

Respuesta a Requerimientos

1	Datos del Solicitante / Titular				
Nombre:		SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.	Dirección Electrónica:	tobos@tobos.com.co	
Dirección:		128 Spring Street, Suite 520, Lexington, MA 02421, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - MASSACHUSETTS - LEXINGTON	
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT Número: 973197-					
2	Dato de la Creación				
Identificación de la Creación		No. de Certificado	Vigencia	No. de Expediente	Tipo Trámite
PROTEÍNA NAGLU HUMANA RECOMBINANTE Y USOS DE LA MISMA		000000		14098853	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
3	Texto de la Comunicación		Presento respuesta al examen del oficio 10622. También se adjuntan nuevas reivindicaciones y artículos que sustentan la respuesta.		

4	Anexos
☒ Anexos	

Doctor
JOSE LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director Nuevas Creaciones
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO -SIC-
E. S. D.

TOBOS ABOGADOS S.A.S.
Calle 151 No. 18A-34
Oficina 409 Bogotá D.C.
C.P. 110131166 - Colombia
NIT 900.367.556-3
Tel +57 1 812 3335
Cel +57 320 334 0887
Fax +57 1 812 3335
<http://www.tobos.com.co>
tobos@tobos.com.co

Referencia: Solicitud de patente de invención No. 14-98853
Solicitante: Synageva Biopharma Corp.
Título del Invento: Proteína NaGlu humana recombinante y usos de la misma (Antiguo título)
Proteína NaGlu humana recombinante (Nuevo título)

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 37 OFICIO NO. 10622

ANDREA TOBOS MATEUS, mayor de edad y vecina de Bogotá D.C., identificada como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderada de la sociedad Synageva Biopharma Corp., domiciliada en Lexington, Massachusetts, Estados Unidos de América, respetuosamente me dirijo a usted con el fin de dar respuesta al examen de fondo dentro del término de plazo.

1. EXCEPCIÓN A LA PATENTABILIDAD

- 1.1. El Examinador considera que el objeto de las reivindicaciones 15 a 17 y 19 no es patentable por cuanto hace referencia a un método de tratamiento de una enfermedad.
- 1.2. En respuesta a esta observación, la solicitante ha eliminado la frase “que tiene deficiencia de NaGlu” de las reivindicaciones 15 a 17 y 19.

2. TÍTULO

- 2.1. El Examinador observa que el título de la invención contiene la palabra "usos" y dado que los usos no son patentables en Colombia, sugiere a la solicitante hacer la corrección necesaria.
- 2.2. En respuesta a la observación del Examinador, se elimina la referencia a los usos del título.

3. REIVINDICACIONES

- 3.1. Reivindicaciones 1, 7 a 11

3.1.1. El Examinador establece que dichas reivindicaciones no son claras porque definen una composición que comprende una mezcla aislada de N - acetil - α - D - glucosaminidasa recombinante (rhNaGlu), en términos de su resultado alcanzar que da cuenta de su mecanismo de acción. El Examinador considera que la inclusión de estas frases hace que dichas reivindicaciones incluyan no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

3.1.2. En respuesta a esta observación, la solicitante ha modificado la reivindicación 1 para señalar claramente la característica técnica de la composición que comprende una mezcla aislada de rhNaGlu en términos de su estructura y función. Específicamente, la reivindicación 1 incluye la cantidad de M6P por mol de proteína que resulta en el efecto técnico deseado de restauración del 50% de la actividad enzimática de NaGlu como se ha observado en una célula de tipo natural del mismo tipo por endocitosis mediada por el receptor de M6P.

Las reivindicaciones 7 a 9 se mantienen como fueron solicitadas, dado que al ser éstas dependientes de la reivindicación 1, la modificación antes descrita de la reivindicación 1 tiene efecto en estas reivindicaciones.

Las reivindicaciones 10 y 11 han sido eliminadas de la solicitud.

3.2. Reivindicación 4

3.2.1. El Examinador considera que esta reivindicación no es clara por que menciona que la rhNaGlu comprende N - acetilflucosamina (GlcNAc), la cual hace referencia a una molécula de azúcar no existente.

3.2.2. Se agradece la observación del Examinador, y en consecuencia se corrige en esta reivindicación que la molécula de azúcar divulgada es N-acetilglucosamina (GlcNAc).

3.3. Reivindicación 10

3.3.1. El Examinador considera que esta reivindicación no es clara porque hace referencia a la producción de rhNaGlu, y no se define dicho proceso a partir de una secuencia lógica de etapas que permitan llegar a la obtención de la proteína recombinante. Adicionalmente, se menciona que rhNaGlu es producida de una célula de oviducto, de la cual no es claro si hace referencia a una célula transgénica. Se sugiere a la solicitante modificar la redacción de la reivindicación mencionada especificando la línea celular a ser transformada, su origen y tipo de célula.

3.3.2. Para atender a la observación del Examinador, la solicitante ha decidido eliminar la reivindicación 10 de la solicitud.

3.4. Reivindicaciones 1 y 11

3.4.1. El Examinador considera que las reivindicaciones 1 y 11 no son claras porque definen una composición que comprende una mezcla aislada de N - acetil - α - D - glucosaminidasa (rhNaGlu), en términos de que esta contiene una o más estructuras de glucano, lo cual corresponde a una definición muy general de este tipo de carbohidratos, que dificulta entender el alcance de la reivindicación y su diferenciación con el estado de la técnica.

Adicionalmente, el Examinador explica que estas reivindicaciones 1 y 11 no son concisas porque reclaman de forma repetitiva una composición que comprende la proteína N - acetil - α - D - glucosaminidasa (rhNaGlu), en más de una reivindicación independiente. El Examinador recuerda a la solicitante que por categoría inventiva de producto sólo puede haber una reivindicación independiente y las demás, si son verdaderas modalidades, deben presentarse en la forma de reivindicaciones dependientes.

3.4.2. En respuesta a las observaciones del Examinador, la solicitante desiste de la reivindicación 11. En cuanto a la reivindicación 1, la solicitante considera que los cambios ya efectuados en la reivindicación 1 resuelven la observación anteriormente descrita.

3.5. Reivindicaciones 2 a 6, 12 a 14

3.5.1. El Examinador objeta las anteriores reivindicaciones argumentando que no son claras porque no definen el patrón de glicosilación específico o proporción molar, en el cual los monosacáridos manosa - 6- fosfato (M6P), N - acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y N - acetilgalactosamina (GalNAc) se adicionan a la proteína NaGlu, y cuál de estas moléculas es glicosilada enlazada a N u O. El Examinador recuerda a la solicitante que es indispensable definir el patrón de glicosilación, debido a su importancia en la respuesta del sistema inmune.

3.5.2. El solicitante explica que para atender la observación del Examinador se incluyó la información contenida en la reivindicación 2 dentro de la reivindicación 1 y de esta manera, se elimina la reivindicación 2 de la solicitud. Entonces, la reivindicación 1 ahora incluye la relación molar de manosa-6-fosfato (M6P) a la proteína rhNaGlu.

Dado que las reivindicaciones 12 a 14 dependen ahora de la reivindicación 1, entonces la modificación antes descrita de la reivindicación 1 tiene efecto en estas reivindicaciones.

3.6. Reivindicaciones 1, 2, 11 y 14

3.6.1. El Examinador objeta las anteriores reivindicaciones argumentando que los términos "*mezcla aislada*", "*cantidad suficiente*", "*una o más*", "*al menos*" y "*aproximadamente*" son imprecisos y no limitativos, por lo cual no permiten distinguir la invención del estado de la técnica. El Examinador sugiere sustituirlos por un término o rango concreto.

3.6.2. Las reivindicaciones 2 y 11 han sido eliminadas de la solicitud. En cuanto a los términos “*cantidad suficiente*”; “*una o más*”; “*al menos*” y “*aproximadamente*” fueron eliminados de las reivindicaciones.

Sin embargo, en cuanto a al término “*mezcla aislada*”, la solicitante insiste en el uso de dicho término por cuanto la reivindicación 1 es completamente clara para una persona experta en la materia. Como se describió y ejemplificó en la solicitud, la solicitante ha desarrollado una NaGlu humana recombinante la cual es glicosilada de una manera que permite que la proteína sea absorbida eficientemente en las células y cruce la barrera hematoencefálica. Es bien entendido por el experto en la materia que hay algún grado de heterogeneidad en la glicosilación de proteínas recombinantes. Por tanto, una persona con conocimientos promedios en la materia entendería que las reivindicaciones, las cuales están dirigidas a una composición que incluye una mezcla aislada de proteínas con la secuencia de aminoácidos de los residuos 24-743 de SEQ ID NO: 1, no requiere que todas y cada una de las moléculas de proteína sean idénticas y contengan exactamente las mismas estructuras de glicano. En lugar de esto, la mezcla reivindicada permite la presencia de cierta heterogeneidad en la estructura de glicano.

3.7. La solicitante aprovecha esta oportunidad para incluir en las reivindicaciones una nueva reivindicación 17 que tiene sustento en la descripción originalmente presentada en la página 50, línea 24; página 51 líneas 1 a 21 y las páginas 148 y 149 en el ejemplo 3.

3.8. Se afirma que las modificaciones introducidas no constituyen adición de materia con respecto a lo divulgado en la solicitud original.

Para atender estas modificaciones se presenta junto con este escrito un juego de reivindicaciones modificado que consta de 17 reivindicaciones y que reemplaza a las reivindicaciones originalmente presentadas el 23 de enero de 2015, en donde se incorporan los cambios anteriormente señalados. Para facilitar la revisión, también se aporta una copia de trabajo en la que se muestran las modificaciones introducidas (el texto añadido aparece subrayado y el texto eliminado aparece tachado).

Dado que con el escrito radicado el día 13 de mayo de 2014 se presentó el pago por 20 reivindicaciones adicionales, entonces como en esta oportunidad se está disminuyendo el número de reivindicaciones a 17, entonces no se debe hacer pago por reivindicaciones adicionales.

4. DESCRIPCIÓN

4.1. El Examinador considera que dado que la solicitud se refiere a una rhNaGlu obtenida a partir de un huevo de un ave transgénica que expresa dicha proteína en células del oviducto, que se secretan en el lumen y se depositan en la clara del huevo, es necesario presentar el Certificado de Depósito para la línea celular de células del oviducto.

4.2. En respuesta a esta observación, la solicitante aclara que dado que las reivindicaciones que ahora se presentan no están dirigidas a material biológico; en consecuencia, no es necesario presentar dicho certificado de depósito de material biológico.

5. EXAMEN DE PATENTABILIDAD - NOVEDAD

5.1. El Examinador objeta la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 7 a 11, 14 y 18 de la presente solicitud debido a las divulgaciones contenidas en el documento:

D1: WO2009/131698 “Phosphorylated Recombinant N-Acetyl-alpha-D-Glucosaminidase (NaGlu) and uses thereof” de fecha 29 de octubre de 2009.

El Examinador presenta el siguiente cuadro comparativo:

Características esenciales	D1
Composición que comprende una mezcla aislada de N - acetil - α - glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante	Composición que comprende una proteína de fusión aislada recombinante que contiene N - acetil - alfa - glucosaminidasa (rhNaGlu) (Página 21, Rv. 19).
Comprende la secuencia de aminoácidos se expone en 24 a 743 de SEQ ID NO: 1	Proteína NaGlu comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 (Página 20, Rv. 12 - Fig. 3B).
Comprende manosa - 6 - fosfato (M6P)	Proteína de fusión fosforilada con manosa - 6 - fosfato (Página 21, Rv. 19).

El Examinador considera que:

“Las características esenciales de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, en el cual se divulgan composiciones que comprenden una proteína de fusión recombinante aislada fosforilada con manosa - 6 - fosfato y N - acetil - alfa - glucosaminidasa (NaGlu) y un portador farmacéuticamente aceptable y/o un medio de cultivo (Pág. 4, párr. 3). Dicha composición permite la internalización de la proteína de fusión recombinante humana (prhNaGlu) mediante endocitosis en una célula humana, que presenta deficiencia en la actividad enzimática de NaGlu y el incremento en la concentración de glucosaminoglucanos (GAG) (Pág. 16, párr. 3), con el objetivo de tratar una enfermedad autosómica recesiva de almacenamiento lisosomal (LSD), como el síndrome de Sanfilippo de tipo B. La proteína de fusión recombinante humana (prhNaGlu) comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 (Pág. 20, Rv. 12 - Pág. 4/30, Fig. 3B).”

5.2. En cuanto a la observación de falta de novedad, la solicitante respetuosamente no está de acuerdo con la conclusión del Examinador en la medida que considera que las reivindicaciones de la presente solicitud si son novedosas con respecto a las divulgaciones contenidas en D1.

La novedad de una invención está señalada en la Decisión 486 en el artículo 16 así:

“Artículo 16.- Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida. (...)”

El requisito de novedad requiere que el invento reivindicado no haya sido revelado como tal a través de cualquier fuente en el estado de la técnica.

5.3. El documento D1 mencionado por el Examinador divulga una proteína de fusión que comprende N-acetil- α -D- glucosaminidasa humana recombinante (rhNaGlu) la cual comprende la secuencia de

aminoácido 24-743 de SEQ ID NO: 1 (ver D1, reivindicaciones 12 y 19) y un copartícipe de fusión. El documento D1 divulga la producción de proteínas de fusión rhNaGlu y NaGlu (fusiones ApoE y ApoB) en células CHO (del inglés *Chinese Hamster Ovary*). **El documento D1 divulga además que la proteína de fusión ApoE es absorbida en la célula pero que ni el rhNaGlu, ni tampoco la proteína de fusión NaGlu-ApoB son absorbidas en las células. (Ver D1, Figuras 6 y 7).**

Esta divulgación de D1 confirma lo que era conocido en la técnica, es decir que la NaGlu humana recombinante no es absorbida en las células y no es adecuada para su uso terapéutico. A partir de esto, **Ellinwood se motivó a buscar una solución diferente y desarrolló la proteína de fusión ApoE divulgada.**

5.4. En contraste con lo divulgado en D1, las reivindicaciones de la presente invención están dirigidas a la NaGlu humana recombinante que contiene una secuencia de amino ácidos definida que no incluye ningún amino ácido exógeno (por ejemplo coparticipes de fusión), y que es adecuada para su uso terapéutico. En particular, la reivindicación 1 define la relación molar de manosa-6-fosfato (M6P) a la proteína rhNaGlu que logró el efecto técnico deseado y permitió que el rhNaGlu fuera absorbida por las células y que cruzara eficientemente la barrera hematoencefálica.

5.5. Se reitera que el documento D1 no divulga la materia objeto de las reivindicaciones de la solicitud colombiana. En primer lugar, y ante todo, la composición reivindicada por la solicitante no es una proteína de fusión. El enfoque adoptado por la solicitante es marcadamente diferente al enfoque planteado en D1. El documento D1 también incluye resultados experimentales que muestran que el rhNaGlu del arte previo no contiene una cantidad suficiente de M6P para ser absorbido por las células. (Ver la figura 7 de D1). Estos resultados muestran claramente que el rhNaGlu de la técnica anterior no fue absorbida por las células y no restauró el 50% de actividad normal de NaGlu en las células.

5.6. En consecuencia, dado que las divulgaciones del documento D1 no muestran todas las características de la composición que comprende una mezcla aislada de N-acetil- α -D-glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante cuya secuencia de aminoácidos se expone en 24 a 743 de SEC ID Nº 1 de las reivindicaciones ahora solicitadas, entonces las reivindicaciones son nuevas frente a la publicación D1.

6. EXAMEN DE PATENTABILIDAD – NIVEL INVENTIVO

6.1. El Examinador objeta el nivel inventivo de las reivindicaciones 3 a 6, 12 y 13 de la presente solicitud debido a las divulgaciones contenidas en los documentos:

D2: Di Natale P et al., 2005. Biochem. J. Vol. 388, Pág. 639 – 646. “Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIB with lentiviral-NAGLU vector” de fecha 13 de enero de 2005.

D3: Jung – Ja P. K. et al., 2009. Structural Biology.Vol. 19, Pág. 534 – 542. “Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors” de fecha octubre de 2009.

El Examinador presenta la siguiente tabla comparativa entre la reivindicación 3 y los documentos D2 y D3:

Características esenciales	D2	D3
Composición que comprende una mezcla aislada de N - acetil - alfa - glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante	Inyección intravenosa de vector lentiviral - NaGlu que expresa la proteína NAGLU recombinante (Pag. 640, Col. 1 - Pag. 641, Col. 2).	N - acetil - alfa - glucosaminidasa (Pág. 535, Fig. 1)
Comprende la secuencia de aminoácidos se expone en 24 a 743 de SEQ ID NO: 1	ADNc de NaGlu humana (Pág. 640, Col. 1)	No registra
Comprende manosa - 6 - fosfato (M6P)	No registra	Enzima lisosomal que adquiere una etiqueta Man - 6 - P (Pág. 535, Fig. 1)
Manosa	No registra	Residuos de manosa sobre N - oligosacáridos (Pág. 535, Fig. 1)

El Examinador añade que:

“La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 3 y la composición que comprende la proteína N - acetil - alfa - glucosaminidasa humana recombinante (rhNaGlu) divulgada en el documento D2, consiste en que la proteja rhNaGlu comprende manosa y manosa - 6 - fosfato (MP6).

El efecto que logra el incluir una composición farmacéutica que comprenda una mezcla aislada de N - acetil - alfa - glucosaminidasa humana recombinante (rhNaGlu), monosa y manosa - 6 - fosfato (MP6), es la internalización de la proteína de fusión recombinante humana (prhNaGlu) mediante endocitosis en una célula humana, que presenta deficiencia en la actividad enzimática de NaGlu.

Sin embargo, el documento D3 divulga que la fosforilación de N -glucanos en proteínas lisosomas permite la interacción celular de dichas proteínas y su posterior transporte hacia los lisosomas mediado por la interacción del receptor de M6P; además afirma, que las enfermedades autosómicas recesivas como el síndrome Sanfilippo tipo B se originan por la deficiencia en la actividad de la GlcNAc - fosfotransferasa, la cual es la enzima encargada de generar la etiqueta de M6P (Pag. 534, Col. 2), por lo cual para una persona normalmente versada en la materia sería obvio que la fosforilación de los residuos de manosa de la proteína NaGlu, incrementar la concentración de esta enzima lisosomal, permitiendo el desarrollo de potenciales terapias de reemplazo enzimático, y por lo tanto el objeto reclamado por la solicitante no presenta altura inventiva a la luz de las enseñanzas de los documentos D2 y D3.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluirá las enseñanzas acerca de la fosforilación de los residuos de manosa de la proteína NaGlu, para incrementar la concentración de esta enzima lisosomal divulgadas en el documento D3, en el procedimiento para la producción de vectores lentivirales que comprenden una la proteína N - acetil- alfa - glucosaminidasa humana recombinante (rhNaGlu) divulgado en el documento D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 3 de la solicitud, por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 4 - 6, 12 - 13 no mencionan características inventivas adicionales para la composición de la reivindicación 3, por lo cual se considera que tampoco tienen nivel inventivo.”

6.2. Frente a la observación de falta de nivel inventivo, la solicitante respetuosamente considera que las reivindicaciones 3 a 6, 12 y 13 si cuentan con nivel inventivo frente a las divulgaciones de D2 y D3.

Particularmente, la solicitante explica que el documento D2 divulga el potencial terapéutico y limitaciones de NaGlu lentiviral vectorial que contiene el ADNc NaGlu humano accionado por un promotor de citomegalovirus (CMV), para entregar el gen NAGLU humano en vivo en el modelo MPS IIIB por administración intravenosa. (Ver D2, Resumen).

Por su parte, el documento D3 es un artículo de análisis que se enfoca en estudios estructurales del receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes (CD-MPR) y el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) y proporciona la base para el reconocimiento de fosfomanosa y mecanismos de carga y descarga de carga. (Ver D3, Resumen).

6.3. La Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad emitido por la Superintendencia de Industria y Comercio, Delegatura para la Propiedad Industrial, Dirección de Nuevas Creaciones, establece con respecto al requisito de nivel inventivo, lo siguiente:

“Si el estado de la técnica provee las enseñanzas para derivar la solución, revisar si el conjunto de enseñanzas del estado de la técnica lo llevarían de forma inmediata a la solución propuesta por la solicitud. Si se requiere de pasos adicionales o de corroboración o de superar obstáculos revelados por las propias enseñanzas entonces el estado de la técnica no revela la solución al problema.” (Subrayado fuera de texto)¹

Como se discute en detalle más adelante, un experto en la materia no tendría ninguna enseñanza, sugerencia, o motivación para combinar D2 con D3 con el fin de llegar a la composición de la invención puesto que precisamente existían escritos y estudios que podrían llevar a un experto en la materia a buscar otras alternativas para la obtención de una composición que comprende una mezcla aislada de N-acetil- α -D-glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante.

6.4. El Examinador determina que el problema técnico a ser resuelto por la presente invención es:

“Como proveer una composición que comprende la proteína N - acetil- alfa -glucosaminidasa humana recombinante (rhNaGlu) estable, que sea enzimáticamente activa y que tenga propiedades físicas que le permitan atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), que pueda ser internalizada por endocitosis en una célula de mamífero que tiene deficiencia de NaGlu, para tratar el síndrome de Sanfilippo de tipo B”

Frente al problema planteado por el Examinador, la solicitante considera que el problema técnico de la invención puede ser planteado con más precisión como:

Cómo proveer una composición que comprende NaGlu humana recombinante, y no una proteína de fusión, la cual es absorbida eficientemente por las células y que cruza la barrera hematoencefálica para el tratamiento de la deficiencia de NaGlu.

¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad emitido por la Superintendencia de Industria y Comercio, Delegatura para la Propiedad Industrial, Dirección de Nuevas Creaciones. Mayo 2012. Página 119.

6.5. Habiendo definido particularmente el problema de la invención, la solicitante afirma que el arte previo demuestra que el NaGlu humano recombinante del arte previo no es adecuado para uso terapéutico.

En efecto, el arte previo demuestra que el rhNaGlu ha sido producido en una variedad de líneas celulares tal como células de ovarios de hámster Chino (CHO), HeLa, HEK 293, y HT1080, pero que el NaGlu que fue producido carecía de niveles suficientes de manosa-6-fosfato (M6P) para absorción celular y uso terapéutico.

Para demostrar los anteriores hechos, la solicitante presenta al Examinador las siguientes publicaciones:

- Weber y otros, (Protein Expression and Purification, 2001, vol. 21, páginas 251-259);
- Yogalingam y otros, (Biochimica et Biophysica Acta, 2000, vol. 1502, páginas 415-425); y
- Zhao y otros, (Protein Expression and Purification, 2000, vol. 19, pgs. 202-211).

6.6. El artículo de Weber muestra estudios del rhNaGlu expresado en células CHO-K1 y la comparó con la NaGlu nativa purificada a partir de placenta humana. Weber divulga que las propiedades enzimáticas de rhNaGlu eran comparables a las de la enzima nativa purificada (ver página 252, último párrafo). Sin embargo, Weber reporta que no pudieron inmunoprecipitar el rhNaGlu absorbido por las células (ver página 257, columna izquierda, primer párrafo y figura 2). Weber también observó que la mayor parte del rhNaGlu secretado no estaba fosforilado. Con respecto al rhNaGlu preparado en CHO, los autores concluyen que: *“el uso de NaGlu secretado en protocolos futuros de terapias de reemplazo de enzimas y genes será severamente limitado debido a su reducido grado de manosa-6-fosforilación”*.

6.7. De otra parte, Yogalingam también divulga la expresión y caracterización de NaGlu recombinante tipo natural (WT) expresado en células CHO-K1. Los resultados de experimentos de etiquetado ³⁵S demuestran que sólo 0.36% de NaGlu recombinante fue fosforilada y la mayoría no fue manosa-6-fosforilada (ver página 424, columna izquierda, resaltado en amarillo). Yogalingam también observó fosforilación débil del rhNaGlu secretado expresado en células HeLa. Basado en estos resultados, y resultados similares obtenidos por otros investigadores, Yogalingam concluye que la fosforilación débil del NaGlu tipo natural secretado era “específica del NaGlu” en lugar de ser específica del sistema de expresión (ver página 424, columna izquierda y derecha).

6.8. El documento de Zhao divulga que la rhNaGlu secretada por células CHO tenía sólo un rastro de M6P y concluye que cualquier fosforilación vista en un medio condicionado fue debida a un enzima CHO endógena (ver Resumen y página 209, columna derecha, primer párrafo).

6.9. Las referencias del arte previo proporcionadas junto con el presente escrito demuestran que era bien conocido en la técnica que formas recombinantes de NaGlu humana no eran adecuadas para uso terapéutico porque carecían de suficiente M6P para ser absorbido por las células. Adicionalmente, las

referencias muestran que era conocido por las personas expertas que esta deficiencia estaba relacionada con la proteína NaGlu en sí misma y no con una deficiencia de algún sistema de expresión en particular.

En vista del estado del arte, la presente solicitud describe una invención sorprendente y es que la rhNaGlu que es absorbida eficientemente por las células y que cruza la barrera hematoencefálica. (ver Ejemplo 7, página 159 de la Descripción originalmente presentada).

6.10. El Examinador afirma que D2 estimula el desarrollo de “terapias génicas” alternativas. Asumiendo, en aras de la discusión, que esto fuera cierto, entonces esto no sería pertinente a las reivindicaciones de la presente invención las cuales están dirigidas a una composición que contiene una proteína terapéutica. Además, aunque hubo claramente un deseo de desarrollar un tratamiento terapéutico para tratar el síndrome de Sanfilippo, **el arte previo divulga que el rhNaGlu no iba a funcionar y que otros enfoques, tal como proteínas de fusión NaGlu-ApoE deberían ser estudiados y desarrollados.**

6.11. Los inventores en el presente caso tomaron un enfoque diferente. Como se muestra en los ejemplos incluidos en la solicitud, los inventores resolvieron el problema del rhNAGlu produciendo un rhNAGlu que es absorbida eficientemente por las células, cruza la barrera hematoencefálica, y contiene M6P como se reivindica en la reivindicación 1. Esto es contrario a la creencia convencional del arte previo, y una persona con conocimientos promedio no podría haber tenido ninguna expectativa de que las composiciones que ahora se proponen serían exitosas.

6.12. En consecuencia, el conjunto de enseñanzas que señala el Examinador en este caso, no llevan a la solución propuesta por la solicitud; puesto que en esta invención se requirió corroboración y se tuvieron que superar obstáculos del estado de la técnica del momento en el cual se desarrolló la invención.

7. Después de haber modificado las reivindicaciones según las observaciones y sugerencias del Examinador, solicito de manera respetuosa se otorgue el privilegio de patente de invención a este nuevo invento, dado que cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en la Decisión 486.

Atentamente,



ANDREA TOBOS MATEUS

C.C. 52.223.325 de Bogotá

T.P. 148648

Anexos

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una mezcla aislada de *N*-acetil- α -D-glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante cuya secuencia de aminoácidos se expone en 24 a 743 de SEC ID N° 1, en la que dicha mezcla comprende rhNaGlu que contiene estructuras de glucano que comprenden manosa-6-fosfato (M6P), y la proporción de M6P a proteína rhNaGlu es 1 a 6 moles de M6P por mol de proteína, para que dicho M6P que contiene rhNaGlu sea internalizado en una célula de mamífero que tiene deficiencia de NaGlu por endocitosis mediada por el receptor de M6P y restablece 50% de la actividad de la NaGlu observada en una célula del tipo natural del mismo tipo que expresa la NaGlu endógena.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende manosa.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende *N*-acetilglucosamina (GlcNAc).

4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende galactosa.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu restablece 60, 70, 80, 90, 95 o 100% de la actividad enzimática normal de NaGlu.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha célula de mamífero deficiente en NaGlu es una célula humana.

8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha célula humana es un fibroblasto cutáneo, una célula neuronal, un hepatocito o un macrófago.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu está glicosilada enlazada a N.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína rhNaGlu está glicosilada enlazada a O.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 mol de M6P por mol de rhNaGlu.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el cerebro de un mamífero cuando es administrada sistémicamente.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el cerebro de un mamífero

cuando es administrada intravenosamente.

14. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el cerebro de un mamífero cuando es administrada intratecalmente.

15. Una composición farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición que comprende la proteína NaGlu recombinante humana cuya secuencia de aminoácidos se muestra desde los residuos aminoácidos 24 a 743 de la SEC ID NO: 1 y que cruza la barrera de sangre del cerebro de un mamífero cuando se administra intravenosamente.

17. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha proporción de M6P a proteína rhNaGlu es determinada por medio de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una mezcla aislada de N-acetil- α -D-glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante cuya secuencia de aminoácidos se expone en 24 a 743 de SEC ID N° 1, en la que dicha mezcla comprende ~~una cantidad suficiente de~~ rhNaGlu que contiene ~~una o más~~ estructuras de glucano que comprenden manosa-6-fosfato (M6P), y la proporción de M6P a proteína rhNaGlu es 1 a 6 moles de M6P por mol de proteína, para que dicho M6P que contiene rhNaGlu sea internalizado en una célula de mamífero que tiene deficiencia de NaGlu por endocitosis mediada por el receptor de M6P y restablece ~~por lo menos~~ 50% de la actividad de la NaGlu observada en una célula del tipo natural del mismo tipo que expresa la NaGlu endógena.

~~2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu contiene al menos 1 mol de M6P por mol de proteína.~~

~~3.2.~~—La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende manosa.

~~4.3.~~—La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc).

~~5.4.~~—La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende galactosa.

~~6.5.~~—La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu comprende N-acetilgalactosamina (GalNAc).

~~7.6.~~ La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu restablece 60, 70, 80, 90, 95 o 100% de la actividad enzimática normal de NaGlu.

~~8.7.~~ La composición de la reivindicación 1, en la que dicha célula de mamífero deficiente en NaGlu es una célula humana.

~~9.8.~~ La composición de la reivindicación ~~78~~, en la que dicha célula humana es un fibroblasto cutáneo, una célula neuronal, un hepatocito o un macrófago.

~~10.~~ La composición de la reivindicación 1, en la que dicha rhNaGlu es producida de una célula de oviducto de un ave transgénica.

~~11.~~ Una composición que comprende una mezcla aislada de N-acetil- α -D-glucosaminidasa (rhNaGlu) humana recombinante que comprende una o más estructuras de glucano que tienen suficiente cantidad de manosa-6-fosfato (M6P), que permite la internalización de dicha rhNaGlu en una célula de mamífero que tiene deficiencia de NaGlu por endocitosis mediada por el receptor de M6P, y que cuando se internaliza *in vivo*, dicha NaGlu restablece al menos un 50 % de la actividad NaGlu observada en una célula de tipo natural del mismo tipo que

~~expresa NaGlu endógena, en donde la secuencia de aminoácidos de dicha rhNaGlu se muestra desde los residuos aminoácidos 24 a 743 de la SEC. ID NO: 1.~~

~~12.9.~~ La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ~~u 11~~, en la que dicha rhNaGlu está glicosilada enlazada a N.

~~13.10.~~ La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ~~u 11~~, en la que dicha proteína rhNaGlu está glicosilada enlazada a O.

~~14.11.~~ La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ~~u 11~~, en la que dicha rhNaGlu comprende ~~aproximadamente~~ 1, 2, 3, 4, 5 o 6 mol de M6P por mol de rhNaGlu.

~~15.12.~~ La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ~~u 11~~, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el cerebro de un mamífero ~~que tiene deficiencia de NaGlu~~ cuando es administrada sistémicamente.

~~16.13.~~ La composición de la reivindicación ~~15.12~~, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el cerebro de un mamífero ~~que tiene deficiencia de NaGlu~~ cuando es administrada intravenosamente.

~~17.14.~~ La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ~~u 11~~, en la que dicha rhNaGlu es administrada eficazmente en el

cerebro de un mamífero ~~que tiene deficiencia de NaGlu~~ cuando es administrada intratecalmente.

~~18-15.~~ Una composición farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con ~~las reivindicaciones 1 u 11~~ en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

~~19-16.~~ Una composición que comprende la proteína NaGlu recombinante humana cuya secuencia de aminoácidos se muestra desde los residuos aminoácidos 24 a 743 de la SEC ID NO: 1 y que cruza la barrera de sangre del cerebro de un mamífero ~~que tiene deficiencia de NaGlu~~ cuando se administra intravenosamente.

17. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha proporción de M6P a proteína rhNaGlu es determinada por medio de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CONSULTA DE DOCUMENTOS

Mucopolysaccharidosis type IIIB: characterisation and expression of wild-type and mutant recombinant α -N-acetylglucosaminidase and relationship with Sanfilippo phenotype in an attenuated patient

Gouri Yogalingam ^{a,*}, Birgit Weber ^a, Judith Meehan ^b, John Rogers ^b,
John J. Hopwood ^a

^a *Lysosomal Diseases Research Unit, Department of Chemical Pathology, Women's and Children's Hospital, 72 King William Road, North Adelaide, SA 5006, Australia*

^b *Victorian Clinical Genetics Service, Royal Children's Hospital, Parkville, Victoria 3052, Australia*

Received 22 May 2000; received in revised form 20 July 2000; accepted 20 July 2000

Abstract

Mucopolysaccharidosis type IIIB (MPS-IIIB) is a lysosomal storage disorder characterised by the defective degradation of heparan sulfate due to a deficiency of α -N-acetylglucosaminidase (NAG). The clinical severity of MPS-IIIB ranges from an attenuated to severely affected Sanfilippo phenotype. This paper describes the expression and characterisation of wild-type recombinant NAG and the molecular characterisation of a previously identified R297X/F48L compound heterozygous MPS-IIIB patient with attenuated Sanfilippo syndrome. We have previously shown R297X to be the most common mutation in a cohort of Dutch and Australian patients, occurring at a frequency of approximately 12.5%. To date F48L has only been described in the proband. To determine the contribution of each mutation to the overall clinical phenotype of the patient, both mutant alleles were engineered into the wild-type NAG cDNA and expressed in Chinese hamster ovary cells. The wild-type NAG and F48L mutant alleles were also retrovirally expressed in MPS-IIIB skin fibroblasts. Residual NAG activity and the stability and maturation of immunoprecipitated NAG were determined for wild-type NAG and mutant NAG. The combined biochemical phenotypes of the two NAG mutant alleles demonstrated a good correspondence with the observed attenuated Sanfilippo phenotype of the patient. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Lysosome; α -N-acetylglucosaminidase; Mucopolysaccharidosis; Sanfilippo

1. Introduction

The mucopolysaccharidoses are a group of 11 inherited lysosomal storage diseases (LSD) which result from deficiencies of specific lysosomal enzymes that are required for the lysosomal degradation of glycosaminoglycans (GAG). The mannose-6-phosphate (M6P) moieties on lysosomal enzymes serve as high-affinity ligands for binding to M6P receptors in the *trans*-Golgi network (TGN). Binding with

Abbreviations: MPS-IIIB, mucopolysaccharidosis type IIIB; NAG, α -N-acetylglucosaminidase; TGN, *trans*-Golgi network; WT-NAG, wild-type NAG; GAG, glycosaminoglycan; FCS, foetal calf serum; M6P, mannose-6-phosphate (M6P); CHO-K1, Chinese hamster ovary cells; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; F12, Ham's F12 medium

* Corresponding author. Fax: +61-8-8204-7100;
E-mail: gyogalin@medicine.adelaide.edu.au

M6P receptors permits lysosomal enzymes to be segregated from proteins destined for secretion or transport to other intracellular compartments. The ligand-receptor complex is then transported from the TGN via a clathrin-coated vesicle to an acidified endosomal compartment where the M6P receptor and lysosomal enzyme dissociate. Further processing of the enzyme occurs in the lysosome. The M6P receptor is either recycled from the endosome back to the Golgi for further targeting of endogenous *de novo* synthesised lysosomal enzymes or transported to the plasma membrane where it functions to internalise exogenous lysosomal enzymes [1].

Mucopolysaccharidosis type III (MPS-III), also known as Sanfilippo syndrome, results from the absence of one of four lysosomal enzymes that are sequentially involved in the degradation of heparan sulfate: heparan *N*-sulfatase (MPS-IIIA), α -*N*-acetylglucosaminidase (NAG, MPS-IIIB), acetylCoA: α -glucosaminide acetyl-transferase (MPS-IIIC) or *N*-acetylglucosamine 6-sulfatase (MPS-IIID) [2]. An absence of any one of these enzymes leads to the lysosomal accumulation and urinary excretion of heparan sulfate and the clinical onset of Sanfilippo syndrome. In Australia the combined prevalence of MPS III is 1:66 000 births [3].

The clinical presentation of MPS-III is characterised by severe central nervous system degeneration resulting in progressive mental retardation and is often combined with hyperactivity and aggressive behaviour. The Sanfilippo phenotype of MPS-III varies, ranging from severe to attenuated. Unlike most of the other MPS, the somatic features of MPS-III, which involve skeletal pathology, hepatosplenomegaly and joint stiffness, are relatively mild and observed mainly in older patients. Often the lack of somatic involvement leads to difficulty in diagnosing patients with MPS-III [2].

The cDNA sequence for NAG has been cloned and characterised [4,5] with the gene localised to 17q21.1. Molecular characterisation of MPS-IIIB patients has resulted in the identification of several mutations in the NAG gene [5–11]. The high degree of molecular heterogeneity reflects the wide clinical variability observed with MPS-IIIB. Certain mutations show a higher prevalence. For example, the stop mutation R297X accounted for 12.5% of mutant alleles in a recent molecular study of 40 MPS IIIB patients

(10 out of 80 alleles) [9]. Zhao et al. [11] reported a severely affected homozygous R297X/R297X Sanfilippo patient [11]. At 13 years of age the patient was severely demented, despite bone marrow transplantation. A severely affected homozygous R297X/R297X Sanfilippo patient, diagnosed at 6 years of age, has also been reported [9]. These observations suggest that R297X is associated with a severe Sanfilippo phenotype when inherited in a homozygous fashion [9,11]. The presence of an attenuated Sanfilippo phenotype in a F48L/R297X compound heterozygous patient suggests that the F48L allele is associated with an attenuated phenotype [9]. In this study the relationship between genotype, cell biochemistry and clinical phenotype in a F48L/R297X compound heterozygous Sanfilippo patient was evaluated by individually characterising the two mutations, F48L and R297X. As an initial step towards developing gene therapy for MPS-IIIB, we also retrovirally transduced MPS-IIIB skin fibroblasts with the NAG cDNA and demonstrated correction of the enzymatic and biochemical (GAG storage) defect.

2. Materials and methods

2.1. Case report: patient S.B.

Recently the genotype of the proband was determined to be compound heterozygous for R297X and F48L [9].

A 31-year-old male, born in 1968, presented at 18 months of age with failure to thrive, developmental delay, hepatomegaly and diarrhoea. He had three normal siblings. At age 3 years he had coarse hair, a protuberant abdomen, soft hepatomegaly and normal facies. His weight was less than the third percentile. A provisional diagnosis of glycogen storage disease was made.

Liver function testing and a skeletal survey were both normal. Liver biopsy was consistent with a lysosomal storage disorder likely to be MPS-III. A bone marrow biopsy and leucocytes showed lysosomal inclusions. A urinary screen for mucopolysaccharides (Royal Children's Hospital, Melbourne) was normal. A course of plasma infusions, then currently in vogue, was undertaken for 4 months. While this acutely shrank the liver and spleen, it was overall

without clinical effect. He remained intellectually delayed while displaying hyperactive aggressive behaviour but no regression.

As his course was atypical for MPS, repeat liver, skin and bone marrow biopsies were performed at age 8 years. At this stage there was persisting hepatomegaly, coarse hair and developmental delay. The liver biopsy was again consistent with a diagnosis of MPS-III with some progression to liver cirrhosis. The bone marrow inclusions persisted but a urinary screen for mucopolysaccharides remained negative. Skeletal survey showed minor vertebral changes. Aged 8, IQ testing put him in the 4- to 5-year range with a wide scatter. At this time he was living in a residential setting for the intellectually disabled. He attended a special school and was able to acquire some skills. Later he moved to a smaller institutional setting. Here he had a two-wheeler bike and used to ride freely around the neighbourhood to undertake a message or shopping. Whilst obviously intellectually delayed, he had a good memory for names and events and had become quite sociable.

At 12 years of age (1980) samples were sent to the Women's and Children's Hospital in North Adelaide, South Australia for high-resolution electrophoresis of urine [12] which showed a significant elevation of heparan sulfate, consistent with Sanfilippo syndrome. In contrast, his total urinary glycosaminoglycan content (19 mg/mmol creatinine) was just above the upper limit of normal for his age group (3–17 mg/mmol creatinine). These results emphasise the high incidence of false negative results in the urinary screening test for heparan sulfate by some methods leading to difficulty in diagnosing patients with MPS-III.

MPS-IIIB was diagnosed on the basis of the deficiency of NAG. Over the ensuing 8 years the patient did not show the rapid developmental deterioration associated with severe Sanfilippo syndrome. His liver was no longer enlarged and his joints were normal.

The third decade of life was characterised by a phase of intellectual deterioration and aggressive behaviour. He had an early loss of coordination aged 21 years and outbursts of rage, which improved after treatment with Thioridazine. Aged 22 years his memory deteriorated as did his self-care skills. He could no longer ride his bike and slept a lot regardless of Thioridazine dosage.

An echocardiogram performed aged 23 years was normal. Aged 23 years he underwent an inguinal hernia repair without complication. Nine months later he began to lose weight and develop paranoid delusions. He was noted to be prematurely ageing and engaging in meaningless babble. From the age of 24 years he seemed to lose his sense of direction and self care skills further deteriorated. This skill loss, along with memory loss became more profound from the age of 27 years. Presently aged 31, he has had a progressive loss of physical skills, co-ordination and muscle wasting manifested by frequent falls and inability to climb stairs. He is increasingly somnolent alternating with occasional erratic behaviour. He has poor short-term memory and no longer has self-care skills. He remains in residential care and still enjoys a reasonable quality of life.

2.2. Mutagenesis

The missense mutations F48L and R297X [9] were introduced into the WT NAG cDNA construct, pBluel33+4 [4] by using a QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The oligonucleotides used for each mutagenesis reaction are summarised in Table 1. Briefly, each polymerase chain reaction (PCR) (50 µl volume) contained 50 ng of pBluel33+4 template, 125 ng of each oligonucleotide primer (Table 1), 1×reaction buffer, 1 µl of dNTP mix, 1×Q buffer (Qiagen) and 2.5 units of Pfu Turbo DNA polymerase. Each PCR was then denatured at 95°C for 30 s and then subjected to 12 cycles of the following conditions: 95°C for 30 s, 55°C for 1 min and 68°C for 12 min. Ten units of *DpnI* restriction enzyme was then added to each reaction and incubated at 37°C for 1 h. Five µl of each *DpnI* digested PCR was then transformed into Epicurian Coli XLI-Blue Supercompetent cells as described by the supplier (Stratagene). Clones containing the mutated sequence were identified by allele-specific oligonucleotide hybridisation (Table 1) and subsequently sequenced to ensure that no other changes other than the desired mutation had been introduced into the NAG cDNA sequence. pBluel33+4F48L and pBluel33+4R297X were digested with *BstEII* and *BamHI*. The inserts containing the mutagenised NAG sequences were then sub-cloned into the WT NAG expression construct pcDNANAG [4] digested

Table 1

Sequence of oligonucleotide primers that were used for the quick change mutagenesis of WT-NAG cDNA sequence

Primer pair	Sequence	Sense or antisense	Position
F48L-1	CCGCGGCCGACCTCTCCGTGTCG	+	232–254
F48L-2	CGACACGGAGAGGTCGGCCGCGG	–	254–232
R297X-1	CGGAGCCTCTTCCTGTGAGAGCTGATCAAAG	+	975–1006
R297X-2	CTTTGATCAGCTCTCACAGGAAGAGGCTCCG	–	1006–975

The positions of primers in the NAG sequence are according to Fig. 3 of Weber et al. [4].

with the same restriction endonucleases. Clones containing the mutagenised NAG sequence were identified by allele specific oligonucleotide hybridisation and designated pcDNAF48L and pcDNAR297X.

2.3. Cell culture

Unless otherwise stated, all cell culture reagents were purchased from Gibco-BRL. Chinese hamster ovary cells (CHO-KI) were grown in Ham's F12 (F12) supplemented with 10% (v/v) bovine foetal calf serum (FCS, CSL Ltd), and antibiotics (penicillin, 100 U/ml and streptomycin sulfate, 100 µg/ml). Skin fibroblasts, Bosc 23 cells [13] and PA317 cells [14] were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with FCS (10% v/v) and antibiotics.

2.4. Electroporation of CHO-KI cells

CHO-KI cells were electroporated with 30 µg of pcDNAF48L, pcDNAR297X, and pcDNANAG as previously described [15]. Electroporated cells were selected with 0.75 mg/ml geneticin (G418) for 2 weeks resulting in the appearance of approximately 300 G418-resistant colonies per electroporation. G418-resistant mass-cultures of electroporated cells were used for the determination of NAG activity and immunoprecipitation (see below).

2.5. Retroviral vector construction

The WT NAG cDNA or mutagenised NAG sequence was excised from pcDNANAG and pcDNAF48L with *Hind*III and *Eco*RV and subcloned into pLNCX [16] digested with *Hind*III and *Stu*I. The presence of the NAG cDNA in each construct was confirmed by restriction enzyme analysis. Constructs containing the cDNA in the correct ori-

entation were isolated and designated pLNCNAG and pLNCF48L.

2.6. Generation of amphotropic LNCNAG and LNCF48L virus

The retroviral constructs pLNCNAG and pLNCF48L (25 µg) were transfected into the ecotropic virus packaging cell line Bosc-23 [13] using Lipofectamine transfection reagent (Gibco-BRL). Medium containing transiently expressed ecotropic retrovirus was harvested 48–96 h after transfection, filtered (0.2-µm filter) and used to infect PA317 cells [14] in the presence of 4 µg/ml polybrene. PA317 cells were exposed to four 12-h cycles of freshly harvested ecotropic virus infection, then subcultured 1:3 and grown in the presence of 1 mg/ml G418 for 2 weeks.

2.7. Retrovirus transduction of MPS-IIIB skin fibroblasts

Sixteen-hour-conditioned medium was harvested from G418-resistant mass-cultures of PA317/LNCF48L and PA317/LNCNAG, filtered (0.2-µm filter) and used to infect MPS-IIIB (R297X/R297X homozygous) skin fibroblasts (SF 4657, 70% confluent in 75-cm² flasks) in the presence of 4 µg/ml polybrene. MPS-IIIB fibroblasts were exposed to five cycles of freshly harvested amphotropic virus infection. Each virus exposure was approximately 16–24 h. After the final virus exposure the transduced cells were fed with growth medium until they reached confluence. Transduced fibroblasts were then subcultured 1:3 into three 75-cm² flasks and grown in the presence of 0.3 mg/ml G418 for 3 weeks.

2.8. Determination of NAG activity

Skin fibroblast and CHO-KI cultures were grown

to confluence in 75-cm² flasks. At 3 days post-confluence the cells were harvested with trypsin-versene (CSL Ltd), washed with PBS, resuspended in 150 μ l 0.5 M NaCl/0.02 M Tris (pH 7) and subjected to seven cycles of freeze–thaw in a slurry of dry ice and ethanol. Lysates were clarified by microcentrifugation at 13000 rpm for 3 min. Clarified fibroblast lysates and CHO-KI lysates were assayed for NAG activity using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-2-acetomido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside (Calbiochem) [17] and normalised for protein concentration as determined by the BioRad protein assay (BioRad).

2.9. Analysis of GAG storage

Normal fibroblasts (SF 4858), MPS-IIIB fibroblasts (R297X/R297X homozygous; SF 4657), LNC48L and LNC6737R transduced MPS-IIIB fibroblasts were grown to confluence in 25-cm² flasks and then metabolically labelled for 24 h with 10 μ Ci/ml Na₂³⁵SO₄ (570 mCi/mmol; DuPont NEN) in antibiotic-free Ham's F12 supplemented with 10% (v/v) FCS. Labelled cells were then harvested with trypsin-versene (CSL Ltd) and transferred to new 25-cm² flasks containing DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics (penicillin, 100 U/ml and streptomycin sulfate, 100 μ g/ml) and grown for a further 5 days. Some flasks of labelled MPS-IIIB fibroblasts were exposed to 24-h-conditioned medium collected from LNCNAG transduced MPS-IIIB fibroblasts in the presence or absence of 5 mM M6P (Sigma) during the 5-day chase period. Cell lysates were prepared and assayed for total cell protein, ³⁵S radioactivity, β -hexosaminidase and NAG activity.

2.10. Immunoprecipitation of NAG

CHO-KI cells and G418-resistant mass-cultures of CHOR297X, CHOF48L and CHONAG were grown to confluence in 75-cm² flasks and then metabolically labelled for 30 min with 100 μ Ci/ml EXPRE³⁵S³⁵S [³⁵S] protein labelling mix (1175 Ci/mmol, DuPont, NEN) in cysteine-methionine-free DMEM (ICN Biochemicals) supplemented with L-glutamine and FCS. Labelled cells were rinsed with medium and then chased with growth medium (Ham's F12 supplemented with FCS and antibiotics) for 4, 11 or 16 h. At each chase time one 75-cm² flask of labelled cells were harvested by treatment with trypsin-versene, recovered by centrifugation, resuspended in 10 ml PBS and then centrifuged again. The cell pellet was resuspended in 10 ml of 1 $\times$ solubilisation buffer (PBS containing 1% w/v sodium deoxycholate, 0.1% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% Nonidet P-40) and incubated for 24 h at 4°C. Prior to immunoprecipitation with NAG polyclonal antisera, growth medium and solubilised cell lysates were pre-cleared as follows. Seventy μ l of polyclonal CHO-KI antiserum (prepared by CSL Ltd) was added to each medium or solubilised lysate sample and incubated at 4°C overnight. Equilibrated pansorbin cells (140 μ l, Calbiochem) were added to each sample, incubated at 4°C for a further 6 h and then sedimented by centrifugation. The pre-cleared supernatant was then immunoabsorbed using 40 μ l of unpurified rabbit polyclonal antisera raised against recombinant NAG (Weber et al., submitted). After an overnight incubation at 4°C, 70 μ l of equilibrated pansorbin cells were added to each sample and incubated at 4°C for 6 h. NAG–IgG–pansorbin complexes were

Table 2
Expression of F48L-NAG, R297X-NAG and WT-NAG in CHO-KI cells

	Intracellular NAG (nmol/h per mg)	Secreted NAG (nmol/h per ml)	Intracellular β -hex (nmol/min per mg)
CHO-KI	7.81 $\pm$ 0.37	4.32 $\pm$ 0.24	19.31 $\pm$ 0.95
CHOF48L	8.23 $\pm$ 0.44	4.53 $\pm$ 0.18	21.76 $\pm$ 0.36
CHOR297X	7.85 $\pm$ 0.17	4.67 $\pm$ 0.18	16.49 $\pm$ 0.16
CHONAG	159.63 $\pm$ 4.76	13.20 $\pm$ 0.27	19.67 $\pm$ 0.35

CHO-KI cells were electroporated with the mutagenised or WT-NAG cDNA. Twenty-four-hour-conditioned medium and cell lysates prepared from confluent G418-resistant mass cultures were assayed for NAG activity or β -hexosaminidase (β -hex) activity using fluorogenic substrates. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. (n = 3).

pelleted by centrifugation, washed by microcentrifugation/resuspension with two 1-ml volumes of solubilisation buffer, once with 1 ml of water and then resuspended in 50 μ l sample buffer. Samples were boiled for 5 min, centrifuged at $12\,000\times g$ for 1 min to pellet Pansorbin cells, and the supernatant analysed via SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and autoradiography.

3. Results

3.1. Expression of F48L-NAG, R297X-NAG and WT-NAG in CHO-KI cells

G418-resistant mass-cultures of CHO-KI cells over-expressing F48L-NAG, R297X-NAG and WT-NAG were assayed for NAG activity using the fluorogenic substrate as described in Section 2. Control CHO-KI cells contained a significant amount of endogenous NAG activity (7.81 nmol/h per mg total cell protein, Table 2). CHO-KI cells electroporated with pcDNAF48L (CHOF48L) and pcDNAR297X (CHOR297X) contained NAG activities similar to control CHO-KI cells (8.23 nmol/h per mg and 7.85 nmol/h per mg, respectively). Medium harvested from control CHO-KI, CHOF48L and CHOR297X cells contained comparable NAG activities as well (Table 2). In contrast, in G418-resistant mass-cultures of CHO-KI cells electroporated with pcDNA-NAG (CHONAG), significant amounts of NAG activity toward the fluorogenic substrate were measured (159 nmol/h per mg, Table 2). Medium harvested from CHONAG cells contained 13.2

nmol/h per ml of NAG activity (Table 2). The activity of the lysosomal enzyme β -hexosaminidase was not affected by the expression of F48L-NAG, R297X-NAG and WT-NAG in CHO-KI cells (Table 2).

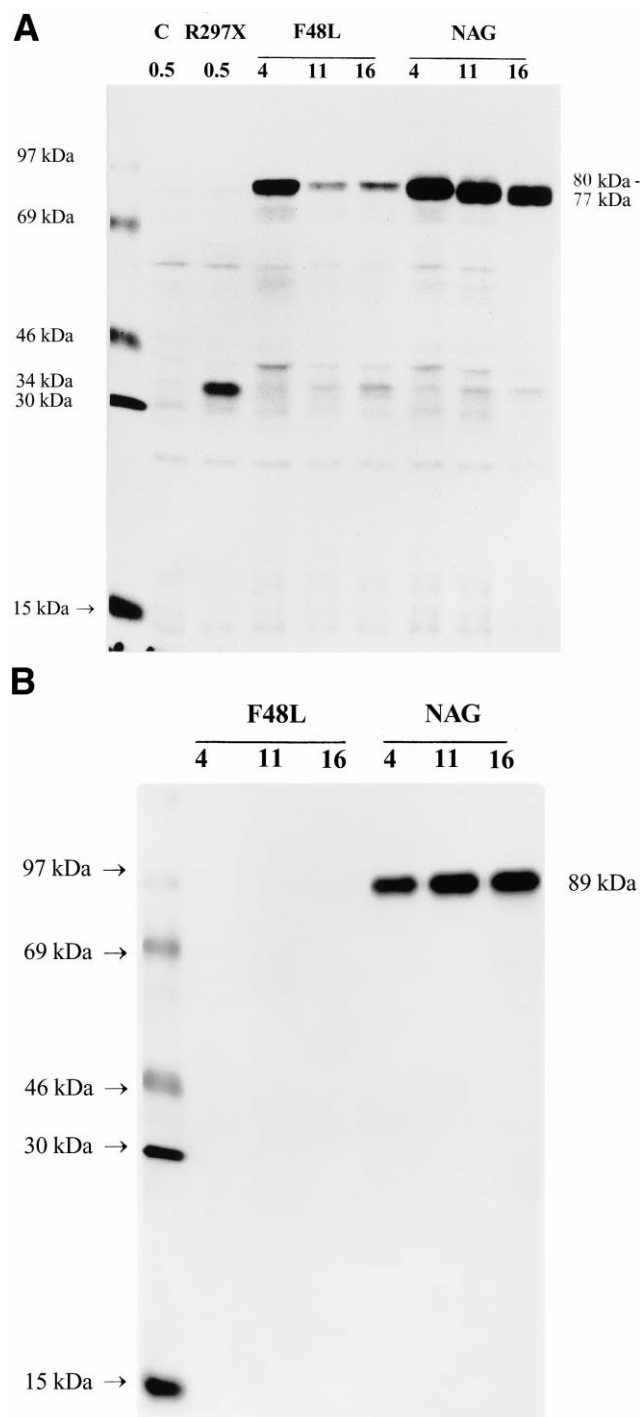


Fig. 1. Stability of intracellular (A) and secreted (B) R297X-NAG, F48L-NAG and WT-NAG in CHO-KI cells. Control CHO-KI cells (C), CHOR297X cells (R297X), CHOF48L (F48L) and CHONAG (NAG) cells were grown to confluence in 75-cm² tissue-culture flasks and metabolically labelled with EXPRE³⁵S³⁵S [³⁵S] protein labelling mix for 30 min. The labelling medium was then removed and cells were chased in growth medium for 0.5 h (CHO-KI and CHOR297X cells), or 4, 11 and 16 h (CHOF48L and CHONAG cells). At each time point labelled cells (A) and growth medium (B) were harvested, immunoprecipitated and analysed via SDS–PAGE and autoradiography. The molecular masses are indicated with arrows and were calculated by comparison with C-14 methylated standards run alongside the gel.

Table 3
Analysis of GAG storage in retrovirus transduced MPS-IIIB fibroblasts

	Intracellular NAG (nmol/h per mg cell protein)	Secreted NAG (nmol/h per ml)	Intracellular β -hex (nmol/min per mg)	^{35}S Radioactivity (cpm/mg cell protein)
Normal fibroblasts	8.815 ± 0.175	0.5 ± 0.3	46.9 ± 2.2	$6,975 \pm 991$
MPS-IIIB fibroblasts	n.d.	n.d.	68.1 ± 0.5	$84,351 \pm 510$
MPS-IIIB/LNCF48L	1.86 ± 0.07	n.d.	48.3 ± 0.8	$55,711 \pm 1576$
MPS-IIIB/LNCNAG	49.6 ± 0.21	46.6 ± 0.4	49.7 ± 0.5	$12,461 \pm 1230$

MPS-IIIB skin fibroblasts were retrovirally transduced with F48L-NAG (MPS-IIIB/LNCF48L) or WT-NAG (MPS-IIIB/LNCNAG) as described in Section 2. Control normal fibroblasts, control MPS-IIIB fibroblasts or gene-transduced fibroblasts were metabolically labelled for 24 h with $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ and then passaged for a further 3 days. Cell lysates were prepared and assayed for total protein, ^{35}S radioactivity, β -hexosaminidase (β -hex) activity and NAG activity. Twenty-four-hour-conditioned medium was also collected from each cell line and assayed for NAG activity. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). n.d., not detected.

3.2. Immunoprecipitation of R297X-NAG, F48L-NAG and WT-NAG

Control CHO-K1 cells and G418-resistant mass-cultures of CHOR297X were metabolically labelled with EXPRE ^{35}S [^{35}S] protein labelling mix for 30 min and then chased for 30 min or 4 h. At the 30-min chase time point ^{35}S -labelled R297X-NAG immunoprecipitated from CHOR297X cell lysates was detected as a truncated 34 kDa polypeptide (Fig. 1A) which was no longer detectable at the 4-h chase time point (result not shown). No ^{35}S -labelled R297X NAG was detectable in the chase medium (result not shown).

G418-resistant mass-cultures of CHOF48L and CHONAG were metabolically pulse-labelled with EXPRE ^{35}S [^{35}S] protein labelling mix for 30 min and then chased for varying lengths of time (4, 11 or 16 h). At the 4-h chase time point, ^{35}S -labelled WT-

NAG immunoprecipitated from CHONAG cell lysates migrated under reducing conditions as a precursor 80 kDa polypeptide. At the 11- and 16-h chase time points intracellular WT-NAG was successively reduced to 78.5 and 77 kDa, respectively (Fig. 1A). At the 4-, 11- and 16-h chase time points, the secreted form of ^{35}S -labelled WT-NAG was detected as a precursor 89 kDa polypeptide (Fig. 1B). In contrast, ^{35}S -labelled F48L-NAG immunoprecipitated from CHOF48L cell lysates was only detected as a 80 kDa precursor polypeptide (Fig. 1A). F48L-NAG did not appear to be cleaved to the intracellular mature 77 kDa form or be secreted into the medium (Fig. 1A,B).

3.3. Expression of F48L-NAG and WT-NAG in MPS-IIIB skin fibroblasts

MPS-IIIB fibroblasts were exposed to five cycles of

Table 4
Partial correction of GAG storage in MPS-IIIB fibroblasts with MPS-IIIB/LNCNAG conditioned medium

	NAG (nmol/h per mg)	β -Hexosaminidase (nmol/min per mg)	^{35}S Radioactivity (cpm/mg cell per protein)
Normal fibroblasts	25.12 ± 2.23	84.3 ± 14.7	3915 ± 182
MPS-IIIB fibroblasts	0.101 ± 0.025	94.0 ± 12.7	47988 ± 3328
MPS-IIIB fibroblasts+MPS-IIIB/LNCNAG conditioned medium	0.388 ± 0.048	80.7 ± 4.4	33305 ± 1518
MPS-IIIB fibroblasts+MPS-IIIB/LNCNAG conditioned medium+5 mM M6P	0.057 ± 0.012	94.5 ± 4.5	48874 ± 3861

Confluent triplicate cultures (25-cm² flasks) of normal fibroblasts (row 1) and MPS-IIIB fibroblasts (rows 2–4) were labelled for 24 h with $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ then passaged for a further 5 days. Some groups of labelled MPS-IIIB fibroblasts (rows 3 and 4) were also exposed to conditioned medium (46.6 nmol/h per ml) collected from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts in the absence (row 3) or presence (row 4) of 5 mM M6P during the 5-day chase period. Cell lysates were prepared and assayed for total protein, ^{35}S radioactivity, β -hexosaminidase and NAG activity. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

LNC48L or LNCNAG virus infection and then passaged for 3 weeks in the presence of 0.3 mg/ml G418. The storage of undegraded, sulfated GAGs in MPS-IIIB fibroblasts was analysed by measuring the intracellular retention of radioactivity in cells metabolically labelled with $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$. In this experiment R297X/R297X homozygous skin fibroblasts obtained from a severely affected MPS-IIIB patient (patient 30 of Table 4, Weber et al. [9]) contained no detectable NAG activity and approximately 12 times more intracellular ^{35}S radioactivity than normal control fibroblasts (Table 3). We have made the assumption that the majority of accumulated intracellular ^{35}S radioactivity in MPS-IIIB fibroblasts corresponds to the stored GAG, heparan sulfate. Transduction of MPS-IIIB fibroblasts with LNCNAG virus resulted in the clearance of ^{35}S -labelled GAG storage to amounts approaching normal (Table 3). The amount of intracellular NAG activity in LNCNAG-transduced fibroblasts was elevated 5.6-fold when compared with normal fibroblasts (Table 3). In contrast, the amount of intracellular NAG activity in LNC48L transduced MPS-IIIB fibroblasts was significantly reduced (1.86 nmol/h per mg) and corresponded to 3.75% of NAG activity in LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts (Table 3). The residual amount of NAG activity in LNC48L-transduced MPS-IIIB fibroblasts resulted in the partial clearance of ^{35}S -labelled GAG storage (55 711 cpm/mg, Table 3) when compared with ^{35}S -labelled GAG storage in control MPS-IIIB fibroblasts (84 351 cpm/mg, Table 3). The expression of the lysosomal enzyme β -hexosaminidase was not affected by the retroviral-mediated gene expression of F48L-NAG and WT-NAG.

Conditioned medium harvested from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts contained 46.6 nmol/h per ml of NAG activity (Table 3). To determine whether this secreted form of NAG was being correctly processed, two groups of MPS-IIIB fibro-

blasts were incubated with 24-h-conditioned medium harvested from LNCNAG-transduced fibroblasts (46.6 nmol/h per ml, Table 3). Incubation with conditioned medium from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts resulted in the partial clearance of ^{35}S -labelled GAG storage and the detection of only a small amount of endocytosed NAG activity in MPS-IIIB fibroblasts (Table 4). The presence of 5 mM M6P in the culture medium prevented the uptake of recombinant NAG by MPS-IIIB fibroblasts and clearance of ^{35}S -labelled GAG storage (Table 4).

3.4. Analysis of I-cell plasma

Plasma from I-cell patients contained elevated amounts of NAG and β -hexosaminidase when compared with normal control plasma samples. However, acid phosphatase, which is targeted to the lysosome independently of the mannose-6-phosphate receptor pathway, was not elevated in I-cell plasma samples when compared with normal control plasma samples (Table 5).

4. Discussion

4.1. Expression of R297X-NAG and F48L-NAG

In this study we investigated the relationship between genotype, cellular biochemistry and clinical phenotype in a F48L/R297X compound heterozygous MPS-IIIB patient with an attenuated Sanfilippo phenotype. Molecular characterisation of this compound heterozygous MPS-IIIB patient was complicated by the presence of two mutant NAG alleles, which together cause an attenuated Sanfilippo phenotype (see Section 2.1). To determine the effect of each mutation on NAG synthesis, sub-cellular distribution and activity, both mutant alleles were engi-

Table 5
Analysis of β -hexosaminidase, NAG and acid phosphatase activity in I-cell plasma

	β -Hexosaminidase (nmol/min per ml)	NAG (nmol/h per ml)	ACP (nmol/min per ml)
Control plasma ($n=3$)	5.83 ± 1.58	19.7 ± 6.3	21.67 ± 5.78
I-cell plasma ($n=3$)	96.1 ± 10.73	316.93 ± 32.36	21.33 ± 3.56

Plasma from normal controls (37, 38, 39) or I-cell patients (285, 256, 257) were assayed for β -hexosaminidase, NAG or acid phosphatase (ACP) using fluorogenic substrates. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

neered into the wild-type NAG cDNA and expressed. The R297X allele displayed no detectable NAG activity when expressed in CHO-KI cells and was observed only as a 34 kDa truncated polypeptide that was rapidly degraded. Skin fibroblasts obtained from a homozygous R297X/R297X patient contained very low levels of NAG activity (0.101 nmol/h per mg total protein, Table 4) and a 12-fold elevated level of ^{35}S -labelled GAG storage when compared with normal fibroblasts. The low levels of NAG activity detected in these fibroblasts may be due to bovine NAG activity derived from the foetal calf serum present in the culture medium or alternatively may be due to a small amount of translational read-through of the R297X mutant allele. The highly elevated levels of ^{35}S -labelled GAG storage in homozygous R297X/R297X skin fibroblasts are consistent with the clinically severe phenotype associated with the R297X allele [9,11].

When over-expressed in CHO-KI cells and analysed via immunoprecipitation, F48L-NAG was detected as a 80 kDa precursor polypeptide that was not cleaved to the mature 77 kDa form or secreted into the medium. Furthermore, the 80 kDa F48L-NAG precursor polypeptide was partially degraded over the 16-h chase period (Fig. 1A). These results suggest that the F48L missense mutation affects the processing and stability of NAG. The F48L precursor polypeptide may correspond to newly synthesised protein that is selectively retained in the endoplasmic reticulum due to incorrect folding and is subsequently degraded. Alternatively, some F48L-NAG may be synthesised as an unstable precursor polypeptide that is transported to the lysosome and rapidly degraded in the hydrolytic environment. When expressed via retroviral-mediated gene transfer in homozygous R297X/R297X MPS-IIIB skin fibroblasts, intracellular F48L-NAG activity corresponded to 3.75% of NAG activity levels in WT-NAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts. This residual level of NAG activity was sufficient to metabolise 34% of intracellular ^{35}S -labelled GAG storage suggesting that some F48L-NAG is being correctly sorted to the lysosomal compartment. The residual level of F48L-NAG activity in the lysosomes of F48L-NAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts and subsequent partial turnover of GAG is consistent with the attenuated clinical phenotype associated

with the F48L allele in patient SB (see Section 2.1).

4.2. Expression of WT-NAG

The WT-NAG cDNA was over-expressed in CHO-KI cells and immunoprecipitated with a rabbit polyclonal antibody to recombinant NAG. To characterise WT-NAG in terms of its maturation, newly synthesised radiolabelled NAG was immunoprecipitated after varying lengths of chase time. Intracellular NAG was detected as a precursor polypeptide of 80 kDa which was successively cleaved to a 78.5 kDa intermediate polypeptide and a mature 77 kDa polypeptide over a 16-h chase time (Fig. 1A). This is in agreement with previous studies in which native NAG has been purified to homogeneity from a number of different tissues ([4,11,18]). The delayed processing of newly synthesised NAG in CHO-KI cells may be expression system-specific rather than NAG specific as we have also observed slow processing of other lysosomal enzymes in CHO-KI cells [19].

As an initial step toward gene therapy in animal models for MPS-IIIB, a retroviral construct that contained WT-NAG cDNA sequence was made (pLNCNAG) and used to transduce cultured MPS-IIIB skin fibroblasts. The pLNCNAG construct was designed to express NAG from the cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter and the neomycin-resistance gene from the viral LTR promoter. Amphotropic LNCNAG virus was generated and used to transduce MPS-IIIB skin fibroblasts. G418-resistant mass cultures of LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts displayed correction of the enzymatic and storage phenotype associated with MPS-IIIB (Table 3). These results suggest that LNCNAG gene-corrected MPS-IIIB fibroblasts express functional NAG that is correctly processed and targeted to the lysosome. Although there was a fivefold elevated level of NAG activity in LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts when compared with normal control fibroblasts, ^{35}S -labelled GAG storage was not completely normalised. This could be due to slightly different growth rates of the normal control fibroblasts and LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts, different rates of incorporation of the ^{35}S -label into GAGs or different amounts of GAG production by the two groups of cells.

LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts secreted detectable levels of NAG activity into the culture medium (46.6 nmol/h per ml, Table 3). This conditioned medium was used in a cross-correction experiment to determine whether the secreted form of WT-NAG was correctly mannose-6-phosphorylated. Incubation of MPS-IIIB skin fibroblasts for an extended chase period (5 days) with conditioned medium from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts resulted in only a small amount of endocytosed intracellular NAG activity which was sufficient to partially reduce ^{35}S -labelled GAG storage (Table 4). No clearance of ^{35}S -labelled GAG storage was observed with shorter chase periods (3 days, results not shown). **In the presence of 5 mM M6P no reduction in ^{35}S -labelled GAG storage was observed. These results suggest that the majority of recombinant WT-NAG secreted from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts is not mannose-6-phosphorylated.** Only a small proportion (0.36%) of WT-NAG secreted from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts is correctly phosphorylated. This small amount of secreted, phosphorylated WT-NAG can be endocytosed by a second population of MPS-IIIB skin fibroblasts via the M6P receptor pathway and be correctly targeted to the lysosome (Table 4).

We have not observed weak phosphorylation of other secreted recombinant lysosomal enzymes expressed in CHO-KI cells or in patient cell lines ([15,19–21]). When directly compared with another recombinant lysosomal enzyme over-expressed in CHO-KI cells, *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase (CHO4S), the M6P receptor-mediated uptake of CHONAG into cultured skin fibroblasts was considerably reduced (Weber et al., unpublished results). Furthermore, in previous cross-correction experiments using *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase gene transduced MPS-VI skin myoblasts, 8.9% (0.664 pmol/min) of the total *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase secreted from the gene-corrected myoblasts (7.45 pmol/min) was endocytosed by a second population of MPS-VI myoblasts via the M6P receptor pathway [22]. In contrast, in this study only 0.36% (1.19 nmol/h) of the total NAG secreted from LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts (329 nmol/h) was endocytosed by a second population of MPS-IIIB fibroblasts via the M6P receptor path-

way (Table 4). **Weak phosphorylation of secreted rNAGLU expressed in HeLa cells has also been observed (G. Yogalingam, unpublished results). These results suggest that weak phosphorylation of secreted WT-NAG is NAG-specific rather than expression system-specific. The causative factors which lead to poor mannose-6-phosphorylation of secreted WT-NAG were not investigated further in this study. We did not determine whether the poor phosphorylation of WT-NAG is due to only a small degree of the enzyme being post-translationally phosphorylated or due to the enzyme being phosphorylated normally but susceptible to very rapid dephosphorylation. These results suggest that the use of secreted recombinant WT-NAG in future enzyme and gene therapy protocols will be severely limited due to its small degree of mannose-6-phosphorylation.**

The importance of targeting lysosomal enzymes via the M6P receptor pathway is demonstrated in patients with I-cell disease. Due to a deficiency of UDP-*N*-acetylgalactosamine phosphotransferase, I-cell patients are unable to transfer M6P moieties onto carbohydrate side chains of lysosomal enzymes. The presence of elevated NAG activity in I cell plasma samples (Table 5) indicates that normally the intracellular form of WT-NAG is correctly phosphorylated and targeted to the lysosome. The results obtained in this study have demonstrated that LNCNAG-transduced MPS-IIIB fibroblasts express intracellular WT-NAG that is correctly targeted to the lysosome and capable of turning over stored GAG. Although the secreted form of WT-NAG is poorly mannose-6-phosphorylated, these initial studies do highlight the potential for using the correctly mannose-6-phosphorylated, intracellular form of recombinant WT-NAG in future gene therapy treatments for MPS-IIIB patients.

Acknowledgements

We thank Drs Donald Anson and Thomas Berg for helpful discussion on the immunoprecipitation and site-directed mutagenesis methods used in this study. The authors are grateful to Ms Kaye Beckman for the purification of recombinant NAG used for the generation of rabbit polyclonal antisera and to Ms Xiao Hui Guo for sequencing the mutagenised

NAG constructs. Polyclonal CHO-KI antiserum was prepared by CSL Ltd. I-cell and control plasma samples were a generous gift from the National Referral Laboratory.

References

- [1] N.M. Dahms, P. Lobel, S. Kornfeld, Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12115–12118.
- [2] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 7th ed., McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 2465–2494.
- [3] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal storage disorders, *J. Am. Med. Assoc.* 281 (1999) 249–254.
- [4] B. Weber, L. Blanch, P.R. Clements, H.S. Scott, J.J. Hopwood, Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B), *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 771–777.
- [5] H.G. Zhao, H.H. Li, G. Bach, A. Schmidtchen, E.F. Neufeld, The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 6101–6105.
- [6] C.E. Beesley, E.P. Young, A. Vellodi, B.G. Winchester, Identification of 12 novel mutations in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type IIIB), *J. Med. Genet.* 35 (1998) 910–914.
- [7] S. Bunge, A. Knigge, C. Steglich, W.J. Kleijer, O.P. van Diggelen, M. Beck, A. Gal, Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B): identification of 18 novel alpha-N-acetylglucosaminidase gene mutations, *J. Med. Genet.* 36 (1999) 28–31.
- [8] A. Schmidtchen, D. Greenberg, H.G. Zhao, H.H. Li, Y. Huang, P. Tieu, H.Z. Zhao, S. Cheng, Z. Zhao, C.B. Whitley, P. Di Natale, E.F. Neufeld, NAGLU mutations underlying Sanfilippo syndrome type B, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 64–69.
- [9] B. Weber, X.H. Guo, W.J. Kleijer, J.J. van-de-Kamp, B.J. Poorthuis, J.J. Hopwood, Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes, *Eur. J. Hum. Genet.* 7 (1999) 34–44.
- [10] H.G. Zhao et al., *Am. J. Hum. Genet.* 57 (1995) A185.
- [11] H.G. Zhao, E.L. Aronovich, C.B. Whitley, Genotype-phenotype correspondence in Sanfilippo syndrome type B, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 53–63.
- [12] J.J. Hopwood, J.R. Harrison, High resolution electrophoresis of urinary glycosaminoglycans: an improved screening test for the mucopolysaccharidoses, *Anal. Biochem.* 119 (1982) 120–127.
- [13] W.S. Pear, G.P. Nolan, M.L. Scott, D. Baltimore, Production of high-titre helper-free retrovirus by transient transfection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8392–8396.
- [14] A.D. Miller, C. Buttimore, Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 2895–2902.
- [15] D.S. Anson, J.A. Taylor, J. Bielicki, G.S. Harper, C. Peters, G.J. Gibson, J.J. Hopwood, Correction of human mucopolysaccharidosis type-VI fibroblasts with recombinant N-acetylgalactosamine-4-sulphatase, *Biochem. J.* 284 (1992) 789–794.
- [16] A.D. Miller, G.J. Rosman, Improved retroviral vectors for gene transfer and expression, *BioTechniques* 7 (1989) 980–990.
- [17] J. Marsh, A.H. Fensom, 4-Methylumbelliferyl alpha-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease, *Clin. Genet.* 27 (1985) 258–262.
- [18] T. Sasaki, K. Sukegawa, M. Masue, S. Fukuda, S. Tomatsu, T. Orii, Purification and partial characterization of alpha-N-acetylglucosaminidase from human liver, *J. Biochem. (Tokyo)* 110 (1991) 842–846.
- [19] G. Yogalingam, J.J. Hopwood, A.C. Crawley, D.S. Anson, Mild feline mucopolysaccharidosis type VI: Identification of an N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutation causing instability and increased specific activity, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13421–13429.
- [20] J. Bielicki, J.J. Hopwood, D.S. Anson, Correction of Sanfilippo A skin fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer, *Hum. Genet. Ther.* 7 (1996) 1965–1970.
- [21] G. Yogalingam, T. Litjens, J. Bielicki, A.C. Crawley, V. Muller, D.S. Anson, J.J. Hopwood, Characterisation of recombinant N-acetylgalactosamine 4-sulfatase and identification of a mutation causing the disease, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27259–27265.
- [22] G. Yogalingam, J. Bielicki, J.J. Hopwood, D.S. Anson, Feline mucopolysaccharidosis type VI: correction of glycosaminoglycan storage in myoblasts by retrovirus-mediated transfer of the feline N-acetylgalactosamine 4-sulfatase gene, *DNA Cell Biol.* 16 (1997) 1189–1194.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CONSULTA DE DOCUMENTOS