation techniques are well known to persons skilled in the art (see, e.g., *2005 Physicians' Desk Reference*[®], Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). Suitable pharmaceutical additives include, e.g., mannitol, starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol, and the like. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may also contain pH buffering reagents and wetting or emulsifying agents. In further embodiments, the compositions may contain preservatives or stabilizers.

[043] In some embodiments, pharmaceutical compositions comprising modified human GAA may further comprise one or more of the following: mannitol, polysorbate 80, sodium phosphate dibasic heptahydrate, and sodium phosphate monobasic monohydrate. In another embodiment,

pharmaceutical compositions may contain 10mM Histidine pH 6.5 with up to 2% glycine, up to 2% mannitol, and up to 0.01% polysorbate 80. Additional exemplary pharmaceutical compositions can be found in PCT Publication No. 2010/075010.

[044] The formulation of pharmaceutical compositions may vary depending on the intended route of administrations and other parameters (see, e.g., Rowe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4th ed., APhA Publications, 2003.) In some embodiments, the modified GAA composition may be a lyophilized cake or powder. The lyophilized composition may be reconstituted for administration by intravenous injection, for example with Sterile Water for Injection, USP. In other embodiments, the composition may be a sterile, non-pyrogenic solution.

[045] The pharmaceutical compositions described herein may comprise modified GAA as the sole active compound or may be delivered in combination with another compound, composition, or biological material. For example, the pharmaceutical composition may also comprise one or more small molecules useful for the treatment of Pompe disease and/or a side effect associated with Pompe disease or its treatment. In some embodiments, the composition may comprise miglustat and/or one or more compounds described in, e.g., U.S. Patent Application Publication Nos. 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; or 2005/0267094. In some embodiments, the pharmaceutical composition may also comprise one or more immunosuppressants, mTOR inhibitors or autophagy inhibitors. Examples of immunosuppressants include rapamycin and velcade. Rapamycin is also an mTOR inhibitor.

V. Therapeutic Methods

[046] In some embodiments, a modified human GAA is used to reduce or prevent glycogen accumulation in a tissue of a patient. In other embodiments, modified human GAA is used to treat a glycogen storage disease. In further embodiments, the glycogen storage disease is Pompe disease. In exemplary embodiments, the modified GAA is subsequently processed into mature GAA in the lysosome after administration to the patient.

[047] The modified GAA described herein may be administered by any suitable delivery system and may include, without limitation, parenteral (including subcutaneous, intravenous, intracranial, intramedullary, intraarticular, intramuscular, intrathecal, or intraperitoneal injection), transdermal, or oral (for example, in capsules, suspensions, or tablets). In one embodiment, the modified GAA is delivered by intravenous administration.

[048] In additional embodiments, a nucleic acid encoding a modified GAA can be delivered to the patient. The nucleic acid may be delivered using a vector suitable for gene therapy. Examples of gene therapy methods are described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,952,516; 6,066,626; 6,071,890; and 6,287,857.

[049] Administration to a patient may occur in a single dose or in repeat administrations, and in any of a variety of physiologically acceptable salt forms, and/or with an acceptable pharmaceutical carrier and/or additive as part of a pharmaceutical composition.

[050] The modified GAA compositions described herein are administered in therapeutically effective amounts. Generally, a therapeutically effective amount may vary with the subject's age, general condition, and gender, as well as the severity of the medical condition in the subject. The dosage may be determined by a physician and adjusted, as necessary, to suit observed effects of the treatment.

[051] The modified GAAs described herein may be administered by intravenous infusion in an outpatient setting every, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or more days, or by, e.g., weekly, biweekly, monthly, or bimonthly administration. The appropriate therapeutically effective dose of a compound is selected by a treating clinician and may range from approximately 1 μ g/kg to approximately 500 mg/kg, from approximately 10 mg/kg to approximately 100 mg/kg, from approximately 20 mg/kg to approximately 100 mg/kg and from approximately 20 mg/kg to approximately 50 mg/kg. In some embodiments, the appropriate therapeutic dose is chosen from, e.g., 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 100 mg/kg. Additionally, examples of specific dosages may be found in the *Physicians' Desk Reference*®.

[052] In some embodiments, the methods comprise administering modified human GAA, thereby increasing the glycogen clearance in the subject by, e.g., at least 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%, relative to endogenous activity. In some embodiments, the methods comprise administering modified human GAA, thereby increasing glycogen clearance in the subject by, e.g., at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, or 1000 fold, relative to endogenous

activity. The increased glycogen clearance may be determined by, e.g., a reduction in clinical symptoms or by an appropriate clinical or biological assay such as a lysosome glycogen storage assay.

[053] In certain embodiments, increased glycogen clearance after treatment of a patient with a pharmaceutical composition comprising modified human GAA may be determined by biochemical (see, e.g., Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279: 50336-50341 (2004)) or histological observation of reduced lysosomal glycogen accumulation in, e.g., cardiac myocytes, skeletal myocytes, or skin fibroblasts. GAA activity may also be assayed in, e.g., a muscle biopsy sample, in cultured skin fibroblasts, in lymphocytes, and in dried blood spots. Dried blood spot assays are described in e.g., Umpathysivam et al., *Clin. Chem.* 47:1378-1383 (2001) and Li et al., *Clin. Chem.* 50:1785-1796 (2004). Treatment of Pompe disease may also be assessed by, e.g., serum levels of creatinine kinase, gains in motor function (e.g., as assessed by the Alberta Infant Motor Scale), changes in left ventricular mass index as measured by echocardiogram, and cardiac electrical activity, as measured by electrocardiogram. Administration of a pharmaceutical composition comprising modified human GAA may also result in a reduction in one or more symptoms of Pompe disease such as cardiomegaly, cardiomyopathy, daytime somnolence, exertional dyspnea, failure to thrive, feeding difficulties, "floppiness," gait abnormalities, headaches, hypotonia, organomegaly (e.g., enlargement of heart, tongue, liver), lordosis, loss of balance, lower back pain, morning headaches, muscle weakness, respiratory insufficiency, scapular winging, scoliosis, reduced deep

tendon reflexes, sleep apnea, susceptibility to respiratory infections, and vomiting.

[054] In certain embodiments, the methods comprise administering pharmaceutical compositions comprising modified human GAA with one or more additional therapies. The one or more additional therapies may be administered concurrently with (including concurrent administration as a combined formulation), before, or after the administration of the modified human GAA. In some instances, an additional therapy can be administered between doses of modified GAA. For example, small molecule therapy may be used to slow reaccumulation of glycogen, allowing for less frequent doses of the modified GAA.

[055] In some embodiments, the methods comprise treating a subject with an antipyretic, antihistamine, and/or immunosuppressant (before, after, or during treatment with a modified human GAA described *supra*). In certain embodiments, a subject may be treated with an antipyretic, antihistamine, and/or immunosuppressant prior to treatment with a modified human GAA in order to decrease or prevent infusion associated reactions. For example, subjects may be pretreated with one or more of acetaminophen, azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporin A, diphenhydramine, methotrexate, mycophenolate mofetil, oral steroids, or rapamycin.

[056] In some embodiments, the methods comprise treating a subject (before, after, or during treatment with a modified human GAA) with small molecule therapy and/or gene therapy, including small molecule therapy and gene therapy directed toward treatment of a glycogen storage disorder. Small molecule therapy may comprise administration of miglustat and/or one or

more compounds described in, e.g., U.S. Patent Application Pub. Nos. 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; and 2005/0267094. Gene therapy may be performed as described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,952,516; 6,066,626; 6,071,890; and 6,287,857; and U.S. Patent Application Pub. No. 2003/0087868.

VI. Examples

[057] The following examples serve to illustrate, and in no way limit, the present disclosure.

Example 1: Materials and Methods

A. Assay reagents and materials

[058] Concanavalin A, DEAE-Sepharose FF, and Superdex 200 prep grade were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). α -methylglucoside, benzamidine, and 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Other chemicals were reagent grade or better and were from standard suppliers. SDS-PAGE gels were obtained from Invitrogen (San Diego, CA). Roller bottles were obtained from Corning (Corning, NY). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from JRH Biosciences (Lenexa, KS). Pompe fibroblasts (GM00248) were obtained from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ).

B. Acid α -glucosidase Activity and Protein Assay

[059] Acid α -glucosidase was assayed fluorimetrically in a microtiter plate using 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside as previously described. Oude Elferink et al., *Eur. J. Biochem.* 139: 489-495 (1984). Protein concentration was estimated by absorbance at 280 nm assuming $E^{1\%} = 10$ or using the

Micro-BCA assay standardized with bovine serum albumin. Smith et al., *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985).

C. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

[060] Reduced and non-reduced samples and molecular weight markers (Amersham Pharmacia Biotech) were applied to a 4-20% or 10% Tris-Glycine SDS-PAGE gel. Electrophoresis was performed at 150 volts for 1.5 hours and proteins were visualized with either Coomassie blue or silver stain. Blum et al., *Electrophoresis* 93-99 (1987).

D. Isolation of recombinant and placental GAA

[061] The production and purification of recombinant and human placental GAA was as previously described. Martiniuk et al., *Archives of Biochem. and Biophys.* 231: 454-460 (1984); Mutsaers et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 911: 244-251 (1987); Moreland et al., (2005).

E. Antibodies and Western blot analysis

[062] As previously described (Moreland et al., 2005), rabbits were immunized with synthesized peptides coupled to KLH. The sequence for each peptide was as follows: anti-GAA 57-74 (QQGASRPGPRDAQAHPGR (SEQ ID NO: 2)), anti-GAA 78-94 (VPTQCDVPPNSRFDCA (SEQ ID NO: 3)), and anti-GAA 183-200 (IKDPANRRYEVPLETPRV (SEQ ID NO: 4)). Goat polyclonal antibody was generated against purified human placental GAA. Monoclonal antibody GAA1 was previously described. Moreland et al., 2005. Western blots were performed as previously described. Moreland et al., 2005.

F. Fibroblast uptake of rhGAA

[063] For each time point, approximately 5×10^5 Pompe fibroblasts in DMEM plus 10% FBS were incubated with 250 nM rhGAA(WT) or rhGAA(H201L). At 16 hours, the cells were washed and fresh media that did not contain GAA was added. At the designated time points, the cells were removed and washed 5 times with phosphate buffered saline and stored at -80°C . After the final time point, all cell pellets were thawed and lysed simultaneously with 0.25% Triton. Cellular debris was pelleted and western blot analysis was performed on supernatants from each time point with anti-GAA antibodies.

G. Preparation of Expression Constructs and Transient Transfections

[064] Expression plasmids for recombinant GAA with and without amino acid substitution or deletions were made in pcDNA6 (Invitrogen), using standard procedures. Human kidney 293T cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS under 5% CO_2 at 37°C . Six micrograms of each plasmid were mixed with Fugene 6 transfection reagent (Roche) and added to 2.5×10^6 cells in a 10 cm dish. After 72 h the adherent cells were washed with PBS two times and lysed with PBS containing 0.25% Triton. The cellular debris was precipitated by centrifugation and the supernatants were stored at -20°C .

H. Metabolic labeling and Immunoprecipitation

[065] Stable CHO cell lines expressing rhGAA(WT) or rhGAA(H201L) were created following the method described previously. Qiu et al., *J. Biol. Chem.* 278: 32744-32752 (2003). Approximately 5×10^6 cells in a 10 cm dish were incubated in DMEM lacking methionine and cysteine for 30 min. The

cells were pulse-labeled for 2 h with 150 $\mu\text{Ci/ml}$ (1175 Ci/mmol Tran³⁵S Label) in DMEM deficient in methionine and cysteine. After the cells were washed with DMEM two times and the 0 h time point was taken, the cells were then incubated in DMEM without label at 37°C. At each time point, the cells were washed two times with PBS. The dishes were stored at -20°C. After the final time point, the cells were lysed with PBS containing 0.25% Triton (PBST). The cellular debris was removed by centrifugation and 60 μl of a 50% slurry of Concanavalin A Sepharose was added to the supernatant. After 2 hr incubation, the beads were washed 3 times with PBST. The labeled GAA was eluted with PBS containing 0.5 M α -methylglucoside. The GAA present in the eluent was then immunoprecipitated with affinity purified goat anti-GAA coupled to NHS-Sepharose. The immunoprecipitate was washed 3 times with PBST and 40 μl of 2x SDS sample buffer containing β -mercaptoethanol was added to the beads. The samples were boiled prior to western blot analysis.

I. Abbreviations

[066] As used herein, "rhGAA" means recombinant human acid α -glucosidase. "CHO" means Chinese hamster ovary. "MSX" means methionine sulfoximine. "ERT" means enzyme replacement therapy.

[067] As used herein, "GAA (H201R)" means a modified GAA having an amino acid substitution at position 201 from histidine to arginine. "GAA (H201L)" means a modified GAA having an amino acid substitution at position 201 from histidine to leucine. "GAA (H201Y)" means a modified GAA having an amino acid substitution at position 201 from histidine to tyrosine. "GAA (H201K)" means a modified GAA having an amino acid substitution at position 201 from histidine to lysine.

Example 2: Comparison of human, bovine and hamster GAA

[068] When GAA purified from placenta was examined by SDS-PAGE, two bands corresponding to polypeptides of 76- and 70-kDa were approximately in equal abundance (**Fig. 2**). Likewise, rhGAA over-expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells and purified from cell lysates has previously demonstrated 76- and 70-kDa bands. Moreland et al., 2005. By contrast, hamster GAA purified from CHO cells exists exclusively as the 70-kDa polypeptide. To determine if the predominance of the 70-kDa form was unique to hamster, bovine testis GAA was purified and characterized by reduced silver stained SDS-PAGE (4-20% acrylamide), and also shown to contain only the 70-kDa polypeptide (**Fig. 2**).

Example 3: The amino acid at position 201 of GAA affects the efficiency of conversion from the 76- to 70-kDa form and determines the order of proteolytic cleavages

[069] Alignment of mammalian GAA sequences at the proteolytic site between amino acids 197 and 206 (**Fig. 3A**) demonstrates that the retained sequences are highly conserved but that the excised sequences exhibit some variation. Human GAA contains a histidine at position 201 while hamster and bovine GAA have the hydrophobic residues leucine and tyrosine, respectively. To determine if these amino acid substitutions are responsible for species-specific differences in processing, GAA expression plasmids were constructed in which amino acid 201 was varied. The histidine was substituted with leucine (H201L), tyrosine (H201Y), arginine (H201R) or lysine (H201K). Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with each construct followed by western blot analysis with a monoclonal antibody to GAA.

Western blot analysis of the cell lysates indicated that when amino acid 201 in GAA was substituted with leucine or tyrosine, conversion from the 76- to 70-kDa form was dramatically more efficient compared to wild type (**Fig. 3B**, lanes 2-7). The hydrophobic amino acid substitution appeared to cause the formation of a new ~82-kDa intermediate, as indicated by the asterisk (**Fig. 3B**). In the vector only control (**Fig. 3**, lane 8), nine times more cell lysate was loaded to visualize the endogenous GAA compared to the lysates from the transiently transfected 293T cells.

[070] To characterize the rate of processing of wild type GAA compared to GAA(H201L), a pulse chase experiment was performed. Stable CHO cell lines expressing each GAA were radio-labeled for 2 hours with Tran³⁵S and chased for the times indicated with media that did not contain label (**Fig. 4**). rhGAA was purified from cell lysates by Con A followed by immunoprecipitation as described in Example 1. Time 0 hr was after the 2 hr pulse. At the 55 hour time point, GAA(H201L) was completely processed to the 70-kDa form, while very little of the wild type GAA was processed to the 70-kDa form after 120 hours. A 95-kDa species was observed in cells expressing the wild type GAA but was absent in the H201L. The identity of the 95-kDa intermediate has been previously characterized (Moreland et al., 2005) and is depicted in Figure 1.

[071] To determine if rhGAA(H201L) undergoes accelerated processing in uptake studies, the secreted form of rhGAA(H201L) and rhGAA(WT) were purified from stable recombinant CHO cell lines. Uptake studies were performed in Pompe fibroblasts because they are deficient in GAA (**Fig. 5**). As described in Example 1, GAA deficient Pompe fibroblasts

(GM00248) were incubated with 250 nM rhGAA (WT) and rhGAA (H201L). At the designated time points the fibroblasts were collected and frozen at -80°C. A reduced SDS-PAGE (7.5% acrylamide) western blot of the cell lysates was probed with a monoclonal antibody to human GAA (the unknown epitope of which lies within amino acids 204-782). After uptake of GAA, the 95-kDa and 76-kDa forms were prominent for rhGAA(WT) and not observed for rhGAA(H201L) (**Fig. 5**, lanes 5-13). The difference in processing was again accompanied by the appearance of an ~82-kDa intermediate with GAA(H201L).

[072] To characterize the ~82-kDa intermediate, a western blot containing purified rhGAA, placental GAA, and rhGAA(H201L) was probed with an anti-GAA antibody that recognizes amino acids 183-200 (and thus binds the 10.4-kDa fragment released from fully processed GAA) (**Fig. 6A**). rhGAA, placental GAA, and mature rhGAA(H201L) were purified as described in Example 1. The 76-kDa species from placenta still contained amino acids 183-200, as indicated by antibody binding. In contrast, the 82-kDa intermediate did not contain these amino acids, as indicated by the lack of antibody binding. This is because cleavage of the antibody recognition site had already taken place, as evidenced by the ~10-kDa band in lane 3. A separate monoclonal antibody to GAA demonstrated the presence of the 82-kDa intermediate in the sample of rhGAA(H201L) (**Fig. 6B**).

[073] It can be concluded that the 82-kDa intermediate results from accelerated proteolysis at the cleavage site between amino acids 200 to 204. The cleavage takes place before the cleavage between amino acids 782 to 792. As shown in **Fig. 6A**, the 82-kDa polypeptide does not contain the ~10-

kDa fragment from amino acids 122-200. These results suggest an alternative processing pathway for rhGAA(H201L) as shown in **Fig. 7**. Processing of wild type vs. GAA(H201L) diverge after the 95-kDa intermediate. The wild type GAA is cleaved near the carboxyl terminus (between amino acids 781-792) to give the 76-kDa intermediate while GAA(H201L) is cleaved between amino acids 200-204 to give the 82-kDa intermediate. Both pathways ultimately result in mature 70-kDa GAA.

[074] Other embodiments of the present disclosure will be apparent to those skilled in the art from consideration of the specification and practice of the embodiments disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A polypeptide consisting of human acid alpha-glucosidase or a catalytically-active fragment thereof having a modification at or near an N-terminal 70-kDa processing site.
2. A polypeptide comprising a human acid alpha-glucosidase or a catalytically-active fragment thereof having a modification at or near an N-terminal 70-kDa processing site.
3. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the modification is increased hydrophobicity at or near the N-terminal 70-kDa processing site.
4. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the modification is at one or more amino acids corresponding to positions 195-209 of SEQ ID NO: 1.
5. The polypeptide of claim 4, wherein the modification is at one or more amino acids corresponding to positions 200-204 of SEQ ID NO: 1.
6. The polypeptide of claim 5, wherein the modification is at the amino acid corresponding to position 201 of SEQ ID NO: 1.
7. The polypeptide of any one of claims 1 to 6, wherein the modification comprises
 - a) substitution of one or more amino acids with a more hydrophobic amino acid, or
 - b) insertion of one or more hydrophobic amino acids.
8. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the fragment is chosen from a 70-kDa, 76-kDa, 82-kDa, 95-kDa, or any other catalytically-active fragment of human acid alpha-glucosidase.
9. The polypeptide of claim 8, wherein the polypeptide further comprises a receptor targeting sequence.

10. The polypeptide of claim 9, wherein the receptor targeting sequence is IGF2.
11. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the polypeptide has at least 80% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1.
12. The polypeptide of claim 11, wherein the polypeptide has at least 90% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1.
13. The polypeptide of claim 12, wherein the polypeptide has at least 95% identity to at least 500 amino acids of SEQ ID NO: 1.
14. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the modified polypeptide exhibits more rapid lysosomal protease processing when compared to an unmodified human acid alpha-glucosidase.
15. The polypeptide of claim 14, wherein at least 50% of the polypeptide is proteolytically processed to a 70-kDa form within 20 hours of administration.
16. The polypeptide of claim 15, wherein substantially all the polypeptide is proteolytically processed to a 70-kDa form within 55 hours of administration.
17. The polypeptide of claim 1 or 2, wherein the polypeptide is conjugated to an oligosaccharide comprising at least one mannose-6-phosphate.
18. A nucleic acid encoding a polypeptide selected from any one of claims 1-17.
19. A host cell stably transfected with the nucleic acid of claim 18.
20. The host cell of claim 19, wherein the host cell is capable of secreting the polypeptide encoded by the nucleic acid of claim 18.
21. A method of reducing or preventing glycogen accumulation in a tissue, comprising administering an effective amount of a polypeptide of claim 1 or 2 to a patient in need thereof.

22. The method of claim 21, wherein the patient has a glycogen storage disease.
23. The method of claim 22, wherein the glycogen storage disease is Pompe disease.
24. A method of treating a glycogen storage disease, comprising administering a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or 2 to a patient in need thereof.
25. The method of claim 24, wherein the glycogen storage disease is Pompe disease.
26. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide of any one of claims 1 to 17 for use in treating a glycogen storage disease.
27. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the polypeptide is lyophilized.
28. A use of a polypeptide of any one of claims 1-17 in the manufacture of a medicament for reducing or preventing glycogen accumulation in a tissue.
29. The use of claim 28, wherein the glycogen accumulation is due to a glycogen storage disease.
30. The use of claim 29, wherein the glycogen storage disease is Pompe disease.

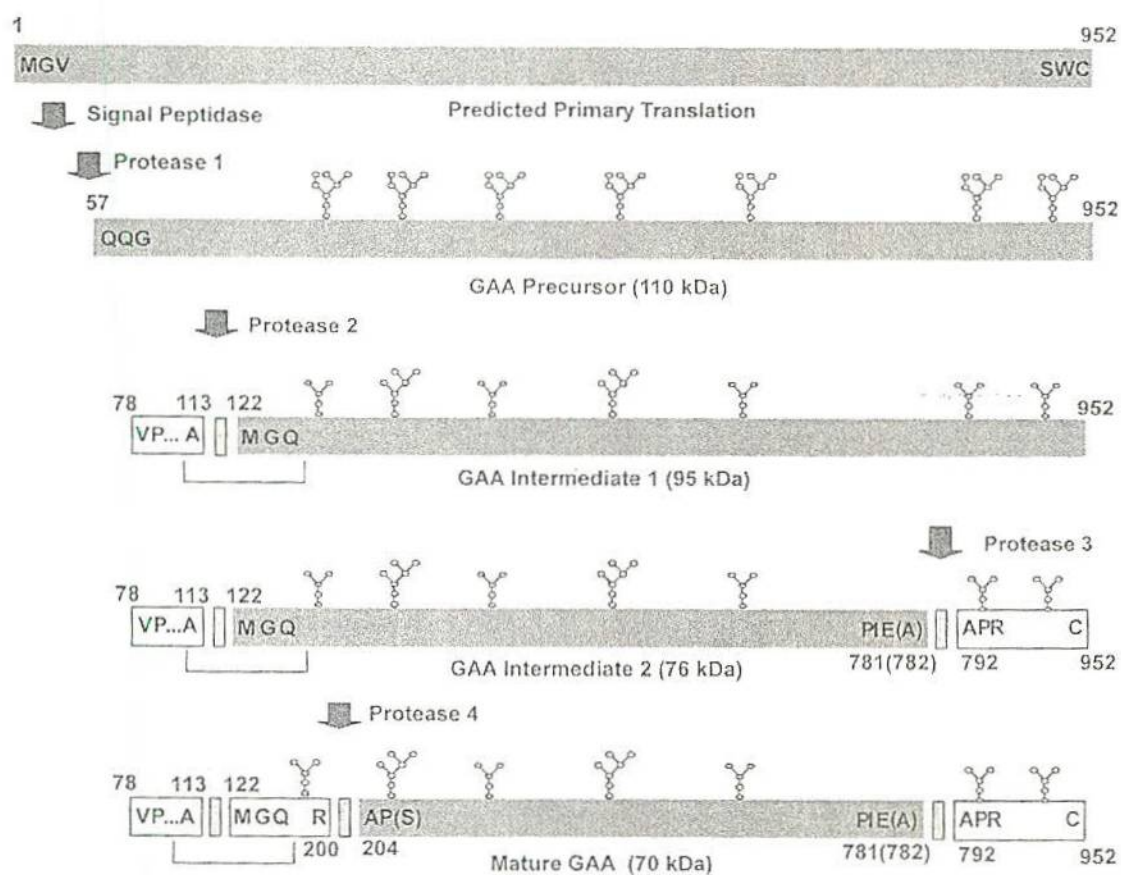


FIG. 1

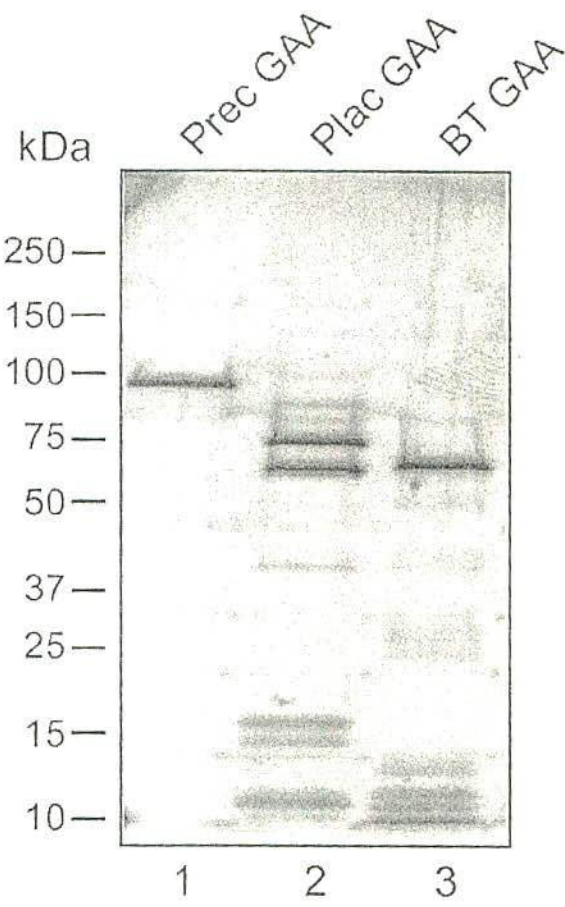


FIG. 2

A

	197	201	206
Human	TPRVHSRAPS		
Mouse	TPRVLSQAPS		
Hamster	TPRVLSRAPS		
Bovine	TPRVYSQAPF		

B

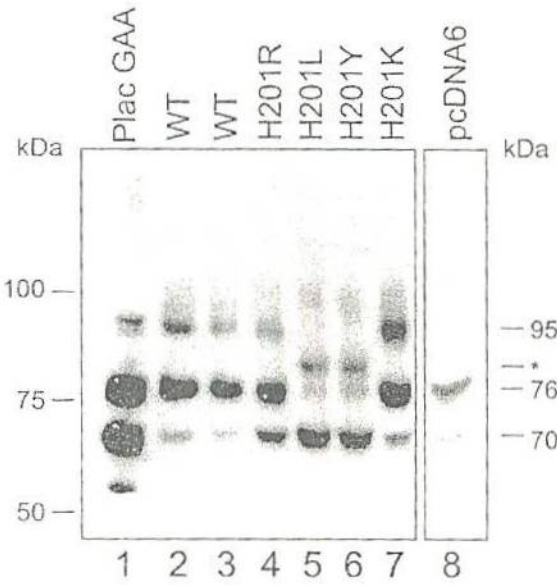


FIG. 3

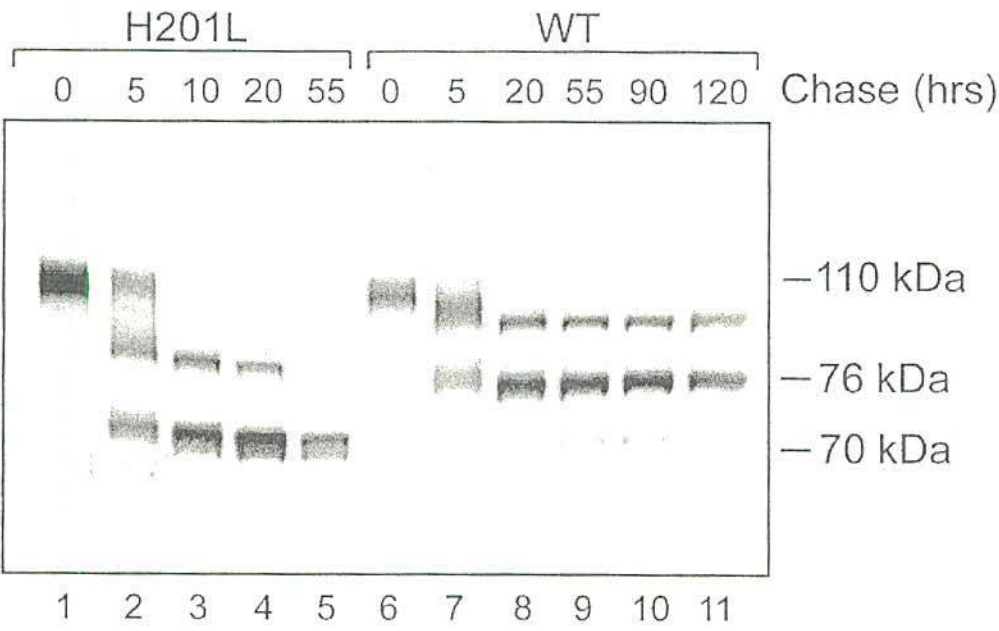


FIG. 4

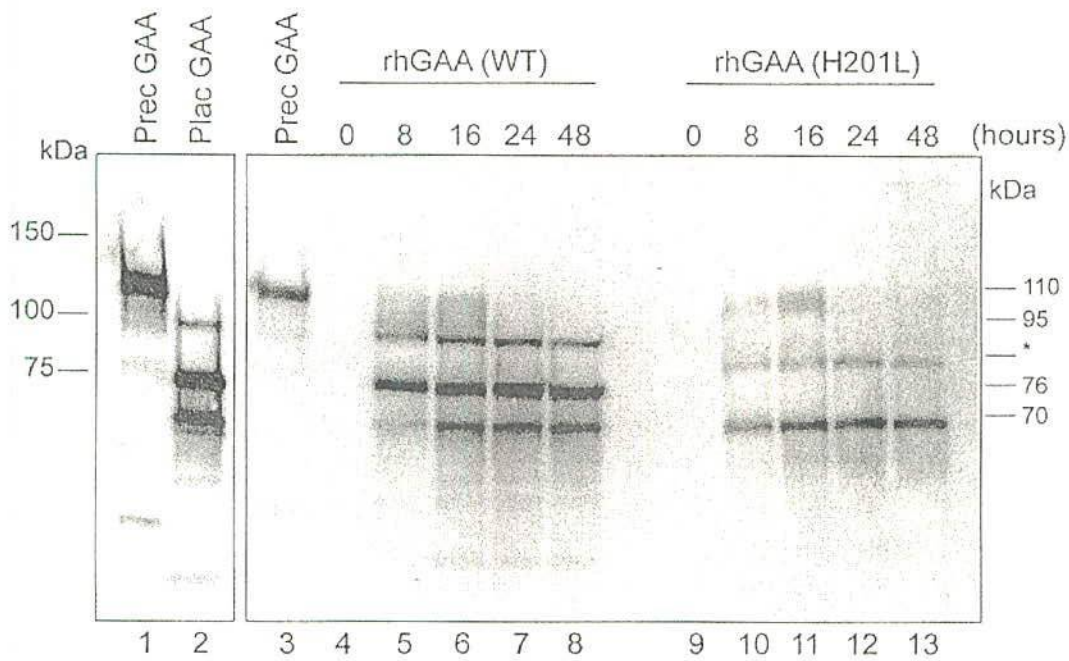


FIG. 5

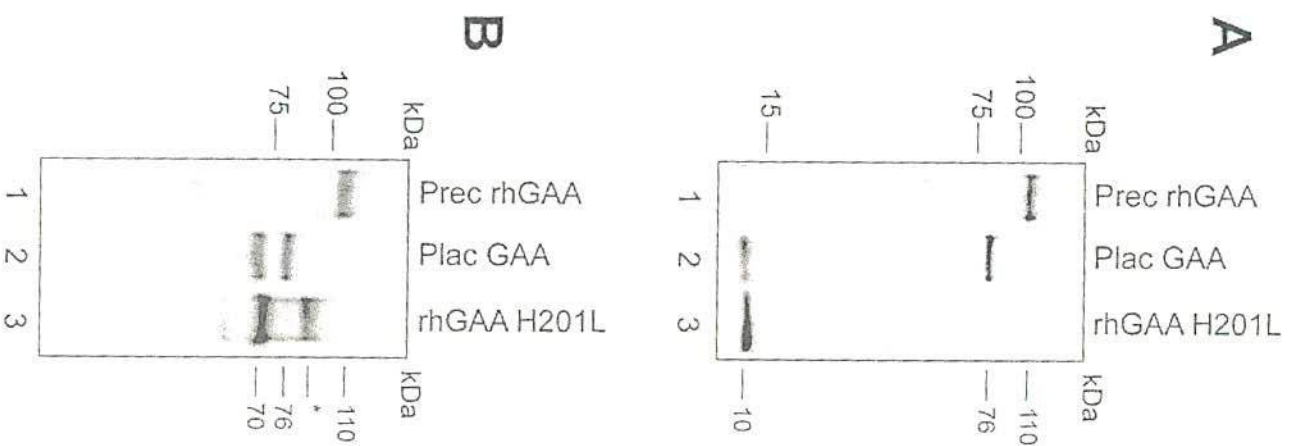


FIG. 6

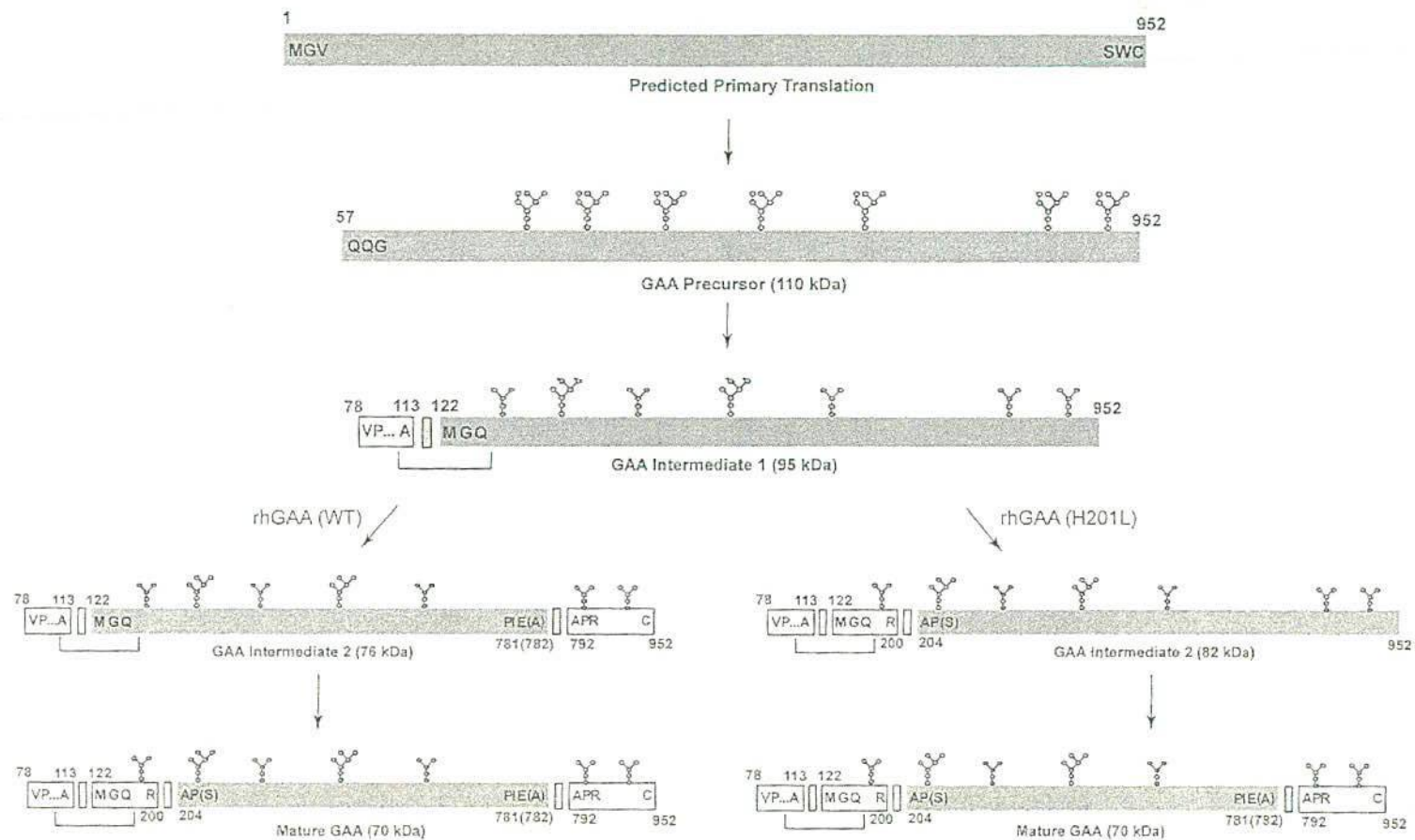


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/034479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/24 A61K38/47 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12Y A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	RODNEY J MORELAND ET AL: "Species-specific differences in the processing of acid -glucosidase are due to the amino acid identity at position 201", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 491, no. 1, 13 September 2011 (2011-09-13), pages 25-30, XP055028473, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/J.GENE.2011.09.011 [retrieved on 2011-09-22] page 25 - page 30	1-30
X	WO 2010/096369 A1 (AMICUS THERAPEUTICS INC [US]; KHANNA RICHIE [US]; TOTH MATTHEW J [US]) 26 August 2010 (2010-08-26)	1-8, 11-13, 18-30
Y	sequence 2	9,10,17
----- -/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 May 2012		Date of mailing of the international search report 11/06/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/034479

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/078077 A2 (ZYSTOR THERAPEUTICS INC [US]; LEBOWITZ JONATHAN [US]; MAGA JOHN [US]) 25 August 2005 (2005-08-25) claims 1-10 paragraphs [0005], [0010], [0011], [0012], [0033] -----	9,10,17
Y	EP 1 408 117 A1 (NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN [JP]; TOKYO METROPOLITAN ORG MED RES [J]) 14 April 2004 (2004-04-14) paragraph [0019] example 6 claims 1-3 -----	17
A	RABEN N ET AL: "ACID ALPHA-GLUCOSIDASE DEFICIENCY (GLYCOGENOSIS TYPE II, POMPE DISEASE)", CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 2, no. 2, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 145-166, XP009052371, ISSN: 1566-5240, DOI: 10.2174/1566524024605789 page 145 - page 166 -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/034479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010096369 A1	26-08-2010	US 2012064545 A1 WO 2010096369 A1	15-03-2012 26-08-2010
WO 2005078077 A2	25-08-2005	AT 465250 T AU 2005212435 A1 CA 2553955 A1 CN 1922313 A EP 1716232 A2 ES 2344302 T3 IL 177079 A JP 2007521818 A US 2005244400 A1 US 2008299640 A1 WO 2005078077 A2	15-05-2010 25-08-2005 25-08-2005 28-02-2007 02-11-2006 24-08-2010 31-10-2011 09-08-2007 03-11-2005 04-12-2008 25-08-2005
EP 1408117 A1	14-04-2004	AT 479769 T CN 1541275 A EP 1408117 A1 JP 4742191 B2 JP 2002369692 A US 2005064539 A1 WO 02103027 A1	15-09-2010 27-10-2004 14-04-2004 10-08-2011 24-12-2002 24-03-2005 27-12-2002

ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº 61/478.336, presentada el 22 de abril de 2011, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

5 -[002] Esta descripción se refiere en general a la alfa-glucosidasa ácida humana modificada y a su uso en el tratamiento de las glucogenosis.

10 [003] La enfermedad de Pompe, también conocida como glucogenosis (GSD) tipo II y la deficiencia de maltasa ácida, es una miopatía metabólica autosómica recesiva provocada por una deficiencia de la enzima lisosómica alfa-glucosidasa ácida (GAA). GAA es una exo-1,4 y 1,6- α -glucosidasa que hidroliza glucógeno hasta glucosa en el lisosoma. La deficiencia de GAA conduce a la acumulación de glucógeno en los lisosomas y provoca un daño progresivo en el músculo respiratorio, cardíaco, y esquelético. La enfermedad varía desde una evolución infantil progresiva rápida que normalmente es mortal a los 1-2 años de edad hasta una evolución progresiva más lenta y heterogénea que provoca una morbilidad significativa y una mortalidad temprana en niños y adultos. Hirschhorn RR, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 3: 3389-3420 (2001, McGraw-Hill); Van der Ploeg y Reuser, Lancet 372: 1342-1351 (2008).

20 [004] Las etapas implicadas en la biosíntesis, transporte selectivo, y procesamiento lisosómico de GAA son complejas. El producto de traducción primario de GAA humana es un polipéptido de 952 aminoácidos que contiene siete sitios consenso de N-glicosilación. Moreland et al., J. Biol. Chem. 280: 6780-6791 (2005). Los N-glicanos de GAA incluyen glicanos de tipo complejo y de alto contenido en manosa, algunos de los cuales están modificados con manosa 6-fosfato. GAA se transporta selectivamente al lisosoma por medio del receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes. En el lisosoma, la enzima experimenta un procesamiento

adicional mediante proteasas y glicosidasas, lo que da como resultado un péptido maduro con capacidad para una eliminación incrementada de glucógeno.

[005] La Figura 1 muestra un esquema de la ruta de procesamiento de GAA. Moreland et al., 2005. En general, GAA experimenta hasta cuatro sucesos de escisión durante el procesamiento. Primero, el producto de traducción de GAA primario se escinde alrededor del aminoácido 57 para formar un precursor con un peso molecular aparente de 100 a 110 kDa. A continuación, el precursor de 100 a 110 kDa se escinde alrededor de los aminoácidos 113 y 122 para formar una porción de 3,9 kDa (aa 78-113) y una porción de 95 kDa (aa 122-952). El polipéptido de 95 kDa se puede escindir después alrededor de los aminoácidos 781 y 792 para producir fragmentos de 76 kDa (aa 122-781) y 19,4 kDa (aa 792-952). La especie de 76 kDa permanece asociada a los polipéptidos de 19,4 y 3,9 kDa. Una escisión proteolítica adicional convierte la especie de 76 kDa en una especie de 70 kDa (aa 204-781) que permanece asociada a los polipéptidos de 19,4, 10,4, y 3,9 kDa.

[006] La terapia humana actual para tratar la enfermedad de Pompe implica la administración de GAA humana recombinante (p.ej., MYOZYMETM). Aunque la GAA humana recombinante reduce de manera eficaz la acumulación de glucógeno en los pacientes, no se procesa completamente hasta la forma de 70 kDa tras la administración. Debido a que la afinidad de GAA por el glucógeno se puede incrementar de manera significativa como resultado del procesamiento con proteasas (Moreland et al., 2005; Wisselaar et al., J. Biol. Chem. 268: 2223-2231 (1993)), el incremento de la velocidad de procesamiento de GAA humana recombinante podría proporcionar una eficacia terapéutica mejorada de GAA, lo que incluye dosis inferiores y/o una administración menos frecuente de la terapia con GAA.

[007] Por lo tanto, en la presente memoria se describen polipéptidos de GAA modificada que se procesan más rápidamente que la GAA humana sin modificar.

[008] Ciertas realizaciones incluyen una alfa-glucosidasa ácida humana o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En ciertas realizaciones, se proporciona un polipéptido que comprende una alfa-glucosidasa ácida humana (GAA) o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. El fragmento catalíticamente activo se puede elegir de un fragmento de 70 kDa, 76 kDa, 82 kDa, 95 kDa o cualquier otro fragmento catalíticamente activo. En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende además una secuencia de selección del receptor. En ciertas realizaciones, la secuencia de selección del receptor es una secuencia de IGF2.

[009] En ciertos casos, la modificación da como resultado una hidrofobicidad incrementada en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En ciertos casos, el polipéptido está modificado en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones 195-209 de SEQ ID Nº: 1. En realizaciones adicionales, la modificación está en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 200-204 de SEQ ID Nº: 1. En ciertas realizaciones, la modificación está en el aminoácido que corresponde a la posición 201 de SEQ ID Nº: 1. En realizaciones adicionales, la modificación es la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido más hidrófobo. En otras realizaciones, la modificación es la inserción de uno o más aminoácidos hidrófobos. En otras realizaciones adicionales, el aminoácido hidrófobo se elige de leucina y tirosina.

[010] En ciertas realizaciones, el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID Nº: 1. En ciertos casos, el polipéptido tiene al menos un 90% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID Nº: 1. En otros casos, el polipéptido tiene al menos un 95% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID Nº: 1.

[011] En ciertas realizaciones, el polipéptido exhibe un procesamiento más rápido con proteasas lisosómicas en comparación con una alfa-glucosidasa ácida humana sin modificar. En ciertas realizaciones, al menos un 50% del polipéptido se procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa en 20 horas desde la administración. En otras realizaciones, 5 sustancialmente todo el polipéptido se procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa forma en 55 horas desde la administración.

[012] Ciertas realizaciones incluyen polipéptidos conjugados a un oligosacárido que comprende al menos una manosa-6-fosfato.

[013] En ciertas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de GAA modificada. En realizaciones adicionales, se proporciona una célula 10 hospedadora transfectada de manera estable con el ácido nucleico. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es capaz de secretar la GAA modificada.

[014] En ciertas realizaciones, se proporciona un método para reducir o prevenir la acumulación de glucógeno en un tejido, que comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido como se describe en la presente memoria a un paciente que lo necesita. En 15 realizaciones adicionales, el paciente tiene una glucogenosis. En realizaciones adicionales, la glucogenosis es la enfermedad de Pompe.

[015] En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar una glucogenosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una GAA modificada a un 20 paciente que lo necesita. En realizaciones adicionales, la glucogenosis es la enfermedad de Pompe. En otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende una GAA modificada como se describe en la presente memoria para el uso en el tratamiento de una glucogenosis. En ciertas realizaciones, el polipéptido se liofiliza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[016] La Fig. 1 es un diagrama que muestra un modelo para la maduración de GAA humana nativa.

5 [017] La Fig. 2 muestra una SDS-PAGE de GAA recombinante (carril 1), GAA placentaria humana (carril 2), y GAA de testículo bovino (carril 3).

[018] La Fig. 3A muestra una alineación de GAA humana desde los aminoácidos 197 a 206 con GAAs de ratón, hámster, bovina, y de codorniz. La Fig. 3B muestra los resultados de una transferencia de Western que compara diferentes GAAs procesadas. El carril 1 muestra la GAA humana purificada de placenta. Los carriles 2 y 3 son GAAs de control purificadas de 10 células 293T transfectadas con construcciones de GAA humana de tipo natural. Los carriles 4-7 son GAAs modificadas purificadas de células 293T transfectadas con construcciones de GAA humana en las que la histidina del aminoácido 201 se cambió a los aminoácidos siguientes: arginina (carril 4), leucina (carril 5), tirosina (carril 6), y lisina (carril 7).

15 [019] La Fig. 4 muestra la biosíntesis de rhGAA(H201L) y rhGAA (WT) en células CHO transfectadas de manera estable.

[020] La Fig. 5 muestra la absorción de fibroblastos de Pompe y el procesamiento de rhGAA (WT) y rhGAA (H201L).

[021] La Fig. 6 muestra los resultados de transferencias de Western analizadas con anticuerpo monoclonal anti-GAA 183-200 (Fig. 6A) y GAA1 (Fig. 6B).

20 [022] La Fig. 7 es un esquema de un modelo de procesamiento para rhGAA(H201L).

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

[023] Para ayudar a entender la presente descripción, primero se definen ciertos términos. Se proporcionan definiciones adicionales a lo largo de la solicitud.

[024] Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sitio de procesamiento de 25 70 kDa N-terminal" se refiere al sitio de reconocimiento para la(s) enzima(s) proteolítica(s) que

escinden GAA en la posición que corresponde a los aminoácidos 200 a 204 de SEQ ID Nº: 1 (GAA humana nativa).

[025] Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "GAA modificada" se refiere a GAA humana y las variantes de GAA que tienen al menos un aminoácido en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal que difiere del aminoácido hallado en la GAA humana nativa. La GAA modificada también se denomina en la descripción "GAA humana modificada". La expresión "GAA modificada" incluye los polipéptidos de GAA de longitud completa que contienen secuencias señal, así como los polipéptidos de GAA parcialmente procesados tal como se secretan de las células.

[026] Tal como se usan en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a un método que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. El término "o" se emplea en general en el sentido que incluye "y/o", a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

[027] A lo largo de la memoria descriptiva, los tamaños de las proteínas y polipéptidos se proporcionan en unidades de "kDa". Un experto en la técnica reconocerá que estos tamaños se basan en el peso molecular aparente de los polipéptidos en ensayos de electroforesis tales como SDS-PAGE (véase, p.ej., Moreland et al., 2005). Los pesos moleculares exactos dependerán del estado de glicosilación y otros parámetros tales como la asociación con otros polipéptidos, y se pueden determinar mediante diversos métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica.

[028] Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente incorporadas como referencia contradigan la invención contenida en la memoria descriptiva, la memoria descriptiva reemplazará cualquier material contradictorio.

I. Alfa-glucosidasa ácida (GAA)

[029] Como se describió anteriormente, la GAA es una enzima lisosómica implicada en la eliminación del glucógeno. El término GAA abarca tanto las formas de longitud completa como las de tipo natural de la proteína, así como otras variantes catalíticamente activas. La GAA catalíticamente activa y las variantes de GAA conservarán al menos la actividad catalítica hacia el glucógeno. Los expertos en la técnica conocen numerosas variantes de GAA humana nativa, que incluyen las que se han truncado, fusionado o conjugado con otros polipéptidos, alterado sus secuencias de aminoácidos, o alterado de manera recombinante o químicamente. Por ejemplo, se sabe que se pueden eliminar al menos 77 aminoácidos N-terminales de GAA humana nativa (SEQ ID N°: 1) sin que pierda actividad. Moreland et al., 2005. Además, se han descrito conjugados y proteínas de fusión. En ciertas realizaciones, una GAA o fragmento catalíticamente activo de GAA se puede conjugar o fusionar a una secuencia de selección del receptor. En ciertos casos, la secuencia de selección del receptor puede ser reconocida por un receptor celular. Por ejemplo, una GAA truncada se puede fusionar a un dominio IGF2 como se describió en la Patente de EE.UU. 7.785.856, que se incorpora como referencia en su totalidad. GAA también se ha alterado para añadir restos sintéticos, restos de carbohidratos y/o niveles incrementados de manosa-6-fosfato. Por ejemplo, se describen enzimas lisosómicas con restos de carbohidratos modificados que contienen niveles incrementados de manosa-6-fosfato en la Patente de EE.UU. 7.001.994; 7.723.296; 7.786.277; la Publicación de Patente de EE.UU. 2010/0173385; y la Publicación PCT 2010/075010, que se incorporan como referencia en su totalidad.

[030] En ciertas realizaciones, las GAAs descritas en la presente memoria tienen al menos un 80%, 90%, 95%, o 99% de identidad respecto de una GAA humana o una variante de GAA. En ciertos casos, la GAA tiene al menos un 80%, 90%, 95%, o 99% de identidad respecto de al menos 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, o 900 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

[031] Se puede usar cualquiera de las GAAs humanas catalíticamente activas descritas en esta sección como secuencia base para una GAA modificada descrita en la presente memoria. Un experto en la técnica reconocerá qué variantes de GAA son adecuadas para el uso en la invención. Cuando una secuencia base de GAA tiene una longitud o un patrón de glicosilación diferentes en comparación con la GAA humana nativa, los polipéptidos procesados tendrán tamaños que varían en consecuencia.

II. GAA Modificada

[032] En diversas realizaciones, se proporciona un polipéptido que comprende una GAA humana modificada que está modificado en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. La región "cerca" del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal incluye hasta 5 aminoácidos antes o después del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En ciertas realizaciones, la región en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal incluye los aminoácidos que corresponden a las posiciones 195-209 de SEQ ID N°: 1.

[033] Las GAAs modificadas descritas en la presente memoria se procesan más rápidamente que la GAA sin modificar. En ciertas realizaciones, la GAA modificada tiene una hidrofobicidad incrementada en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En ciertas realizaciones, la GAA modificada tiene una velocidad más rápida de procesamiento proteolítico respecto de una forma madura de 70 kDa. En ciertas realizaciones, y dependiendo de la secuencia de inicio, la GAA modificada se procesa hasta una variante de la forma madura de 70 kDa. La GAA modificada se puede procesar de forma que el polipéptido maduro permanece asociado con fragmentos polipeptídicos adicionales. En ciertas realizaciones, la GAA modificada se procesa por medio de la misma ruta que la GAA sin modificar. En otras realizaciones, la GAA modificada se procesa por medio de intermedios diferentes en comparación con una GAA sin modificar. Por ejemplo, una GAA de longitud completa modificada se puede procesar por medio de intermedios de 76 kDa o 82 kDa, o ambos. La GAA

modificada puede ser reconocida por las mismas proteasas que una GAA sin modificar, y puede ser procesada en el mismo orden o en un orden diferente.

[034] En ciertas realizaciones, la GAA se modifica para incrementar su hidrofobicidad en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal sustituyendo al menos un aminoácido con un aminoácido más hidrófobo. En ciertas realizaciones, la sustitución se puede hacer dentro de los 5 aminoácidos antes o después del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En ciertos ejemplos, la sustitución de aminoácidos se puede hacer en un aminoácido que corresponde a la posición 195 a 209 de SEQ ID N°: 1. En otros casos, la sustitución de aminoácidos se puede hacer en un aminoácido que corresponde a la posición 200 a 204 de SEQ ID N°: 1. En realizaciones adicionales, la GAA humana modificada contiene un aminoácido hidrófobo en la posición que corresponde a la posición del aminoácido 201 de SEQ ID N°: 1. En ciertas realizaciones, la GAA se modifica insertando uno o más aminoácidos hidrófobos en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. Las modificaciones adicionales incluyen la delección de uno o más aminoácidos en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.

[035] En ciertas realizaciones, se proporciona una GAA humana modificada que contiene un aminoácido hidrófobo (natural o sintético) en más de una posición en el sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal, o dentro de 5 aminoácidos del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal. En una realización, uno de los aminoácidos modificados está en la posición que corresponde al aminoácido 201 de SEQ ID N°: 1.

[036] En diversas realizaciones, el aminoácido hidrófobo se elige de valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina, cisteína o alanina. En realizaciones adicionales, el aminoácido hidrófobo es leucina o tirosina. En ciertas realizaciones, la GAA humana modificada contiene un aminoácido sintético o no natural que exhibe propiedades hidrófobas. En general, el aminoácido sustituido es más hidrófobo que el aminoácido de tipo

natural, y así incrementa la hidrofobicidad en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.

[037] En una realización ejemplar, la GAA modificada tiene una leucina en la posición que corresponde al aminoácido 201 de SEQ ID N°: 1. En otra realización, la GAA modificada
5 tiene una tirosina en la posición que corresponde al aminoácido 201 de SEQ ID N°: 1.

[038] En ciertas realizaciones, se proporcionan GAAs humanas modificadas que tienen al menos un 80%, 90%, 95%, o 99% de homología respecto de al menos 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, o 900 aminoácidos de SEQ ID N°: 1, y en la que la GAA humana modificada tiene al menos un aminoácido en el sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal sustituido con
10 un aminoácido más hidrófobo.

[039] En ciertas realizaciones, al menos un 50% de la GAA humana modificada se procesa hasta una forma de 70 kDa en el lisosoma en 20, 30, o 40 horas. En realizaciones adicionales, sustancialmente toda la GAA humana modificada se procesa hasta una forma de 70 kDa en el lisosoma en 55, 65, o 75 horas.

[040] En ciertas realizaciones, se puede identificar una GAA humana modificada de la invención por su procesamiento proteolítico más rápido hasta una forma de 70 kDa madura, o una variante correspondiente de la misma. En otras realizaciones, se puede identificar una GAA humana modificada como se describe en la presente memoria por la producción de un polipéptido intermedio de 82 kDa que no se produce durante el procesamiento proteolítico de la
20 GAA humana nativa. En realizaciones adicionales, se puede identificar una GAA humana modificada por la ausencia de un polipéptido intermedio de 76 kDa que se produce durante el procesamiento proteolítico de la GAA humana sin modificar.

III. Producción de GAA Modificada

[041] En diversas realizaciones, se puede producir un polipéptido de GAA modificada
25 según métodos conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de GAA

modificada se puede expresar y secretar a partir de líneas celulares transfectadas de manera estable con ácidos nucleicos que codifican una GAA modificada. Las líneas celulares adecuadas incluyen fibroblastos, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293T, o células vegetales, entre otras reconocidas por los expertos en la técnica. Las líneas celulares ejemplares y los métodos de producción se describen en las Patentes de EE.UU. N°s. 7.351.410 y 7.138.262; y en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2010/0196345, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, se inserta un ácido nucleico que codifica una GAA modificada en un plásmido o vector que contiene los promotores y las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión a partir de una línea celular. Los promotores útiles para producir GAA modificada en líneas celulares de mamífero incluyen los promotores de rpS21 y beta-actina (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 7.423.135), entre muchos otros reconocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la GAA modificada se altera adicionalmente para incrementar o disminuir los niveles de glicosilación o de manosa 6-fosfato, por lo que se aumenta la secreción y/o transporte selectivo lisosómico.

IV. Composiciones Farmacéuticas

[042] En ciertas realizaciones, la GAA modificada está presente en una composición farmacéutica que comprende al menos un aditivo tal como un relleno, agente de carga, disgregante, tampón, estabilizante, o excipiente. Las técnicas de formulación farmacéutica habituales son muy conocidas para las personas expertas en la técnica (véase, p.ej., 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000). Los aditivos farmacéuticos adecuados incluyen, p.ej., manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada deshidratada, glicerol,

propileno, glicol, agua, etanol, y similares. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden contener también reactivos de tamponamiento del pH y agentes humectantes o emulsionantes. En realizaciones adicionales, las composiciones pueden contener conservantes o estabilizantes.

5 [043] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden la GAA humana modificada pueden comprender además uno o más de lo siguiente: manitol, polisorbato 80, fosfato sódico dibásico heptahidrato, y fosfato sódico monobásico monohidrato. En otra realización, las composiciones farmacéuticas pueden contener Histidina 10 mM de pH 6,5 con hasta un 2% de glicina, hasta un 2% de manitol, y hasta un 0,01% de polisorbato 80. Se
10 pueden hallar composiciones farmacéuticas ejemplares adicionales en la Publicación PCT Nº 2010/075010.

 [044] La formulación de composiciones farmacéuticas pueden variar dependiendo de la vía de administración deseada y de otros parámetros (véase, p.ej., Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª ed., APhA Publications, 2003.) En ciertas realizaciones, la
15 composición de GAA modificada puede ser una masa o polvo liofilizado. La composición liofilizada se puede reconstituir para la administración mediante inyección intravenosa, por ejemplo con Agua Estéril para Inyección, USP. En otras realizaciones, la composición puede ser una disolución estéril, apirógena.

 [045] Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden
20 comprender GAA modificada como el único compuesto activo, o se pueden administrar en combinación con otro compuesto, composición, o material biológico. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender también una o más moléculas pequeñas útiles para el tratamiento de la enfermedad de Pompe y/o un efecto secundario asociado a la enfermedad de Pompe o su tratamiento. En ciertas realizaciones, la composición puede
25 comprender miglustat y/o uno o más compuestos descritos, p.ej., en las Publicaciones de

Solicitud de Patente de EE.UU. N°s. 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; o 2005/0267094. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender también uno o más inmunosupresores, inhibidores de mTOR o inhibidores de la autofagia. Los ejemplos de inmunosupresores incluyen rapamicina y velcade. La rapamicina es también un
5 inhibidor de mTOR.

V. Métodos Terapéuticos

[046] En ciertas realizaciones, se usa una GAA humana modificada para reducir o prevenir la acumulación de glucógeno en un tejido de un paciente. En otras realizaciones, la GAA humana modificada se usa para tratar una glucogenosis. En realizaciones adicionales, la
10 glucogenosis es la enfermedad de Pompe. En las realizaciones ejemplares, la GAA modificada se procesa posteriormente hasta GAA madura en el lisosoma tras la administración al paciente.

[047] La GAA modificada descrita en la presente memoria se puede administrar mediante cualquier sistema de administración adecuado y puede incluir, sin limitación, la administración parenteral (que incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intracraneal,
15 intramedular, intraarticular, intramuscular, intratecal, o intraperitoneal), transdérmica, u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones, o comprimidos). En una realización, la GAA modificada se administra mediante administración intravenosa.

[048] En realizaciones adicionales, se puede administrar un ácido nucleico que codifica una GAA modificada al paciente. El ácido nucleico se puede administrar mediante el uso de un
20 vector adecuado para la terapia génica. Los ejemplos de métodos de terapia génica se describen, p.ej., en las Patentes de EE.UU. N°s 5.952.516; 6.066.626; 6.071.890; y 6.287.857.

[049] La administración a un paciente puede darse en una única dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una diversidad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte
25 de una composición farmacéutica.

[050] Las composiciones de GAA modificada descritas en la presente memoria se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad del sujeto, el estado general, y el sexo, así como la gravedad de la afección médica en el sujeto. Un médico puede determinar la dosis y

5 ajustarla, según sea necesario, para adecuarla a los efectos observados del tratamiento.

[051] Las GAAs modificadas descritas en la presente memoria se pueden administrar mediante infusión intravenosa en el ámbito de los pacientes ambulatorios, p.ej., cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más días, o, p.ej., mediante la administración semanal, bisemanal, mensual, o bimensual. La dosis terapéuticamente eficaz adecuada de un compuesto es seleccionada por el

10 médico que aplica el tratamiento, y puede oscilar de aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg y de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis terapéutica adecuada se elige, p.ej., de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, y 100 mg/kg. Además, se

15 pueden hallar ejemplos de dosis específicas en el Physicians' Desk Reference®.

[052] En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la administración de GAA humana modificada, por lo que se incrementa la eliminación de glucógeno en el sujeto, p.ej., en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%, respecto de la actividad endógena. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden

20 administrar una GAA humana modificada, por lo que se incrementa la eliminación de glucógeno en el sujeto, p.ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, o 1000 veces, respecto de la actividad endógena. La eliminación incrementada de glucógeno se puede determinar, p.ej., mediante una reducción de los síntomas clínicos o mediante un ensayo clínico o biológico adecuado, tal como un ensayo de almacenamiento de glucógeno en los lisosomas.

[053] En ciertas realizaciones, la eliminación incrementada de glucógeno tras el tratamiento de un paciente con una composición farmacéutica que comprende GAA humana modificada se puede determinar mediante la observación bioquímica (véase, p.ej., Zhu et al., J. Biol. Chem. 279: 50336-50341 (2004)) o histológica de la acumulación lisosómica reducida de glucógeno, p.ej., en miocitos cardiacos, miocitos esqueléticos, o fibroblastos cutáneos. La actividad de GAA se puede ensayar también, p.ej., en una muestra de biopsia muscular, en fibroblastos cutáneos cultivados, en linfocitos, y en muestras de sangre seca. Los ensayos con muestras de sangre seca se describen, p.ej., en Umpathysivam et al., Clin. Chem. 47:1378-1383 (2001) y Li et al., Clin. Chem. 50:1785-1796 (2004). El tratamiento de la enfermedad de Pompe se puede estudiar también, p.ej., mediante los niveles séricos de creatinina quinasa, mejoras en la función motora (p.ej., tal como se estudia mediante la Escala de Motricidad Infantil de Alberta), cambios en el índice de masa ventricular izquierda tal como se mide mediante ecocardiograma, y la actividad cardioeléctrica, tal como se mide mediante electrocardiograma. La administración de una composición farmacéutica que comprende GAA humana modificada también puede dar como resultado una reducción en uno o más síntomas de la enfermedad de Pompe tal como cardiomegalia, cardiomiopatía, somnolencia diurna, disnea de esfuerzo, retraso del crecimiento, dificultades de alimentación, "flacidez", anormalidades de la marcha, cefaleas, hipotonía, organomegalia (p.ej., agrandamiento del corazón, lengua, hígado), lordosis, pérdida del equilibrio, dolor lumbar, cefalea matutina, debilidad muscular, insuficiencia respiratoria, escápula alada, escoliosis, reflejos tendinosos profundos reducidos, apnea del sueño, susceptibilidad a las infecciones respiratorias, y vómitos.

[054] En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden la GAA humana modificada con una o más terapias adicionales. La una o más terapias adicionales se pueden administrar de manera concurrente (que incluye la administración concurrente en forma de una formulación

combinada), antes de, o después de la administración de la GAA humana modificada. En ciertos casos, se puede administrar una terapia adicional entre dosis de GAA modificada. Por ejemplo, se puede usar una terapia con moléculas pequeñas para frenar la reaccumulación de glucógeno, lo que permite dosis menos frecuentes de la GAA modificada.

- 5 [055] En ciertas realizaciones, los métodos comprenden tratar a un sujeto con un antipirético, antihistamínico, y/o inmunosupresor (antes de, después de, o durante el tratamiento con una GAA humana modificada descrita anteriormente). En ciertas realizaciones, se puede tratar a un sujeto con un antipirético, antihistamínico, y/o inmunosupresor antes del tratamiento con una GAA humana modificada para disminuir o prevenir las reacciones asociadas a la
- 10 infusión. Por ejemplo, se puede pretratar a los sujetos con uno o más de acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, difenhidramina, metotrexato, micofenolato de mofetilo, esteroides orales, o rapamicina.

- [056] En ciertas realizaciones, los métodos comprenden tratar a un sujeto (antes, después, o durante el tratamiento con una GAA humana modificada) con una terapia con
- 15 moléculas pequeñas y/o terapia génica, que incluye terapia con moléculas pequeñas y terapia génica dirigidas hacia el tratamiento de una glucogenosis. La terapia con moléculas pequeñas puede comprender la administración de miglustat y/o uno o más compuestos descritos, p.ej., en las Pub. de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; y 2005/0267094. La terapia génica se puede llevar a cabo como se describió, p.ej., en las
- 20 Patentes de EE.UU. N°s 5.952.516; 6.066.626; 6.071.890; y 6.287.857; y la Pub. de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0087868.

VI. Ejemplos

[057] Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar, y no para limitar, la presente descripción.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

A. Reactivos y materiales de ensayo

[058] Se obtuvo Concanavalina A, DEAE-Sepharose FF, y Superdex 200 de grado preparativo de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Se obtuvo α -metilglucósido, benzamidina, y α -D-glucósido de 4-metilumbeliferilo de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Otros productos químicos fueron de grado reactivo o mejores, y fueron de los proveedores habituales. Los geles de SDS-PAGE se obtuvieron de Invitrogen (San Diego, CA). Las botellas para agitación rotatoria se obtuvieron de Corning (Corning, NY). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el suero bovino fetal (FBS) se obtuvieron de JRH Biosciences (Lenexa, KS). Se obtuvieron fibroblastos de Pompe (GM00248) de Coriell Cell Repositories (Camden, NJ).

B. Actividad de α -glucosidasa Ácida y Ensayo de Proteínas

[059] La α -glucosidasa ácida se ensayó de manera fluorimétrica en una placa de microtitulación mediante el uso α -D-glucósido de 4-metilumbeliferilo como se describió previamente. Oude Elferink et al., Eur. J. Biochem. 139: 489-495 (1984). La concentración de proteínas se estimó mediante la absorbancia a 280 nm suponiendo E1% = 10 o mediante el uso del ensayo estandarizado Micro-BCA con albúmina de suero bovino. Smith et al., Anal. Biochem. 150: 76-85 (1985).

C. Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

[060] Se aplicaron muestras reducidas y sin reducir y marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech) a un gel de SDS-PAGE del 4-20% o 10% con Tris-Glicina. La electroforesis se llevó a cabo a 150 voltios durante 1,5 horas, y las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie o tinción de plata. Blum et al., Electrophoresis 93-99 (1987).

D. Aislamiento de GAA recombinante y placentaria

[061] La producción y purificación de GAA recombinante y placentaria humana fue como se describió previamente. Martiniuk et al., Archives of Biochem. and Biophys. 231: 454-460 (1984); Mutsaers et al., Biochimica et Biophysica Acta 911: 244-251 (1987); Moreland et al., (2005).

5 E. Anticuerpos y análisis de transferencia de Western

[062] Como se describió previamente (Moreland et al., 2005), se inmunizaron conejos con péptidos sintetizados acoplados a KLH. La secuencia para cada péptido fue la siguiente: anti-GAA 57-74 (QQGASRPGPRDAQAHPGR (SEQ ID Nº: 2)), anti-GAA 78-94 (VPTQCDVPPNSRFDCA (SEQ ID Nº: 3)), y anti-GAA 183-200 (IKDPANRRRYEVPLETPRV (SEQ ID Nº: 4)). Se generó un anticuerpo policlonal de cabra hacia GAA placentaria humana purificada. El anticuerpo monoclonal GAA1 se describió previamente. Moreland et al., 2005. Se llevaron a cabo transferencias de Western como se describió previamente. Moreland et al., 2005.

F. Absorción de rhGAA por los fibroblastos

15 [063] Para cada punto de tiempo, se incubaron aproximadamente 5×10^5 fibroblastos de Pompe en DMEM más 10% de FBS con 250 nM de rhGAA(WT) o rhGAA(H201L). A las 16 horas, las células se lavaron y se añadió medio fresco que no contenía GAA. En los puntos de tiempo designados, las células se retiraron y se lavaron 5 veces con solución salina tamponada con fosfato y se almacenaron a -80 °C. Después del punto de tiempo final, todos los sedimentos
20 celulares se descongelaron y se lisaron simultáneamente con un 0,25% de Triton. Los restos celulares se sedimentaron, y se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western con los sobrenadantes de cada punto de tiempo con anticuerpos anti-GAA.

G. Preparación de Construcciones de Expresión y Transfecciones Transitorias

[064] Se produjeron plásmidos de expresión para GAA recombinante con y sin
25 sustitución o deleciones de aminoácidos en pcDNA6 (Invitrogen), mediante el uso de los

procedimientos habituales. Se cultivaron células 293T de riñón humano en DMEM, complementado con un 10% de FBS bajo un 5% de CO₂ a 37 °C. Se mezclaron seis microgramos de cada plásmido con reactivo de transfección Eugene 6 (Roche) y se añadieron a 2,5 x 10⁶ células en una placa de 10 cm. Después de 72 h, las células adherentes se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con PBS que contenía un 0,25% de Triton. Los restos celulares se precipitaron mediante centrifugación, y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

H. Marcaje metabólico e Inmunoprecipitación

[065] Las líneas de células CHO estables que expresaban rhGAA(WT) o rhGAA(H201L) se crearon tras el método descrito previamente. Qiu et al., J. Biol. Chem. 278: 32744-32752 (2003). Se incubaron aproximadamente 5 x 10⁶ células en una placa de 10 cm en DMEM que carecía de metionina y cisteína durante 30 min. Las células se marcaron mediante pulsos durante 2 h con 150 µCi/ml (1175 Ci/mmol de Tran³⁵S-Label) en DMEM deficiente de metionina y cisteína. Después de lavar las células con DMEM dos veces y de tomar el punto de tiempo de 0 h, las células se incubaron en DMEM sin marcador a 37 °C. En cada punto de tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS. Las placas se almacenaron a -20 °C. Después del punto de tiempo final, las células se lisaron con PBS que contenía un 0,25% de Triton (PBST). Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y se añadieron 60 µl de una suspensión espesa del 50% de Concanavalina A-Sepharose al sobrenadante. Después de 2 hr de incubación, las microesferas se lavaron 3 veces con PBST. La GAA marcada se eluyó con PBS que contenía α-metilglucósido 0,5 M. La GAA presente en el eluyente se inmunoprecipitó después con anti-GAA de cabra purificado mediante afinidad acoplado a NHS-Sepharose. El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con PBST, y se añadieron 40 µl de tampón de muestras de SDS 2x que contenía β-mercaptoetanol a las microesferas. Las muestras se llevaron a ebullición antes del análisis de transferencia de Western.

I. Abreviaturas

[066] Tal como se usa en la presente memoria, "rhGAA" significa α -glucosidasa ácida humana recombinante. "CHO" significa ovario de hámster chino. "MSX" significa metionina sulfoximina. "ERT" significa terapia de sustitución enzimática.

5 [067] Tal como se usa en la presente memoria, "GAA (H201R)" significa una GAA modificada que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 201 de histidina a arginina. "GAA (H201L)" significa una GAA modificada que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 201 de histidina a leucina. "GAA (H201Y)" significa una GAA modificada que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 201 de histidina a tirosina. "GAA (H201K)" significa
10 una GAA modificada que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 201 de histidina a lisina.

Ejemplo 2: Comparación de GAA humana, bovina y de hámster

[068] Cuando se examinó mediante SDS-PAGE la GAA purificada de placenta, dos
bandas que correspondían a los polipéptidos de 76 y 70 kDa tuvieron una abundancia
15 aproximadamente igual (Fig. 2). De forma similar, la rhGAA sobreexpresada en células de ovario de hámster chino (CHO) y purificada a partir de lisados celulares ha mostrado previamente bandas de 76 y 70 kDa. Moreland et al., 2005. En contraste, la GAA de hámster purificada a partir de células CHO existe exclusivamente en forma de un polipéptido de 70 kDa.
Para determinar si el predominio de la forma de 70 kDa fue exclusivo del hámster, se purificó
20 GAA de testículo bovino y se caracterizó mediante SDS-PAGE teñida con plata reducida (4-20% de acrilamida), y también se demostró que contenía solamente el polipéptido de 70 kDa (Fig. 2).

Ejemplo 3: El aminoácido de la posición 201 de GAA afecta a la eficacia de la conversión de la forma de 76 a 70 kDa y determina el orden de las escisiones proteolíticas

[069] La alineación de las secuencias de GAA de mamífero en el sitio proteolítico entre los aminoácidos 197 y 206 (Fig. 3A) demuestra que las secuencias retenidas están muy conservadas, pero las secuencias cortadas exhiben cierta variación. La GAA humana contiene una histidina en la posición 201, mientras las GAA de hámster y bovina tienen los residuos hidrófobos leucina y tirosina, respectivamente. Para determinar si estas sustituciones de aminoácidos son responsables de las diferencias específicas de especie en el procesamiento, se construyeron plásmidos de expresión de GAA en los que se varió el aminoácido 201. La histidina se sustituyó con leucina (H201L), tirosina (H201Y), arginina (H201R) o lisina (H201K). Las células renales embrionarias humanas (293T) se transfectaron con cada construcción, seguido de análisis de transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal hacia GAA. El análisis de transferencia de Western de los lisados celulares indicó que cuando el aminoácido 201 de GAA se sustituyó con leucina o tirosina, la conversión de la forma de 76 a 70 kDa fue drásticamente más eficaz en comparación con la de tipo natural (Fig. 3B, carriles 2-7). La sustitución de aminoácidos hidrófobos pareció provocar la formación de un nuevo intermedio de ~82 kDa, tal como se indica mediante el asterisco (Fig. 3B). En el control con vector solamente (Fig. 3, carril 8), se cargó nueve veces más lisado celular para visualizar la GAA endógena en comparación con los lisados de las células 293T transfectadas de manera transitoria.

[070] Para caracterizar la velocidad de procesamiento de GAA de tipo natural en comparación con GAA(H201L), se llevó a cabo un experimento de pulso y seguimiento. Se radiomarcaron líneas de células CHO estables que expresaban cada GAA durante 2 horas con Tran35S y se siguieron durante los tiempos indicados con medios que no contenían marcador (Fig. 4). rhGAA se purificó a partir de lisados celulares mediante Con A seguido de inmunoprecipitación como se describió en el Ejemplo 1. El tiempo de 0 hr fue después del pulso

de 2 hr. En el punto de tiempo de 55 horas, GAA(H201L) se procesó completamente hasta la forma de 70 kDa, mientras muy poca cantidad de la GAA de tipo natural se procesó hasta la forma de 70 kDa después de 120 horas. Se observó una especie de 95 kDa en las células que expresaban la GAA de tipo natural, pero no estuvo presente en la H201L. La identidad del intermedio de 95 kDa se ha caracterizado previamente (Moreland et al., 2005) y se representa en la Figura 1.

[071] Para determinar si rhGAA(H201L) experimenta un procesamiento acelerado en los estudios de absorción, se purificó la forma secretada de rhGAA(H201L) y rhGAA(WT) a partir de líneas de células CHO recombinantes estables. Los estudios de absorción se llevaron a cabo en fibroblastos de Pompe porque son deficientes de GAA (Fig. 5). Como se describió en el Ejemplo 1, los fibroblastos de Pompe deficientes de GAA (GM00248) se incubaron con 250 nM de rhGAA (WT) y rhGAA (H201L). En los puntos de tiempo designados, los fibroblastos se recogieron y se congelaron a -80 °C. Una transferencia de Western de SDS-PAGE reducida (7,5% de acrilamida) de los lisados celulares se analizó con un anticuerpo monoclonal hacia GAA humana (cuyo epítipo desconocido se halla en los aminoácidos 204-782). Tras la absorción de GAA, las formas de 95 kDa y 76 kDa fueron destacadas para rhGAA(WT) y no se observaron para rhGAA(H201L) (Fig. 5, carriles 5-13). La diferencia de procesamiento fue acompañada de nuevo por la aparición de un intermedio de ~82 kDa con GAA(H201L).

[072] Para caracterizar el intermedio de ~82 kDa, una transferencia de Western que contenía rhGAA, GAA placentaria, y rhGAA(H201L) purificadas se analizó con un anticuerpo anti-GAA que reconoce los aminoácidos 183-200 (y así se une al fragmento de 10,4 kDa liberado de GAA completamente procesada) (Fig. 6A). La rhGAA, GAA placentaria, y rhGAA(H201L) madura se purificaron como se describió en el Ejemplo 1. La especie de 76 kDa de placenta todavía contuvo los aminoácidos 183-200, tal como se indica mediante la unión del anticuerpo. En contraste, el intermedio de 82 kDa no contuvo estos aminoácidos, tal como se

indica mediante la ausencia de unión del anticuerpo. Esto se debe a que la escisión del sitio de reconocimiento del anticuerpo ya había tenido lugar, tal como se demuestra mediante la banda de ~10 kDa en el carril 3. Un anticuerpo monoclonal distinto hacia GAA demostró la presencia del intermedio de 82 kDa en la muestra de rhGAA(H201L) (Fig. 6B).

5 [073] Se puede concluir que el intermedio de 82 kDa es el resultado de la proteólisis acelerada en el sitio de escisión entre los aminoácidos 200 a 204. La escisión tiene lugar antes de la escisión entre los aminoácidos 782 a 792. Como se muestra en la Fig. 6A, el polipéptido de 82 kDa no contiene el fragmento de ~10 kDa de los aminoácidos 122-200. Estos resultados sugieren una ruta de procesamiento alternativa para rhGAA(H201L) como se muestra en la Fig.

10 7. El procesamiento de tipo natural frente a GAA(H201L) se bifurca después del intermedio de 95 kDa. La GAA de tipo natural se escinde cerca del extremo carboxilo-terminal (entre los aminoácidos 781-792) para proporcionar el intermedio de 76 kDa, mientras GAA(H201L) se escinde entre los aminoácidos 200-204 para proporcionar el intermedio de 82 kDa. Ambas rutas dan como resultado finalmente una GAA de 70 kDa madura.

15 [074] Otras realizaciones de la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de las realizaciones descritas en la presente memoria. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente ejemplares.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un polipéptido que consiste en alfa-glucosidasa ácida humana o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
- 5 2. Un polipéptido que comprende una alfa-glucosidasa ácida humana o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la modificación es una hidrofobicidad incrementada en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
- 10 4. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la modificación es en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones 195-209 de SEQ ID Nº: 1.
5. El polipéptido de la reivindicación 4, en el que la modificación es en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones 200-204 de SEQ ID Nº: 1.
6. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que la modificación es en el aminoácido que
- 15 corresponde a la posición 201 de SEQ ID Nº: 1.
7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la modificación comprende
 - a) la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido más hidrófobo, o
 - b) la inserción de uno o más aminoácidos hidrófobos.
- 20 8. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el fragmento se elige de un fragmento de 70 kDa, 76 kDa, 82 kDa, 95 kDa, o cualquier otro fragmento catalíticamente activo de la alfa-glucosidasa ácida humana.
9. El polipéptido de la reivindicación 8, en el que el polipéptido comprende además una secuencia de selección del receptor.

10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que la secuencia de selección del receptor es IGF2.
11. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
- 5 12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que el polipéptido tiene al menos un 90% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
13. El polipéptido de la reivindicación 12, en el que el polipéptido tiene al menos un 95% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
14. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido modificado exhibe un
- 10 procesamiento más rápido con proteasas lisosómicas en comparación con la alfa-glucosidasa ácida humana sin modificar.
15. El polipéptido de la reivindicación 14, en el que al menos un 50% del polipéptido se procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa en 20 horas desde la administración.
16. El polipéptido de la reivindicación 15, en el que sustancialmente todo el polipéptido se
- 15 procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa en 55 horas desde la administración.
17. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido está conjugado a un oligosacárido que comprende al menos una manosa-6-fosfato.
18. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 20 19. Una célula hospedadora transfectada de manera estable con el ácido nucleico de la reivindicación 18.
20. La célula hospedadora de la reivindicación 19, en la que la célula hospedadora es capaz de secretar el polipéptido codificado por el ácido nucleico de la reivindicación 18.

21. Un método para reducir o prevenir la acumulación de glucógeno en un tejido, que comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 a un paciente que lo necesita.
22. El método de la reivindicación 21, en el que el paciente tiene una glucogenosis.
- 5 23. El método de la reivindicación 22, en el que la glucogenosis es la enfermedad de Pompe.
24. Un método para tratar una glucogenosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 a un paciente que lo necesita.
- 10 25. El método de la reivindicación 24, en el que la glucogenosis es la enfermedad de Pompe.
26. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para el uso en el tratamiento de una glucogenosis.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que el polipéptido está
- 15 liofilizado.
28. El uso de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la fabricación de un medicamento para reducir o prevenir la acumulación de glucógeno en un tejido.
29. El uso de la reivindicación 28, en el que la acumulación de glucógeno es debida a una
- 20 30. El uso de la reivindicación 29, en el que la glucogenosis es la enfermedad de Pompe.

RESUMEN

Se proporciona un polipéptido de alfa-glucosidasa ácida humana modificada, así como métodos para producir y usar la alfa-glucosidasa ácida humana modificada para tratar una glucogenosis.

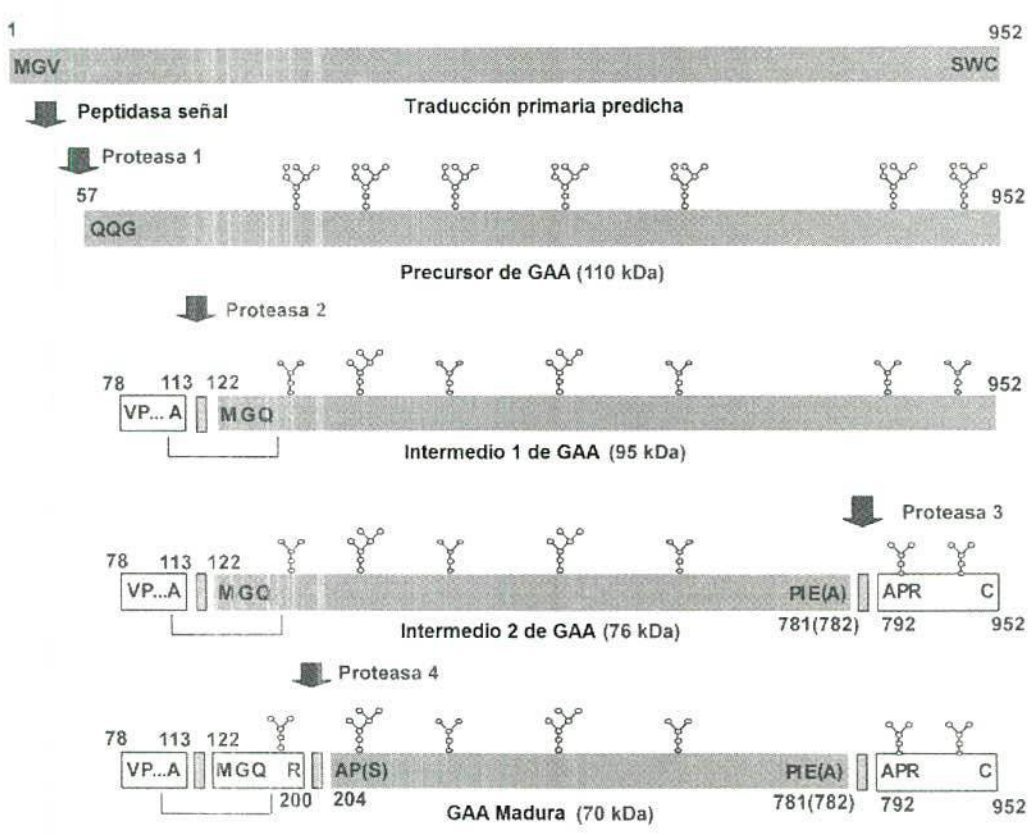


FIG. 1

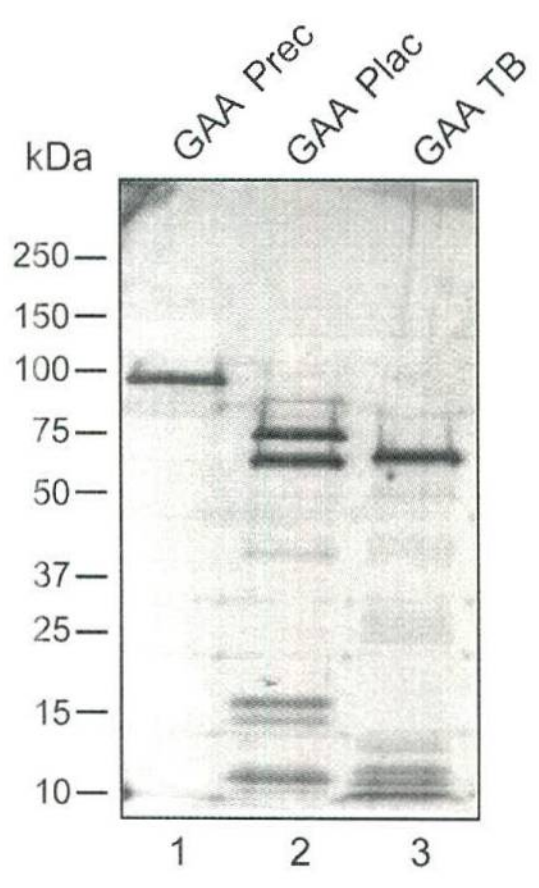


FIG. 2

A

		201	
	197		206
Humano	TPRVHSRAPS		
Ratón	TPRVLSQAPS		
Hámster	TPRVLSRAPS		
Bovino	TPRVYSQAPF		

B

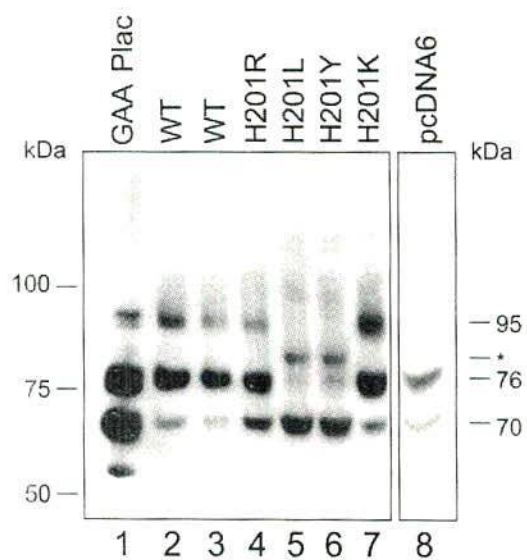


FIG. 3

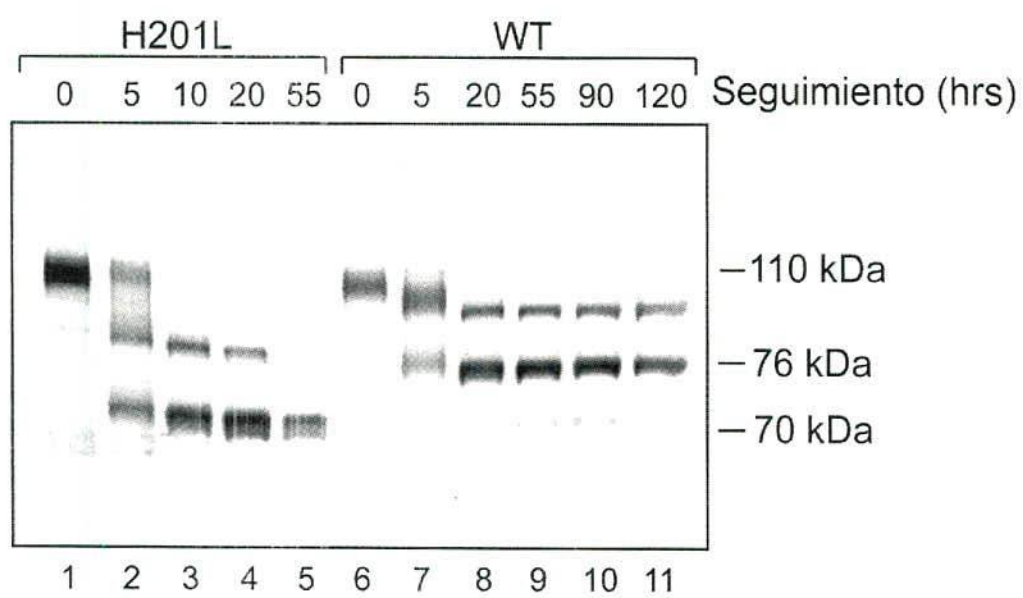


FIG. 4

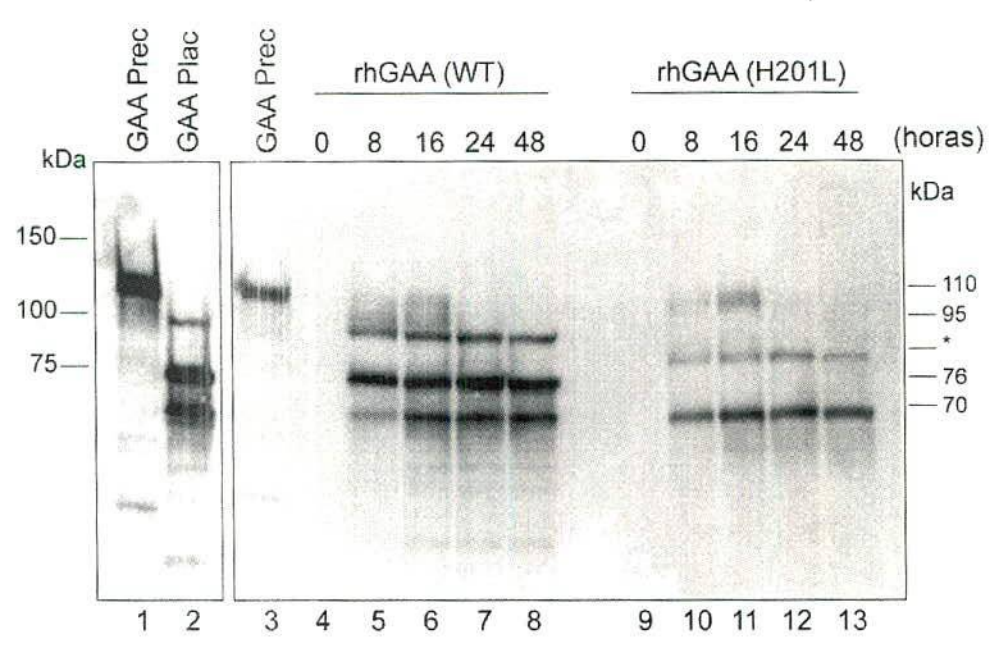


FIG. 5

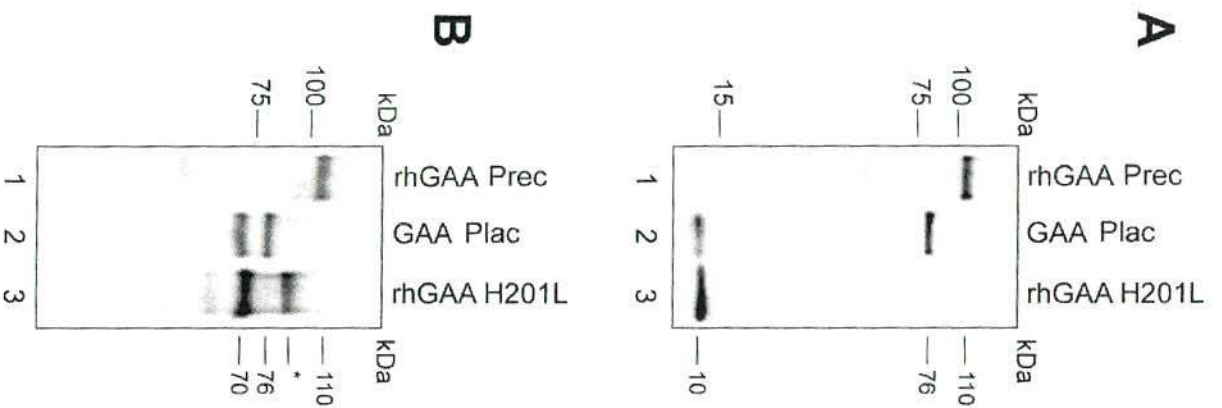
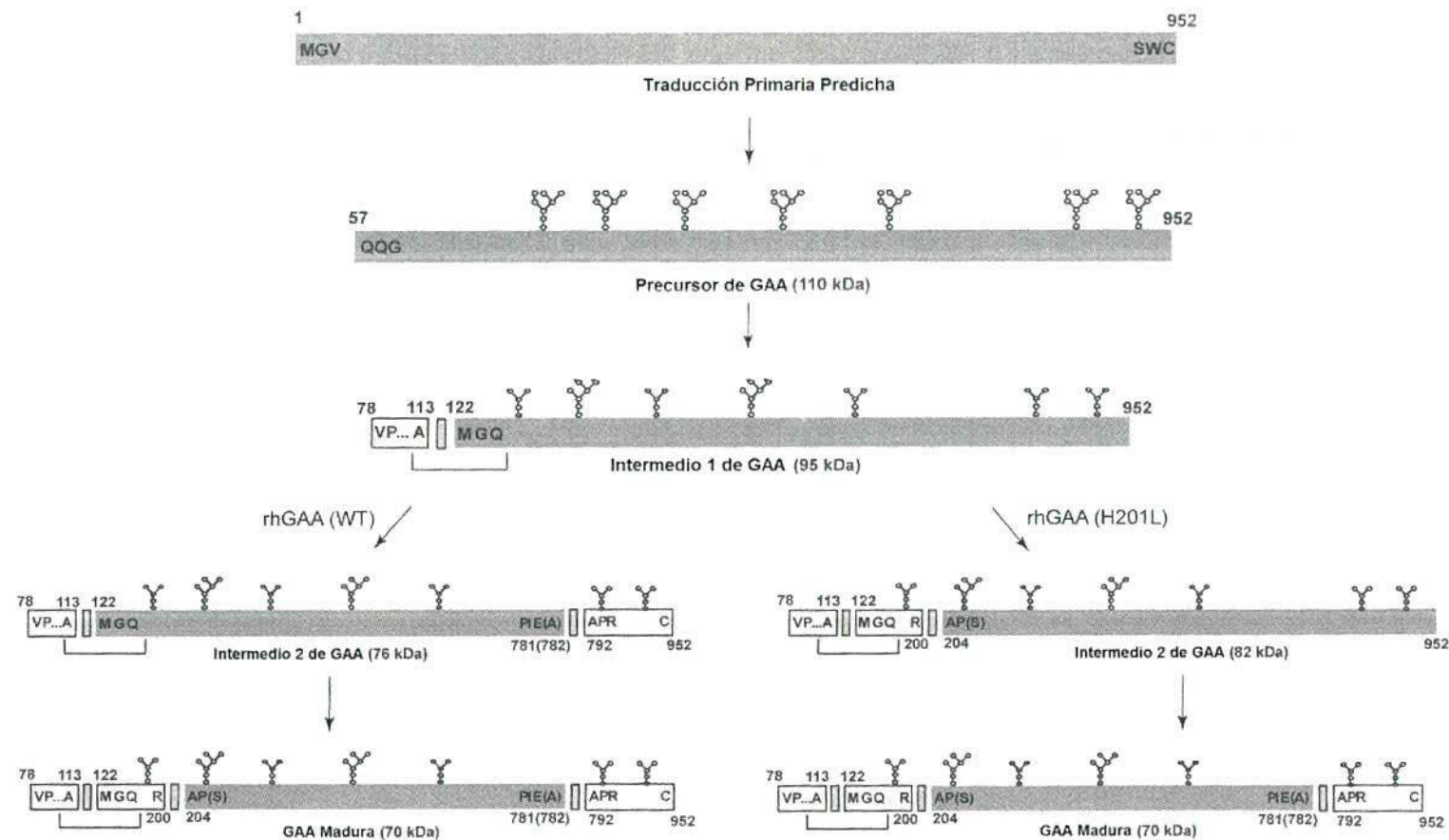


FIG. 6



LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES
SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION
<120> MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING
<130> 07680.0072-00304
<150> US61/478,336
<151> 2011-04-22
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 952
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175
 Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 180 185 190
 Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
 210 215 220
 Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240
 Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270
 Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380
 Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

900

905

910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr

915

920

925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly

930

935

940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

945

950

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro

1

5

10

15

Gly Arg

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala

1

5

10

15

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro

1

5

10

15

Arg Val

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL
LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENZYME CORPORATION
<120> ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO
<130> 07680.0072-00304
<150> US61/478,336
<151> 2011-04-22
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 952
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

900

905

910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Gly Arg

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala
1 5 10 15

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro
1 5 10 15

Arg Val

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

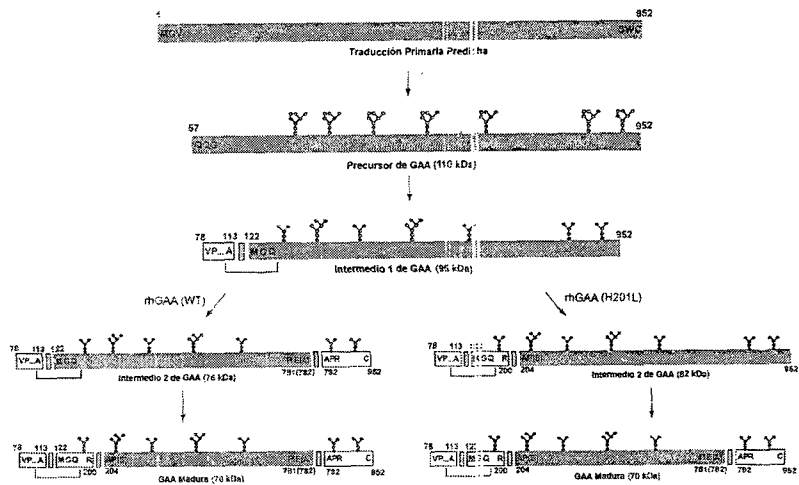


FIG.7

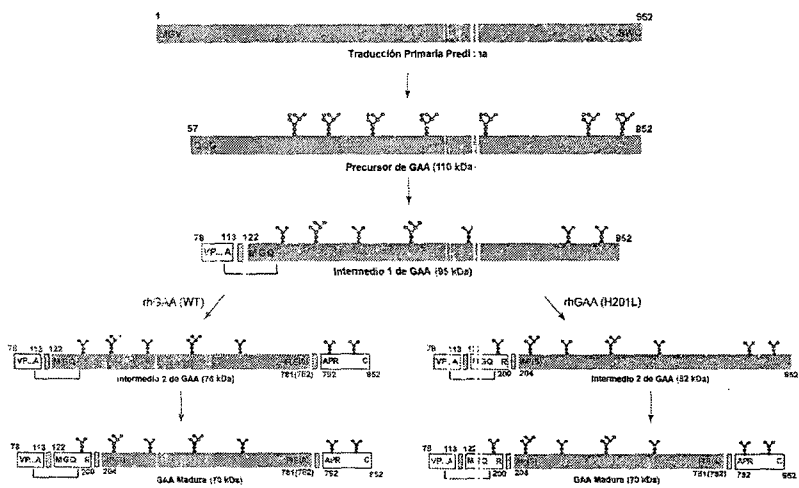


FIG.7

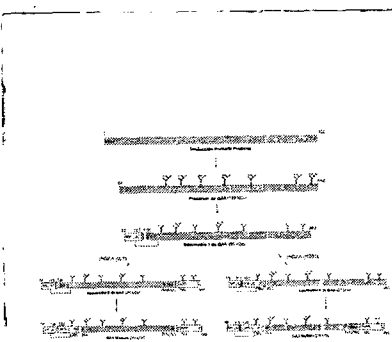


FIG. 7


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

 PATENTE DE INVENCION _____ PCT X MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) No. de solicitud (22) Fecha de solicitud

 (51) Clasificación internacional **C12N 9/24, A61K 38/47**

 (71) Solicitante (s) **GENZYME CORPORATION**

 (72) Inventor (es) **CANFIELD, WILLIAM, M.; MORELAND, RODNEY, J.; KUDO, MARIKO**

 (74) Apoderado **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30)	Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
			61/478,336		2011-04-22		US

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

 Fecha de presentación de la solicitud: **20/04/2012**

 No. de solicitud: **PCT/US2012/034479**

(87)

Publicación internacional

 Fecha: **26/10/2012**

 N° publicación: **WO2012/145644 A1**

 (54) Título: **ALFA GLUCOSIDASA ACIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO**

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ___ Patente de Invención ___ Patente modelo de utilidad <u> X </u> PCT
---	---

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) GENZYME CORPORATION
(30) Prioridad	(72) Interventor (es) CANFIELD, William, M. MORELAND, Rodney, J. KUDO, Mariko
(31) No. Prioridad 61/478.336	
(32) Fecha 22/04/2011	
(33) País US	(74) Apoderado (s) DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(54) Título ALFA GLUCOSIDASA ACIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 20/04/2012 No. de solicitud PCT/US2012/034479	(87) Publicación internacional Fecha 26/10/2012 No. Publicación WO2012/145644 A1

Resumen reivindicación (es):

- Un polipéptido que consiste en alfa-glucosidasa ácida humana o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
- Un polipéptido que comprende una alfa-glucosidasa ácida humana o un fragmento catalíticamente activo de la misma que tiene una modificación en o cerca de un sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
- El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la modificación es una hidrofobicidad incrementada en o cerca del sitio de procesamiento de 70 kDa N-terminal.
- El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la modificación es en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones 195-209 de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de la reivindicación 4, en el que la modificación es en uno o más aminoácidos que corresponden a las posiciones 200-204 de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de la reivindicación 5, en el que la modificación es en el aminoácido que corresponde a la posición 201 de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la modificación comprende
 - la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido más hidrófobo, o
 - la inserción de uno o más aminoácidos hidrófobos.
- El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el fragmento se elige de un fragmento de 70 kDa, 76 kDa, 82 kDa, 95 kDa, o cualquier otro fragmento catalíticamente activo de la alfa-glucosidasa ácida humana.
- El polipéptido de la reivindicación 8, en el que el polipéptido comprende además una secuencia de selección del receptor.
- El polipéptido de la reivindicación 9, en el que la secuencia de selección del receptor es IGF2.
- El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de la reivindicación 11, en el que el polipéptido tiene al menos un 90% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de la reivindicación 12, en el que el polipéptido tiene al menos un 95% de identidad respecto de al menos 500 aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
- El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido modificado exhibe un procesamiento más rápido con proteasas lisosómicas en comparación con la alfa-glucosidasa ácida humana sin modificar.
- El polipéptido de la reivindicación 14, en el que al menos un 50% del polipéptido se procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa en 20 horas desde la administración.
- El polipéptido de la reivindicación 15, en el que sustancialmente todo el polipéptido se procesa proteolíticamente hasta una forma de 70 kDa en 55 horas desde la administración.

...

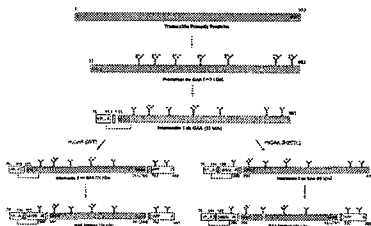
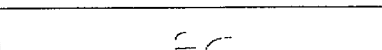


FIG. 7

	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia: 2020	Fecha: <u>13</u> / <u>11</u> / <u>20</u> AAAA MM DD	Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-272849	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

Observaciones:
El co Anexo Contiene un total de 2 Archivos.
2 Archivos en formatos pdf, los cuales fueron
procesados.

grilla



No. 13-272849- -00000-0000

Fecha: 2013-11-20 14:48:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

PATENTE DE INVENCION _____ MODELO DE UTILIDAD _____ Art 33 Decisión 486/00

Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa _____ Incompleta _____

PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD PCT _____ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

X Indicación que se solicita una PCT
X Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
X Dibujos de ser estos pertinentes
X Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa X Incompleta _____

DISEÑO INDUSTRIAL _____ (Art. 119 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita Diseño industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

ESQUEMA DE TRAZADO _____ (Art. 92 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita un esquema de trazado
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica de un esquema de trazado
Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL
LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENZYME CORPORATION
 <120> ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA MODIFICADA CON PROCESAMIENTO ACELERADO
 <130> 07680.0072-00304
 <150> US61/478,336
 <151> 2011-04-22
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 952
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
 20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
 50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
 85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
 100 105 110

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Gly 305	Ser	Ala	His	Gly	Val 310	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser 315	Asn	Ala	Met	Asp	Val 320
Val	Leu	Gln	Pro	Ser 325	Pro	Ala	Leu	Ser	Trp 330	Arg	Ser	Thr	Gly	Gly 335	Ile
Leu	Asp	Val	Tyr 340	Ile	Phe	Leu	Gly	Pro 345	Glu	Pro	Lys	Ser	Val 350	Val	Gln
Gln	Tyr	Leu 355	Asp	Val	Val	Gly	Tyr 360	Pro	Phe	Met	Pro	Pro 365	Tyr	Trp	Gly
Leu	Gly 370	Phe	His	Leu	Cys	Arg 375	Trp	Gly	Tyr	Ser	Ser 380	Thr	Ala	Ile	Thr
Arg 385	Gln	Val	Val	Glu	Asn 390	Met	Thr	Arg	Ala	His 395	Phe	Pro	Leu	Asp	Val 400
Gln	Trp	Asn	Asp	Leu 405	Asp	Tyr	Met	Asp	Ser 410	Arg	Arg	Asp	Phe	Thr 415	Phe
Asn	Lys	Asp	Gly 420	Phe	Arg	Asp	Phe	Pro 425	Ala	Met	Val	Gln	Glu 430	Leu	His
Gln	Gly	Gly 435	Arg	Arg	Tyr	Met	Met 440	Ile	Val	Asp	Pro	Ala 445	Ile	Ser	Ser
Ser	Gly 450	Pro	Ala	Gly	Ser	Tyr 455	Arg	Pro	Tyr	Asp	Glu 460	Gly	Leu	Arg	Arg
Gly 465	Val	Phe	Ile	Thr	Asn 470	Glu	Thr	Gly	Gln	Pro 475	Leu	Ile	Gly	Lys	Val 480
Trp	Pro	Gly	Ser	Thr 485	Ala	Phe	Pro	Asp	Phe 490	Thr	Asn	Pro	Thr	Ala 495	Leu

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Gly Arg

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala
1 5 10 15

<210> 4

LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Pro
1				5					10					15	

Arg Val

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES
SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION
 <120> MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING
 <130> 07680.0072-00304
 <150> US61/478,336
 <151> 2011-04-22
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 952
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
 20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
 50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
 85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
 100 105 110

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Glu	Pro	Ala	Gln	Gln	Ala	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Ala
690						695					700				
Leu	Leu	Pro	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Phe	His	Gln	Ala	His	Val	Ala	Gly
705					710					715					720
Glu	Thr	Val	Ala	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Lys	Asp	Ser	Ser
				725					730					735	
Thr	Trp	Thr	Val	Asp	His	Gln	Leu	Leu	Trp	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile
			740					745					750		
Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Phe	Pro
		755					760					765			
Leu	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asp	Leu	Gln	Thr	Val	Pro	Ile	Glu	Ala	Leu	Gly
	770					775					780				
Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	His	Ser
785					790					795					800
Glu	Gly	Gln	Trp	Val	Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Val
				805					810					815	
His	Leu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Leu	Gln	Gly	Pro	Gly	Leu	Thr
			820					825					830		
Thr	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Gln	Pro	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Thr
		835					840					845			
Lys	Gly	Gly	Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Gly	Glu	Ser
	850					855					860				
Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Arg	Gly	Ala	Tyr	Thr	Gln	Val	Ile	Phe	Leu	Ala
865					870					875					880

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Gly Arg

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala
1 5 10 15

<210> 4

LISTADO DE SECUENCIAS EN INGLES

<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Pro
1				5					10					15	

Arg Val