

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 933**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009 E 09710178 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2252313**

54 Título: **Método para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico con chaperona de enfermedades**

30 Prioridad:

**12.02.2008 US 28141 P**  
**11.03.2008 US 35684 P**  
**02.09.2008 US 93631 P**  
**11.11.2008 US 113496 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.07.2015**

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**1 Cedar Brook Drive**  
**Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**BENJAMIN, ELFRIDA;**  
**DO, HUNG, V.;**  
**WU, XIAOYANG;**  
**FLANAGAN, JOHN y**  
**WUSTMAN, BRANDON**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 541 933 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico con chaperona de enfermedades

### Campo de la invención

5 La presente invención proporciona métodos para determinar si un paciente con la enfermedad de Fabry se beneficiaría del tratamiento con una chaperona farmacológica específica. La presente descripción también proporciona un método *in vitro* para determinar la capacidad de respuesta enzimática (p. ej.,  $\alpha$ -galactosidasa A,  $\alpha$ -glucosidasa o glucocerebrosidasa) a una chaperona farmacológica (p. ej., 1-desoxigalactonojirimicina, 1-deoxinojirimicina o isofagomina) en una línea celular que expresa una forma mutante de la enzima. La descripción también proporciona un método para diagnosticar un trastorno por acumulación lisosomal (p. ej., enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe o enfermedad de Gaucher) en pacientes que se sospecha que padecen un trastorno por acumulación lisosomal y para implementar el tratamiento adecuado en función del diagnóstico (p. ej., elegir un agente terapéutico particular que administrar al paciente).

### Antecedentes

15 En el cuerpo humano, las proteínas están involucradas en casi todos los aspectos de la función celular. Las proteínas son cadenas lineales de aminoácidos que se pliegan y enroscan en formas tridimensionales específicas para funcionar correctamente. Determinadas enfermedades humanas son el resultado de mutaciones que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína, los cuales reducen su estabilidad y pueden impedir que se pliegue de manera apropiada. La mayoría de las mutaciones genéticas que conducen a la producción de proteínas menos estables o con un plegamiento erróneo se denominan mutaciones en sentido erróneo. Estas mutaciones provocan la sustitución de un aminoácido simple por otro en la proteína. Debido a este error, las mutaciones en sentido erróneo generalmente dan como resultado proteínas que tienen un nivel reducido de actividad biológica. Aparte de las mutaciones en sentido erróneo, también hay otros tipos de mutaciones que pueden dar lugar a proteínas con actividad biológica reducida.

25 Las proteínas generalmente se pliegan en una región específica de la célula conocida como el retículo endoplásmico o RE. La célula tiene mecanismos de control de calidad que aseguran que las proteínas se plieguen en la forma tridimensional correcta antes de que puedan partir del RE hacia el destino apropiado en la célula, proceso al que generalmente se hace referencia como tráfico de proteínas. Las proteínas con plegamiento erróneo generalmente se eliminan por los mecanismos de control de calidad luego de ser inicialmente retenidas en el RE. En determinadas instancias, las proteínas con plegamiento erróneo pueden acumularse en el RE antes de ser eliminadas.

La retención de proteínas con plegamiento erróneo en el RE interrumpe su tráfico apropiado y la actividad biológica reducida resultante puede conducir a una función celular deficiente y finalmente a una enfermedad. Además, la acumulación de proteínas con plegamiento erróneo en el RE puede conducir a diversos tipos de tensión en las células, lo cual también puede contribuir a la disfunción celular y la enfermedad.

35 Las enfermedades por acumulación lisosomal (LSD, por sus siglas en inglés) se caracterizan por deficiencias de las enzimas lisosomales debido a mutaciones en los genes que codifican las enzimas lisosomales. Esto produce la acumulación patológica de los sustratos de dichas enzimas, que incluyen lípidos, carbohidratos y polisacáridos. Existen aproximadamente cincuenta LSD conocidas a la fecha, las cuales incluyen la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Pompe, la enfermedad de Tay Sachs y las mucopolisacaridosis (MPS). La mayoría de las LSD se heredan como un rasgo autosómico recesivo, aunque los varones con la enfermedad de Fabry y MPS II son hemocigotos ya que los genes de la enfermedad se codifican en el cromosoma X. Para la mayoría de las LSD, no se dispone de ningún tratamiento aparte del tratamiento sintomático. Para varias LSD, incluidas Gaucher, Fabry, Pompe y MPS I y VI, se dispone de la terapia de reemplazo enzimático (TRE) que utiliza enzimas recombinantes. Para la enfermedad de Gaucher, también se dispone de la terapia de reducción de sustrato (TRS) en situaciones limitadas. La TRS emplea una pequeña molécula inhibidora de una enzima requerida para la síntesis de glucosilceramida (el sustrato GD). El objetivo de la TRS es reducir la producción del sustrato y reducir la acumulación patológica.

50 Si bien hay muchos genotipos mutantes diferentes asociados con cada LSD, algunas de las mutaciones, incluidas algunas de las mutaciones más prevalentes, son mutaciones en sentido erróneo que pueden conducir a la producción de una enzima menos estable. Estas enzimas menos estables a veces se degradan prematuramente por el sistema de degradación asociado al RE. Esto produce la deficiencia de la enzima en el lisosoma y la acumulación patológica de sustrato. A veces, en la técnica correspondiente, se hace referencia a dichas enzimas mutantes como "mutantes de plegamiento" o "mutantes conformacionales".

### 55 Diagnóstico de la enfermedad de Fabry

Debido a que la enfermedad de Fabry es poco común, implica múltiples órganos, tiene una franja de aparición etaria

amplia y es heterogénea, un diagnóstico adecuado supone un reto. Es poco conocida entre los profesionales sanitarios y los diagnósticos erróneos son frecuentes. Algunos ejemplos de diagnósticos seriamente considerados en pacientes a los que finalmente se les diagnosticó la enfermedad de Fabry incluyen: prolapso de la válvula mitral, glomerulonefritis, proteinuria idiopática, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Whipple, abdomen agudo, colitis ulcerativa, porfiria aguda intermitente y neoplasia maligna oculta. Así pues, incluso para los varones tradicionalmente afectados, el diagnóstico requiere aproximadamente 5-7 años o incluso más. Esto resulta preocupante, ya que cuanto más tiempo padezca una persona la enfermedad de Fabry, más probable será que se produzca un daño mayor en los órganos y tejidos afectados, y que el estado de la persona empeore. El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se suele confirmar sobre la base de una disminución de la actividad de  $\alpha$ -Gal A en leucocitos plasmáticos o periféricos (LEU), una vez que un paciente es sintomático, acompañada de un análisis mutacional. En mujeres, el diagnóstico supone un reto aún mayor ya que la identificación enzimática de mujeres portadoras es menos fiable debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X en algunas células de las portadoras. Por ejemplo, algunas portadoras obligadas (hijas de varones tradicionalmente afectados) tienen actividades enzimáticas de  $\alpha$ -Gal A que varían de actividades normales a muy bajas. Debido a que las portadoras pueden tener una actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A normal en leucocitos, únicamente la identificación de una mutación en  $\alpha$ -Gal A mediante pruebas genéticas proporciona una identificación de portadoras y/o un diagnóstico preciso.

### Tratamiento de la enfermedad de Fabry

Una terapia autorizada para tratar la enfermedad de Fabry es la terapia de reemplazo enzimático, que suele implicar la infusión intravenosa de una forma purificada de la proteína natural correspondiente (Fabrazyme<sup>®</sup>, Genzyme Corp.). Una de las principales complicaciones con la terapia de reemplazo proteínico es la obtención y el mantenimiento de cantidades terapéuticamente eficaces de proteína *in vivo* debido a la rápida degradación de la proteína infundida. La estrategia actual para superar este problema es llevar a cabo numerosas y costosas infusiones de dosis altas.

La terapia de reemplazo proteico presenta varios riesgos adicionales, como dificultades para la generación a gran escala, purificación y acumulación de una proteína debidamente plegada; obtención de una proteína glucosilada natural; generación de una respuesta inmunitaria anti-proteína; e incapacidad de la proteína para atravesar la barrera hematoencefálica para mitigar las patologías del sistema nervioso central (es decir, baja biodisponibilidad). Además, la enzima de reemplazo no puede penetrar en el corazón o el riñón en cantidades suficientes para reducir la acumulación de sustrato en los podocitos renales o miocitos cardíacos, que aparecen predominantemente en la patología de Fabry.

También se está perfeccionando la terapia génica con vectores recombinantes, que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína funcional, o con células humanas modificadas genéticamente, que expresan una proteína funcional, para tratar deficiencias proteínicas y otros trastornos que se benefician del reemplazo proteínico.

Una tercera estrategia relativamente reciente para tratar algunas deficiencias enzimáticas implica el uso de pequeñas moléculas inhibitoras para reducir la producción del sustrato natural de las proteínas deficientes en enzimas, de este modo se atenúa la patología. Esta estrategia de "reducción de sustrato" ha sido específicamente descrita para una clase de aproximadamente 40 trastornos enzimáticos relacionados conocidos como trastornos por acumulación lisosomal que incluyen trastornos por acumulación de glucoesfingolípidos. Las pequeñas moléculas inhibitoras propuestas para emplear como terapia son específicas para inhibir las enzimas implicadas en la síntesis de glucolípidos, reducir la cantidad de glucolípidos celulares que ha de ser metabolizada por la enzima deficiente.

Se ha demostrado anteriormente que la unión de pequeñas moléculas inhibitoras de enzimas asociadas con las LSD puede aumentar la estabilidad tanto de la enzima mutante como de la enzima natural correspondiente (remítase a las Patentes de EE. UU. N.º 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; 6.916.829 y 7.141.582). En particular, se descubrió que la administración de pequeñas moléculas derivadas de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos, selectivos y específicos de varias enzimas lisosomales objetivo, aumentó eficazmente la estabilidad de las enzimas en células *in vitro* y, por lo tanto, aumentó el tráfico de las enzimas al lisosoma. De este modo, al aumentar la cantidad de enzima en el lisosoma, se espera que aumente la hidrólisis de los sustratos enzimáticos. La teoría original que respalda esta estrategia es la siguiente: dado que la proteína enzimática mutante es inestable en el RE (Ishii *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retarda en la vía de transporte normal (RE → aparato de Golgi → endosomas → lisosoma) y se degrada prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se une a una enzima mutante y aumenta su estabilidad puede servir como "chaperona" para la enzima y puede aumentar la cantidad que puede salir del RE y trasladarse hacia los lisosomas. Además, debido a que el plegamiento y el tráfico de algunas proteínas naturales es incompleto, degradándose más del 70% de algunas proteínas naturales en algunos casos antes de llegar a su ubicación celular final, las chaperonas se pueden utilizar para estabilizar enzimas naturales y aumentar la cantidad de enzima que puede salir del RE y trasladarse a los lisosomas. Se ha demostrado que esta estrategia aumenta varias enzimas lisosomales *in vitro* e *in vivo*, entre ellas  $\beta$ -glucocerebrosidasa y  $\alpha$ -glucosidasa, cuyas deficiencias están relacionadas con las enfermedades de Gaucher y de

Pompe, respectivamente.

5 Sin embargo, como se indicó anteriormente, los candidatos aptos para la terapia con SPC deben tener una mutación que provoque la producción de una enzima que tenga el potencial para ser estabilizada y plegada en una conformación que permita su tráfico de salida del ER. Las mutaciones que truncan sumamente la enzima, como mutaciones sin sentido o mutaciones en el dominio catalítico que previene la unión de la chaperona, no tendrán tantas posibilidades de ser “salvables” u “optimizables” empleando terapia con SPC, es decir, responder a la terapia con SPC. A pesar de que las mutaciones en sentido erróneo externas al sitio catalítico tienen más posibilidades de ser salvables empleando SPC, no existe garantía, se requiere una detección de mutaciones sensibles. Esto quiere decir que, incluso cuando la enfermedad de Fabry se diagnostique detectando actividad deficiente de  $\alpha$ -Gal A en LEU, es muy difícil, si no imposible, predecir si un paciente con Fabry particular responderá al tratamiento con una SPC sin beneficio de la presente invención. Además, dado que los LEU sobreviven únicamente un corto periodo de tiempo en cultivo (*in vitro*), la detección de la estimulación de  $\alpha$ -Gal A por acción de SPC es difícil y no es óptima para el paciente.

15 Para aplicar la terapia con SPC de forma eficaz, se debe adoptar un método rápido, eficaz y de amplia aplicación para detectar la capacidad de respuesta de los pacientes a la terapia SPC antes de iniciar el tratamiento. El tratamiento se puede implementar en función de los resultados de la detección. Por lo tanto, en la técnica siguen requiriéndose métodos relativamente no invasivos para evaluar rápidamente la estimulación enzimática con terapias potenciales antes de tomar decisiones sobre el tratamiento, por cuestiones de beneficios tanto de costos como emocionales del paciente.

20

### Resumen de la invención

La invención es definida por las reivindicaciones adjuntas.

25 Una realización de la presente invención proporciona un método para determinar si un paciente será un candidato para la terapia con SPC. Específicamente, la presente descripción proporciona un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de la proteína en presencia o ausencia de una SPC, donde una SPC que aumenta la actividad de la proteína en el ensayo *in vitro* es una SPC que se puede emplear en la terapia con SPC. En una realización, el ensayo *in vitro* comprende expresar una proteína mutante en una célula huésped, poner en contacto la proteína mutante con una SPC candidata y determinar si la proteína mutante que está en contacto con la SPC presenta un mayor nivel de actividad (preferentemente un aumento estadísticamente significativo) en comparación con una proteína mutante expresada en una célula huésped que no está en contacto con la SPC candidata. Cuando una SPC candidata aumenta la actividad de una proteína mutante de acuerdo con el ensayo de la invención, dicha SPC candidata se puede emplear para la terapia con SPC para tratar a un paciente que expresa la misma proteína mutante estudiada en el ensayo *in vitro*.

35

En una realización, la proteína es una enzima. En otra realización, la proteína es una enzima lisosomal. En otra realización más, la proteína es una  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -GAL;  $\alpha$ -GAL A). En otras realizaciones, la proteína es una alfa-glucosidasa ( $\alpha$ -glucosidasa ácida;  $\alpha$ -glucosidasa; GAA). En otras realizaciones, la proteína es una glucocerebrosidasa ( $\beta$ -glucosidasa; Gba; GCase).

40

La presente descripción también incluye la base para la evaluación de SPC como una opción de tratamiento para un número cualquiera de otras anomalías proteicas y/o deficiencias enzimáticas y/o trastornos por plegamiento de proteínas.

45 La presente invención proporciona además un registro por escrito (p. ej., una “tabla de tratamiento de referencia”) que enumera mutaciones proteicas y la capacidad de respuesta de cada una de las mutaciones a la terapia con SPC. Esta lista se puede emplear para determinar las opciones de tratamiento para un paciente, de forma que el paciente o médico o médico especialista del paciente pueda seleccionar la estrategia terapéutica adecuada, por ejemplo, una SPC para el tratamiento por identificación de la mutación proteica del paciente y remisión de la mutación a la lista para identificar si una SPC aumentaría la actividad de la enzima mutante particular del paciente.

50 En otra realización, la “tabla de tratamiento de referencia” enumera mutaciones para una enzima lisosomal y la tabla de tratamiento de referencia se emplea para determinar la mejor estrategia terapéutica para tratar un trastorno por acumulación lisosomal. La proteína es  $\alpha$ -Gal A y la enfermedad es la enfermedad de Fabry. En otras realizaciones de la descripción, la proteína es GAA y la enfermedad es la enfermedad de Pompe. En otras realizaciones, la proteína es Gba y la enfermedad es la enfermedad de Gaucher.

55 En una realización, la tabla de tratamiento de referencia describe formas mutantes de enzima, tal como una enzima lisosomal (p. ej.,  $\alpha$ -Gal A, Gcase y GAA) y las opciones de tratamiento están establecidas para los trastornos por acumulación lisosomal (p. ej., enfermedad de Fabry, Gaucher y Pompe).

En una realización, la descripción también proporciona métodos para crear una tabla de tratamiento de referencia,

en los cuales la tabla de tratamiento de referencia puede ser para cualquier trastorno por plegamiento de proteínas o trastorno tratable con una SPC. Esta clase de enfermedad incluye el resto de trastornos por acumulación lisosomal, fibrosis quística (CFTR) (células epiteliales respiratorias o de glándulas sudoríparas), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL; LPL-adipocitos o células endoteliales vasculares), cáncer (p53; PTEN-células tumorales) y amiloidosis (transtiretina) entre otros.

En otra realización, la presente descripción proporciona métodos para tratar a un paciente que se ha diagnosticado expresa ciertas proteínas mutantes (p. ej., enzimas lisosomales como  $\alpha$ -Gal A), en el que la actividad de la proteína mutante (p. ej.,  $\alpha$ -Gal A), cuando se expresa en una célula huésped, se puede incrementar al administrar una SPC para esa proteína (por ejemplo, 1-deoxigalactonojirimicina, DGJ, como una SPC para  $\alpha$ -Gal A mutante).

La presente descripción también proporciona kits diagnósticos que contienen los componentes requeridos para llevar a cabo el ensayo.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1A-C** muestra un listado de mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida. El texto indica si las células HEK-293 que expresan cada una de las mutaciones enumeradas responden al tratamiento con DGJ en el ensayo de transfección transitoria: cursiva=no se ha ensayado aún; negrita y subrayado=no responde a DGJ; texto normal (sin cursiva, ni negrita, ni subrayado)= responde a DGJ.

La **Figura 2A-C** muestra la capacidad de respuesta de diferentes mutaciones de  $\alpha$ -Gal A al tratamiento con DGJ. La magnitud del incremento en los niveles de actividad de  $\alpha$ -Gal A después del tratamiento con DGJ y los valores de  $CE_{50}$  se enumeran para cada mutación ensayada en la Figura 1A-D que respondió al tratamiento con DGJ. El incremento en la actividad enzimática se muestra como un porcentaje de actividad de  $\alpha$ -Gal A natural.

La **Figura 3** muestra ejemplos representativos de respuestas de  $\alpha$ -Gal A natural y mutante al tratamiento con DGJ. La actividad de  $\alpha$ -Gal A (expresada como nmol/mg de proteína/h de 4-MU liberada) se midió en lisados preparados a partir de células HEK 293 transfectadas incubadas con concentraciones crecientes de DGJ. Una respuesta dependiente de la concentración típica se muestra para L300P y una respuesta negativa típica a DGJ se muestra para R227Q. La natural presenta una actividad basal elevada y por lo tanto no responde a DGJ en este ensayo.

La **Figura 4** muestra que la respuesta a mutaciones en células HEK 293 es comparable a la de linfocitos T, linfoblastos o leucocitos derivados de pacientes *in vivo*. Los niveles de  $\alpha$ -Gal A medidos en tres ensayos diferentes, presentados como porcentaje natural, se comparan para cada mutación examinada. Los niveles de  $\alpha$ -Gal A se midieron en linfocitos T, linfoblastos, leucocitos y células HEK 293 que expresan  $\alpha$ -Gal A mutante antes y después de la exposición a DGJ. Las barras vacías indican el nivel basal (sin tratamiento con DGJ) y las barras llenas indican un nivel elevado después del tratamiento con DGJ.

La **Figura 5** muestra que las mutaciones de  $\alpha$ -Gal A que responden a DGJ están ampliamente distribuidas en la secuencia proteica de  $\alpha$ -Gal A. Las mutaciones de Fabry ensayadas se muestran en la estructura de  $\alpha$ -Gal A secundaria. No se observó correlación significativa entre la respuesta y la ubicación en la secuencia proteica de una mutación, lo que sugiere que tanto las mutaciones sensibles como las que no lo son están ampliamente distribuidas a lo largo de toda la proteína. El color del texto indica la respuesta a DGJ: verde=respone; rojo=no respone; marrón indica que, de las múltiples mutaciones en esa misma ubicación, algunas respondieron al tratamiento con DGJ, mientras que otras no respondieron.

La **Figura 6** muestra los pares de oligonucleótidos cebadores empleados para generar las mutaciones puntuales en el gen  $\alpha$ -Gal A por mutagénesis dirigida.

La **Figura 7** muestra la secuencia de ADNc de  $\alpha$ -Gal A que fue mutada por mutagénesis dirigida.

La **Figura 8** muestra el efecto del tartrato de isofagomina en macrófagos y linfoblastos derivados de pacientes que se aislaron de pacientes con la enfermedad de Gaucher con diferentes mutaciones en su enzima glucocerebrosidasa (Gba; GCase).

La **Figura 9** muestra el efecto sobre los niveles de GL-3 en ratones hR301Q  $\alpha$ -Gal A Tg/KO macho de ocho semanas que se trataron durante 4 semanas con 300 mg/kg de DGJ en agua potable diariamente o con menos frecuencia (4 días de toma/3 días de descanso).

La **Figura 10** muestra un listado de mutaciones de Pompe generadas por mutagénesis dirigida. El texto indica si las células COS-7 que expresan cada una de las mutaciones enumeradas responden al tratamiento con DNJ en el ensayo de transfección transitoria.

La **Figura 11** muestra la secuencia de ácidos nucleicos de la alfa-glucosidasa (GAA) lisosomal humana (N.º de

acceso a GenBank: Y00839).

5 La **Figura 12** muestra la capacidad de respuesta de cuatro mutaciones de GAA diferentes al tratamiento con DNJ en concentraciones de 0  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. El incremento en la actividad enzimática se muestra como actividad específica (nmol/mg de proteína/hora). La Figura 12 también muestra que el DNJ fomentó el procesado de GAA en las formas de 95 / 76 / 70 kDa.

La **Figura 13** muestra la capacidad de respuesta de fibroblastos derivados de pacientes con Pompe al tratamiento con DNJ. Los fibroblastos eran homocigóticos para la mutación P545L o R854X de GAA.

La **Figura 14** muestra la  $CE_{50}$  para la actividad de GAA inducida por DNJ en células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con la mutación P545L de GAA.

10 La **Figura 15** muestra la capacidad de respuesta de linfocitos derivados de pacientes con Pompe al tratamiento con DNJ. Los linfocitos eran homocigóticos para el defecto por corte y empalme de GAA (IVS1AS, T>G, -13) y una mutación por cambio de marco de GAA.

La **Figura 16** muestra la secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la alfa-glucosidasa (GAA) lisosomal humana (N.º de acceso a GenBank: Y00839).

### 15 Descripción detallada

La presente descripción proporciona un ensayo *in vitro* para poder determinar de forma exacta si una SPC estimula la actividad de una proteína mutante.

20 En una realización, la proteína es una enzima lisosomal, en la cual la enzima lisosomal, cuando muta, provoca un trastorno por acumulación lisosomal. Los conceptos de la presente descripción, sin embargo, se pueden aplicar globalmente a cualquier enfermedad o afección caracterizada por proteínas mutantes susceptibles a la terapia con SPC, en la que las proteínas tienen una o más mutaciones específicas que se pueden generar *in vitro*, por ejemplo, por mutagénesis dirigida.

25 En una realización específica, la invención proporciona métodos para determinar si una SPC estimula la actividad enzimática de una enzima  $\alpha$ -Gal A mutante y, por lo tanto, se puede utilizar como tratamiento terapéutico eficaz para un paciente con la enfermedad de Fabry que expresa la misma mutación  $\alpha$ -Gal A.

En otra descripción específica, la invención proporciona métodos para determinar si una SPC estimula la actividad enzimática de una enzima GAA mutante y, por lo tanto, se puede utilizar como tratamiento terapéutico eficaz para un paciente con la enfermedad de Pompe que expresa la misma mutación GAA.

30 En otra realización específica, la descripción proporciona métodos para determinar si una SPC estimula la actividad enzimática de una enzima Gba mutante y, por lo tanto, se puede utilizar como tratamiento terapéutico eficaz para un paciente con la enfermedad de Gaucher que expresa la misma mutación Gba.

35 De acuerdo con los métodos de la presente descripción, se proporcionan ensayos que permiten determinar si un paciente que expresa una enzima lisosomal mutante será un candidato para la terapia con SPC. El nuevo ensayo *in vitro* es extremadamente sensible y se puede llevar a cabo en una célula huésped transfectada con un constructo de ácido nucleico que codifique una enzima lisosomal mutante. Las SPC candidatas específicas se pueden ensayar posteriormente para determinar si la SPC candidata es capaz de incrementar la actividad de la enzima mutante expresada por la célula huésped. Así pues, a diferencia de ensayos que emplean células derivadas de un paciente con un trastorno por acumulación lisosomal, el ensayo de la invención evita pasos lentos como la recogida de una muestra de un paciente, la purificación de células de la muestra y el cultivo de las células de la muestra *in vitro*.

40 La presente descripción también proporciona un método para determinar si un paciente que expresa una proteína mutante (p. ej., una enzima lisosomal) será un candidato para la terapia con SPC, en el que una persona, por ejemplo, el médico o el especialista del paciente, puede buscar la proteína mutante (p. ej., una mutación de una enzima lisosomal) en una tabla de tratamiento de referencia para determinar si la mutación del paciente responderá a la terapia con SPC. La tabla de referencia se genera a partir de los resultados del análisis *in vitro* de la respuesta a SPC en una línea celular que ha sido transformada con un vector de ácido nucleico que codifica la proteína mutante.

45 Además, la descripción también proporciona una "tabla de tratamiento de referencia" que proporciona información que indica si una SPC particular será una terapia apta para estimular la actividad de una mutación de enzima lisosomal específica. La tabla de tratamiento de referencia proporciona información que indica si una SPC candidata puede incrementar la actividad de una enzima lisosomal mutante expresada por una célula huésped. En función de la respuesta de diferentes mutaciones a diferentes terapias con SPC, la presente invención puede proporcionar una

terapia con SPC que se ajuste a la mutación específica del paciente.

En una realización no limitante, la proteína mutante es una enzima lisosomal mutante, como por ejemplo, una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante, y la línea celular se transfecta con un vector de ácido nucleico que codifica la enzima lisosomal mutante.

- 5 En otra realización no limitante, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente con Fabry que incluye el paso de administrar al paciente con Fabry una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), donde el paciente expresa una  $\alpha$ -Gal A mutante, cuya actividad, cuando se expresa en una célula huésped, se puede aumentar si se pone en contacto con una SPC (p. ej., DGJ). Tales mutaciones de  $\alpha$ -Gal A que se pueden tratar de acuerdo con este método incluyen, pero no se limitan a, mutaciones A121T, A156V, A20P, A288D, A288P, A292P A348P, A73V, C52R, C94Y, D234E, D244H, D244N, D264Y, E338K, E341D, E358K, E398K, E48K, E59K, E66Q, F113L, G144V, G183D, G260A, G271S, G325D, G328A, G35R, G373D, G373S, H225R, I219N, I242N, I270T, I289F, I303N, I317T, I354K, I91T, L14P, L166V, L243F, L300F, L310F, L32P, L45R, M267I, M284T, M296I, M296V, M72V, M76R, N224S, N263S, N298K, N298S, N320I, N320Y, N34K, P205R, P259L, P265L, P265R, P293A, P293S, P409S, P40L, P40S, Q279E, Q279H, Q279R, Q280H, Q280K, Q312H, Q321E, Q321R, Q327E, R301P, R342Q, R363C, R363H, R49G, R49L, R49S, S201Y, S276N, S297C, S345P, T194I, V269M, V316E, W340R, W47L y W95S.

En una realización, las siguientes mutaciones de  $\alpha$ -Gal A quedan excluidas de los métodos para tratar a un paciente con Fabry con una dosis terapéuticamente eficaz de DGJ: D244N, E358K, E59K, E66Q, G183D, G325D, I289F, I91T, L45R, M296V, N263S, N320Y, P205R, P40S, Q279E, R342Q, R363C, R49L, V316E.

- 20 Una ventaja del ensayo descrito por la presente invención es su amplio espectro de aplicación a pacientes que son mujeres con un trastorno por acumulación lisosomal ligado al cromosoma X, como la enfermedad de Fabry. Debido a la inactivación del cromosoma X, una muestra extraída de una paciente que es una mujer comprenderá tanto células sanas normales como células mutantes con deficiencia enzimática. Un ensayo para determinar el efecto de SPC sobre dicha muestra mostrará una estimulación de la actividad enzimática debido a la expresión de enzimas naturales normales de las células sanas incluso en el caso en que las células enfermas con la enzima mutante puede que no respondan al SPC. La presente invención vence este obstáculo gracias a que una línea celular transfectada con un vector que codifica una proteína mutante expresará únicamente la forma mutante de la proteína y, por lo tanto, no existirá ninguna proteína natural expresada por la línea celular para provocar dicha pseudoestimulación observada en los ensayos con células derivadas de los pacientes.
- 25 En otra realización no limitante, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente con Pompe que incluye el paso de administrar al paciente con Pompe una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxinojirimicina (DNJ), donde el paciente expresa una GAA mutante, cuya actividad, cuando se expresa en una célula huésped, se puede aumentar si se pone en contacto con una SPC (p. ej., DNJ). Tales mutaciones de GAA que se pueden tratar de acuerdo con este método incluyen, pero no se limitan a, mutaciones E262K, P266S, P285R, P285S, L291F, L291H, L291P, M318K, G377R, A445P, Y455C, Y455F, P457L, G483R, G483V, M519V, S529V, P545L, G549R, L552P, Y575S, E579K, A610V, H612Q, A644P y  $\Delta$ N470.

- 30 En otra realización no limitante, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente con Gaucher que incluye el paso de administrar al paciente con Gaucher una dosis terapéuticamente eficaz de isofagomina (IFG), donde el paciente expresa una Gba mutante, cuya actividad, cuando se expresa en una célula huésped, se puede aumentar si se pone en contacto con una SPC (p. ej., IFG).

## Definiciones

- 35 Los términos utilizados en la presente descripción generalmente tienen los significados habituales que se les dan en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se emplea cada término. A continuación, o en cualquier otra parte en la descripción, se describen algunos términos para proporcionar una orientación adicional para el especialista mediante la descripción de las composiciones y métodos de la invención, cómo producirlos y utilizarlos.

- 50 El término "enfermedad de Fabry" se refiere a un error ligado al cromosoma X del catabolismo de glucoesfingolípidos debido a una actividad de  $\alpha$ -galactosidasa A lisosomal deficiente. Este defecto provoca la acumulación de globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida) y glucoesfingolípidos relacionados en lisosomas endoteliales vasculares del corazón, los riñones, la piel y otros tejidos.

- 55 El término "enfermedad de Fabry atípica" se refiere a pacientes con manifestaciones fundamentalmente cardíacas de la deficiencia de  $\alpha$ -Gal A, es decir, la acumulación progresiva de globotriaosilceramida (GL-3) en células miocárdicas que produce la hipertrofia del corazón, particularmente del ventrículo izquierdo.

Un "portador" es una mujer que posee un cromosoma X con un gen  $\alpha$ -Gal A defectuoso y un cromosoma X con el gen normal, y en la cual la inactivación del cromosoma X del alelo normal está presente en uno o más tipos de

células. Un portador suele ser diagnosticado la enfermedad de Fabry.

El término “enfermedad de Pompe” se refiere a una LSD autosómica recesiva caracterizada por una actividad de alfa-glucosidasa ácida (GAA) deficiente que altera el metabolismo glucogénico lisosomal. La deficiencia enzimática provoca la acumulación glucogénica lisosomal y produce debilitamiento progresivo de los músculos esqueléticos, función cardíaca reducida, insuficiencia respiratoria y/o deterioro del SNC en las últimas etapas de la enfermedad. Las mutaciones genéticas en el gen GAA resultan en una término menor o producen formas mutantes de la enzima con una estabilidad alterada y/o una actividad biológica que provoca, en última instancia, la enfermedad (remítase generalmente a Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid  $\alpha$ -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver *et al.*, eds., McGraw-Hill, Nueva York, 7.<sup>a</sup> ed., páginas 2443-2464). Las tres formas clínicas reconocidas de la enfermedad de Pompe (infantil, juvenil y en adultos) se correlacionan con el nivel de actividad residual de la  $\alpha$ -glucosidasa (Reuser A J *et al.*, 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), *Muscle & Nerve Supplement* 3, S61-S69). Las ASSC (a las cuales también se hace referencia en otras partes como “chaperonas farmacológicas”) representan una nueva estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades genéticas, como los trastornos por acumulación lisosomal (p. ej., enfermedad de Pompe).

La enfermedad de Pompe infantil (de tipo I o A) es la más común y más grave, caracterizada por el retraso del crecimiento, hipotonía generalizada, hiperrofia cardíaca e insuficiencia cardiorespiratoria en el segundo año de vida. La enfermedad de Pompe juvenil (de tipo II o B) es de gravedad intermedia y está caracterizada por unos síntomas musculares predominantes sin cardiomegalia. Los individuos con Pompe juvenil suelen morir antes de cumplir 20 años por insuficiencia respiratoria. La enfermedad de Pompe en adultos (de tipo III o C) suele presentarse como miopatía progresiva lentamente en la adolescencia o en edades tan tardías como los 60 años (Felice K J *et al.*, 1995, *Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature*, *Medicine* 74, 131-135).

En Pompe, se ha demostrado que la  $\alpha$ -glucosidasa se modifica extensamente postraslacionalmente por glucosilación, fosforilación y procesado proteolítico. Se requiere la conversión del precursor de 110 kilodalton (kDa) en formas maduras de 76 y 70 kDa por proteólisis en el lisosoma para una catálisis glucogénica óptima.

Como se emplea en la presente, el término “enfermedad de Pompe” se refiere a todos los tipos de enfermedad de Pompe. Las formulaciones y las pautas posológicas divulgadas en esta solicitud se pueden emplear para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Pompe de tipo I, tipo II o tipo III.

El término “enfermedad de Gaucher” se refiere a una deficiencia de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucocerebrosidasa (Gba) que metaboliza glucocerebrósidos grasos. La grasa se acumula posteriormente, mayoritariamente en el hígado, el bazo y la médula ósea. La enfermedad de Gaucher puede producir dolor, fatiga, ictericia, lesión ósea, anemia e incluso la muerte. Existen tres fenotipos clínicos de la enfermedad de Gaucher. Los pacientes con Gaucher de tipo 1, que se manifiesta a edad temprana o a edad adulta temprana, sufren equimosis fácilmente y experimentan fatiga debido a la anemia, nivel bajo de plaquetas en sangre, hipertrofia del hígado y el bazo, debilitamiento del esqueleto y en algunos casos presentan insuficiencia pulmonar o cardíaca. No hay signos de que afecte al cerebro. En el tipo II, de aparición temprana, la hipertrofia del hígado y el bazo aparece a los 3 meses de edad y afecta de forma extensiva al cerebro. La tasa de mortalidad es elevada a los 2 años. El tipo III se caracteriza por hipertrofia del hígado y el bazo e ictus cerebrales. El gen de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa está localizado en el cromosoma 1q21 humano. Su precursor proteico contiene 536 aminoácidos y su proteína madura tiene una longitud de 497 aminoácidos.

Un “paciente” se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado o se sospecha que padece una enfermedad particular. El paciente puede ser humano o animal.

Un “paciente con la enfermedad de Fabry” se refiere a un individuo al que se ha diagnosticado o se sospecha que padece la enfermedad de Fabry y presenta una  $\alpha$ -Gal A mutada como se define más adelante. Los marcadores característicos de la enfermedad de Fabry se pueden presentar en hemiciotos de hombre y mujeres portadoras con la misma prevalencia, aunque las mujeres suelen verse afectadas con menor intensidad.

Un “paciente con la enfermedad de Pompe” se refiere a un individuo al que se ha diagnosticado o se sospecha que padece la enfermedad de Pompe y presenta una GAA mutada como se define más adelante.

Un “paciente con la enfermedad de Gaucher” se refiere a un individuo al que se ha diagnosticado o se sospecha que padece la enfermedad de Gaucher y que presenta una Gba mutada como se define más adelante.

“ $\alpha$ -Galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A) humana” se refiere a una enzima codificada por el gen *GLA* humano. La enzima  $\alpha$ -Gal A humana está conformada por 429 aminoácidos y tiene el N.º de acceso a GenBank U78027.

En una realización no limitante, la alfa-glucosidasa lisosomal humana ( $\alpha$ -glucosidasa ácida; GAA) es una enzima lisosomal que hidroliza polímeros ligados con enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6 a D-glucosa presentes en glucógeno,

maltosa e isomaltosa. Los nombres alternativos son los siguientes: glucoamilasa; 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolasa; amiloglicosidasa; gamma-amilasa; y exo-1,4- $\alpha$ -glucosidasa. El gen GAA humano ha sido localizado en el cromosoma 17q25.2-25.3 y presenta las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas en el N.º de acceso a GenBank Y00839.

5 El término "gen Gba humano" se refiere al gen que codifica la  $\beta$ -glucosidasa ácida, a la que también se hace referencia como glucocerebrosidasa o Gba. El gen Gba pertenece al cromosoma 1q21 e implica a 11 exones (N.º de acceso a GenBank J03059). También existe un pseudogen homólogo localizado aproximadamente 16 kb en dirección 3' del gen Gba (N.º de acceso a GenBank M16328).

10 La "proteína Gba humana" se refiere a la proteína Gba humana natural. La proteína Gba está compuesta por 536 aminoácidos y tiene el N.º de acceso a GenBank J03059.

15 El término "proteína mutante" incluye una proteína que presenta una mutación en el gen que codifica la proteína que provoca la incapacidad de la proteína para adoptar una conformación estable en las condiciones que suele presentar el RE. El no poder adoptar una configuración estable hace que una cantidad sustancial de la enzima sea degradada, en vez de ser transportada al lisosoma. Una mutación de este tipo se conoce a veces como "mutación conformacional". Estas mutaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones en sentido erróneo y pequeñas deleciones e inserciones en fase.

20 Como se emplea en la presente en una realización, el término " $\alpha$ -Gal A mutante" incluye una  $\alpha$ -Gal A que presenta una mutación en el gen que codifica  $\alpha$ -Gal A que provoca la incapacidad de la enzima para adoptar una conformación estable en las condiciones que suele presentar el RE. El no poder adoptar una configuración estable hace que una cantidad sustancial de la enzima sea degradada, en vez de ser transportada al lisosoma.

25 Los ejemplos no limitantes de mutaciones de  $\alpha$ -Gal A asociadas con la enfermedad de Fabry que producen una  $\alpha$ -Gal A inestable incluyen: L32P; N34S; T41I; M51K; E59K; E66Q; I91T; A97V; R100K; R112C; R112H; F113L; T141L; A143T; G144V; S148N; A156V; L166V; D170V; C172Y; G183D; P205T; Y207C; Y207S; N215S; A228P; S235C; D244N; P259R; N263S; N264A; G272S; S276G; Q279E; Q279K; Q279H; M284T; W287C; I289F; M296I; M296V; L300P; R301Q; V316E; N320Y; G325D; G328A; R342Q; E358A; E358K; R363C; R363H; G370S; y P409A.

Como se emplea en la presente en una realización, el término "GAA mutante" incluye una GAA que presenta un mutación en el gen que codifica GAA que provoca la incapacidad de la enzima para adoptar una conformación estable en las condiciones que suele presentar el RE. El no poder adoptar una configuración estable hace que una cantidad sustancial de la enzima sea degradada, en vez de ser transportada al lisosoma.

30 Como se emplea en la presente en una realización, el término "Gba mutante" incluye una Gba que presenta un mutación en el gen que codifica Gba que provoca la incapacidad de la enzima para adoptar una conformación estable en las condiciones que suele presentar el RE. El no poder adoptar una configuración estable hace que una cantidad sustancial de la enzima sea degradada, en vez de ser transportada al lisosoma.

35 Como se emplea en la presente, el término "chaperona farmacológica específica" ("SPC") o "chaperona farmacológica" se refiere a cualquier molécula incluida una pequeña molécula, proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, etc. que se une específicamente a una proteína y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) fomenta la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) promueve el tráfico de la proteína desde el RE hasta otra ubicación celular, preferentemente una ubicación celular nativa, es decir, evita la degradación de la proteína asociada con el RE; (iii) evita la agregación de proteínas con plegamiento erróneo; y/o (iv) restaura o incrementa al menos la función natural y/o la actividad parcial de la proteína. Que un compuesto se una específicamente a una enzima, p. ej.,  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba, quiere decir que se une y ejerce un efecto de chaperona sobre la enzima, y no sobre un grupo genérico de enzimas relacionadas o no. Más específicamente, este término no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, ni a agentes no específicos que han demostrado actividad de chaperona no específica frente a diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, es decir, chaperonas químicas (remítase a Welch *et al.*, *Cell Stress and Chaperones* 1996; 1(2):109-115; Welch *et al.*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1997; 29(5):491-502; Patente de EE. UU. N.º 5.900.360; Patente de EE. UU. N.º 6.270.954 y Patente de EE. UU. N.º 6.541.195). En la presente invención, la SPC puede ser un inhibidor competitivo reversible.

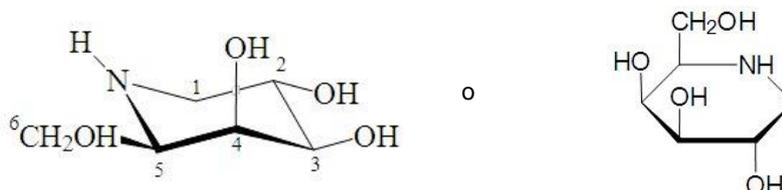
50 Un "inhibidor competitivo" de una enzima se puede referir a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y geometría molecular del sustrato enzimático para unirse a la enzima aproximadamente en la misma ubicación que el sustrato. Así pues, el inhibidor compite por el mismo sitio activo que la molécula de sustrato, de este modo aumenta la Km. La inhibición competitiva suele ser reversible si se dispone de suficientes moléculas de sustrato para desplazar al inhibidor, es decir, los inhibidores competitivos se pueden unir reversiblemente. Por lo tanto, la cantidad de inhibición enzimática depende de la concentración de inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

A continuación se presenta una descripción de algunas chaperonas farmacológicas específicas (SPC) contempladas

por esta invención:

En una realización no limitante particular, la SPC es 1-desoxigalactonojirimicina que se refiere a un compuesto con las siguientes estructuras:

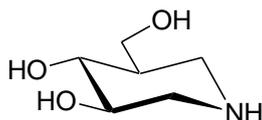
5



10 o una sal, un éster o un profármaco farmacéuticamente aceptable de la 1-desoxigalactonojirimicina. La sal clorhidrato de DGJ se conoce como clorhidrato de migalastat (Migalastat).

Otras SPC para  $\alpha$ -GAL se describen en las Patentes de EE. UU. 6.274.597, 6.774.135, y 6.599.919 de Fan *et al.*, e incluyen  $\alpha$ -3,4-di-epi-homonojirimicina, 4-epi-fagomina, y  $\alpha$ -alo-homonojirimicina, N-metil-desoxigalactonojirimicina,  $\beta$ -1-C-butil-desoxigalactonojirimicina y  $\alpha$ -galacto-homonojirimicina, calistegina A<sub>3</sub>, calistegina B<sub>2</sub>, calistegina B<sub>3</sub>, N-metil-calistegina A<sub>3</sub>, y N-metil-calistegina B<sub>2</sub> y N-metil-calistegina B<sub>3</sub>.

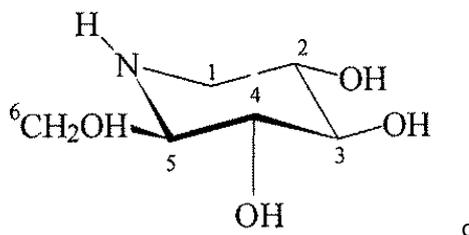
15 En una realización particular no limitante, la SPC es isofagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidinediol) representada por la siguiente fórmula:

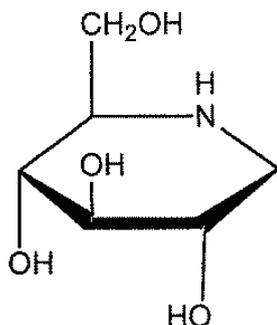


20 o una sal, un éster o un profármaco farmacéuticamente aceptable de la isofagomina, tal como, por ejemplo, tartrato de IFG (remítase, por ejemplo, a la Publicación de la Solicitud de Patente de EE. UU. 20070281975.) La IFG tiene la fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> y un peso molecular de 147.17. Este compuesto se describe con más detalle en las Patentes de EE. UU. 5.844.102 de Sierks *et al.* y 5.863.903 de Lundgren *et al.*

Otras SPC más para Gba se describen en la patente de EE. UU. 6.916.829 de Fan *et al.* e incluyen C-bencil-isofagomina y derivados, N-alquil (C9-12)-DNJ, Glucoimidazol (y derivados), C-alquil-IFG (y derivados), N-alquil- $\beta$ -valeinaminas, Flufenozina, N-dodecil-DNJ, calisteginas A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>.

25 En una realización particular no limitante, la SPC es 1-desoxinorjirimicina (1-DNJ) representada por la siguiente fórmula:





o una sal, un éster o un profármaco farmacéuticamente aceptable de la 1-desoxinorjirimicina. En una realización, la sal es la sal clorhidrato (es decir, 1-desoxinorjirimicina-HCl).

- 5 Otras SPC más para GAA se describen en las Patentes de EE. UU. N.<sup>os</sup> 6.274.597; 6.583.158; 6.599.919 y 6.916.829 de Fan *et al.* y la Solicitud Publicada de EE. UU. N.<sup>o</sup> 2006/0264467, e incluyen N-metil-DNJ, N-etil-DNJ, N-propil-DNJ, N-butil-DNJ, N-pentil-DNJ, N-hexil-DNJ, N-heptil-DNJ, N-octil-DNJ, N-nonil-DNJ, N-metilciclopropil-DNJ, N-metilciclopentil-DNJ, N-2-hidroxi-etil-DNJ, 5-N-carboxipentil-DNJ,  $\alpha$ -homonorjirimicina y castanospermina.

10 Como se emplea en la presente, el término “se une específicamente” se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con una proteína, como  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA, específicamente, a una interacción con residuos aminoacídicos de la proteína que participan directamente en el contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína objetivo, por ejemplo,  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA, para ejercer un efecto de chaperona sobre la proteína y no sobre un grupo genérico de enzimas relacionadas o no. Los residuos aminoacídicos de una proteína que interaccionan con una chaperona farmacológica dada cualquiera  
15 pueden o no estar localizados en el “sitio activo” de la proteína. La unión específica se puede evaluar mediante ensayos de unión rutinarios o mediante estudios estructurales, p. ej., cristalización conjunta, RMN y similares. El sitio activo para  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA es el sitio de unión del sustrato.

La término “actividad de  $\alpha$ -Gal A deficiente” se refiere a la actividad de  $\alpha$ -Gal A en las células de un paciente que es inferior al rango normal en comparación (empleando los mismos métodos) con la actividad en individuos normales que no padecen o no se sospecha que padecen Fabry ni ninguna otra enfermedad (especialmente una hemopatía).  
20

La término “actividad de Gba deficiente” se refiere a la actividad de Gba en las células de un paciente que es inferior al rango normal en comparación (empleando los mismos métodos) con la actividad en individuos normales que no padecen o no se sospecha que padecen Gaucher ni ninguna otra enfermedad.

La término “actividad de GAA deficiente” se refiere a la actividad de GAA en las células de un paciente que es inferior al rango normal en comparación (empleando los mismos métodos) con la actividad en individuos normales que no padecen o no se sospecha que padecen Pompe ni ninguna otra enfermedad.  
25

Como se emplea en la presente, los términos “estimula la actividad de  $\alpha$ -Gal A”, “estimula la actividad de Gba” y “estimula la actividad de GAA” o “aumenta la actividad de  $\alpha$ -Gal A”, “aumenta la actividad de Gba” y “aumenta la actividad de GAA” se refieren al aumento de la cantidad de  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA, respectivamente, que adopta una conformación estable en una célula que está en contacto con una chaperona farmacológica específica para la  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA, en comparación con la cantidad en una célula (preferentemente el mismo tipo de célula o la misma célula, p. ej., en un momento previo) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para la  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA. Estos términos también se refieren al aumento del tráfico de  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA al lisosoma en una célula que está en contacto con una chaperona farmacológica específica para la  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA, en comparación con el tráfico de  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA sin estar en contacto con la chaperona farmacológica específica para la proteína. Estos términos se refieren tanto a  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA naturales como mutantes. En una realización, el aumento de la cantidad de  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA en la célula se evalúa midiendo la hidrólisis de un sustrato artificial en lisados de células que han sido tratadas con la SPC. Un aumento en la hidrólisis indica un aumento en la actividad de  $\alpha$ -Gal A, Gba o GAA.  
30  
35

El término “actividad de  $\alpha$ -Gal” se refiere a la función fisiológica normal de una  $\alpha$ -Gal A natural en una célula. Por ejemplo, la actividad de  $\alpha$ -Gal A incluye la hidrólisis de GL-3.  
40

El término “actividad de Gba” se refiere a la función fisiológica normal de una  $\alpha$ -Gba natural en una célula. Por ejemplo, la actividad de Gba incluye el metabolismo de glucocerebrósidos grasos.

El término “actividad de GAA” se refiere a la función fisiológica normal de una GAA natural en una célula. Por ejemplo, la actividad de GAA incluye el metabolismo glucogénico lisosomal.

Un “paciente que responde” es un individuo al que se le ha diagnosticado o que se sospecha que padece un trastorno por acumulación lisosomal, como por ejemplo, pero sin limitarse a, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe o enfermedad de Gaucher, cuyas células experimentan una actividad de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba suficientemente incrementada, respectivamente, y/o la mejoría de los síntomas o una mejora en marcadores indirectos, como respuesta al contacto con una SPC. Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos para las enfermedades de Fabry y Pompe se presentan en las Patentes de EE. UU. con N.<sup>os</sup> de serie 60/909.185 y 61/035.869, respectivamente.

Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos para la enfermedad de Fabry presentados en la Patente de EE. UU. con N.<sup>o</sup> de serie 60/909.185 incluyen aumentos en los niveles o la actividad de  $\alpha$ -GAL A en células (p. ej., fibroblastos) y tejido; reducciones de la acumulación de GL-3; disminución de concentraciones en plasma de homocisteína y molécula de adhesión celular vascular-1 (MACV-1); disminución de acumulación de GL-3 en las células miocárdicas y fibrocitos valvulares; reducción de la hipertrofia cardíaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejoría de la insuficiencia valvular y de arritmias; mejoría de la proteinuria; disminución de concentraciones urinarias de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida, y mayores concentraciones urinarias de glucosilceramida y esfingomielinina (Fuller *et al.*, *Clinical Chemistry*. 2005; 51: 688-694); la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos “cebra”) en células epiteliales glomerulares; mejoras en la función renal; alivio de la hipohidrosis, la ausencia de angioqueratomas; y mejorías en anomalías auditivas tales como la pérdida de la audición sensorineural de alta frecuencia, pérdida progresiva de la audición, sordera súbita o tinnitus. Las mejorías en síntomas neurológicos incluyen la prevención del ataque isquémico transitorio (AIT) o accidente cerebrovascular; y mejoría del dolor neuropático que se manifiesta como acroparestesia (ardor u hormigueo en las extremidades).

La dosis que consigue una o más de las respuestas mencionadas anteriormente es una “dosis terapéuticamente eficaz”.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y que generalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un humano. Preferentemente, como se emplea en la presente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal, o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas reconocidas en general para uso en animales y más particularmente en humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo junto al cual se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Se emplean preferentemente como portadores agua o soluciones salinas acuosas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. En “*Remington’s Pharmaceutical Sciences*” de E.W. Martin, 18.<sup>a</sup> edición u en otras ediciones, se describen portadores farmacéuticos adecuados.

Como se emplea en la presente, el término “aislado” significa que el material de referencia se retira del entorno en el que normalmente se encuentra. De este modo, un material biológico aislado puede carecer de componentes celulares, es decir, componentes de las células en las cuales se encuentra o se produce el material. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se escinde preferentemente del cromosoma en el que se puede encontrar y más preferentemente ya no está unido a regiones no reguladoras y no codificantes, ni a otros genes, ubicados en el extremo 5’ o en el extremo 3’ del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En otra realización más, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Así pues, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los cuales se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se extrae del sitio anatómico en el cual se encuentra en un organismo. Un material aislado puede que esté purificado, pero no es necesario que lo esté.

El término “aproximadamente” generalmente significará un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Generalmente, los grados de error ilustrativos están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor o rango de valores dado. Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, el término “aproximadamente” puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 10 ó 5 veces más y más preferentemente dentro del doble de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término “aproximadamente” puede inferirse cuando no se indique expresamente.

#### **Método para determinar las opciones de tratamiento**

Para determinar fácilmente si la terapia con SPC sería un tratamiento viable para pacientes, por ejemplo, pacientes con Fabry, Pompe o Gaucher, y que incluyen mujeres portadoras de trastornos por acumulación lisosomal ligados al cromosoma X como la enfermedad de Fabry, se desarrolló un ensayo de rescate con SPC simple y no invasivo de la actividad de la proteína en una línea celular que expresa una forma mutante de la proteína.

#### 5 **Ensayo *in vitro***

En una realización, el método diagnóstico supone transformar una línea celular con un vector de ácido nucleico que codifica una enzima lisosomal mutante, por ejemplo,  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba. Posteriormente, la línea celular se trata con o sin una SPC, p. ej., DGJ, DNJ o IFG, durante un periodo de tiempo suficiente para comprobar la estimulación (es decir, el aumento) de la actividad de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba. Posteriormente, se lisan las células transformadas y el lisado se emplea en un ensayo para determinar la actividad enzimática. Un aumento suficiente en la actividad de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba en los lisados de células tratadas con la SPC respecto a la actividad en las formas lisadas de células sin tratar indica que un paciente que expresa  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba con la misma mutación que la línea celular es probable que responda a la terapia con SPC (es decir, el paciente será un “paciente que responde”).

#### 15 **Transfección transitoria de una línea celular y expresión de una enzima lisosomal mutante**

En una realización, para identificar las mutaciones sensibles a SPC, se pueden generar todas las mutaciones de enzimas lisosomales conocidas (p. ej.,  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba), por ejemplo, mutaciones en sentido erróneo y pequeñas deleciones e inserciones en fase, de acuerdo con técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, por mutagénesis dirigida. Posteriormente, los constructos enzimáticos mutantes se pueden expresar de forma transitoria en una línea celular, por ejemplo, células COS-7, HEK-293 o GripTite 293 MSR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.) de mamífero. Las células transformadas se pueden incubar posteriormente con concentraciones crecientes de SPC y la actividad enzimática se puede medir en lisados celulares.

**Mutagénesis:** Se pueden generar vectores de ácido nucleico que codifican una proteína mutante (p. ej.,  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante) mediante técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. Estas técnicas se explican con todo detalle en la bibliografía (remítase, p. ej., a Sambrook, Fritsch & Maniatis, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Glover, ed., 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II, segunda edición; Gait, M.J., ed., 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A practical approach*; Hames, B.D. & Higgins, S.J. eds., 1985, *Nucleic Acid Hybridization*; Hames, B.D. & Higgins, S.J., eds., 1984, *Transcription And Translation*; Freshney, R.I., 2000, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*; Woodward, J., 1986, *Immobilized Cells And Enzymes: A practical approach*, IRL Press; Perbal, B.E., 1984, *A Practical Guide To Molecular Cloning*). Por ejemplo, se puede introducir una única mutación de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba en un ácido nucleico que codifica un gen  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba natural por mutagénesis dirigida de un ácido nucleico que codifica la enzima natural.

**Expresión y transfección transitoria:** Las secuencias codificantes del gen que se va a suministrar, por ejemplo, un  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante, están unidas operablemente a secuencias de control de la expresión, p. ej., un promotor que dirige la expresión del gen. Como se emplea en la presente, la frase “unidas operablemente” se refiere a la relación funcional de un polinucleótido/gen con secuencias de nucleótidos reguladoras y efectoras, como promotores, estimuladores, sitios de terminación de la transcripción y traducción, y otras secuencias señal. Por ejemplo, la unión operativa de un ácido nucleico a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el polinucleótido y el promotor de forma que la transcripción del ADN comience en el promotor por acción de una ARN polimerasa que reconoce y se une específicamente al promotor. El promotor dirige la transcripción del ARN del polinucleótido. La expresión de una proteína mutante (p. ej.,  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante) puede ser controlada por cualquier elemento promotor/estimulador conocido en la técnica, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el huésped seleccionado para la expresión.

En una realización específica, se emplea un vector en el que las secuencias codificantes y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, de esta forma se garantiza la expresión del constructo de una molécula de ácido nucleico que ha sido integrada en el genoma (remítase a Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438; la Patente de EE. UU. N.º 6.244.113 de Zarlring *et al.*; y la Patente de EE. UU. N.º 6.200.812 de Pati *et al.*).

El término “célula huésped” se refiere a cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transforma, cultiva, o se emplea o manipula de alguna forma para que la célula produzca una sustancia, por ejemplo, la expresión por parte de la célula de un gen, una secuencia de ADN o RNA, una proteína o una enzima. En una realización, una célula huésped que ha sido transfectada con un vector que codifica una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante se puede emplear en la detección de una SPC candidata, por ejemplo, DGJ, DNJ o IFG, para determinar si la SPC candidata es un compuesto eficaz para aumentar la actividad de la  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante expresada por la célula huésped.

El término "sistema de expresión" se refiere a una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por un ADN exógeno que es portado por el vector e introducido en la célula huésped. Los sistemas de expresión incluyen células huésped y vectores de mamíferos. Las células adecuadas incluyen células PC12, células CHO, células HeLa, células GripTite 293 MSR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.), células HEK-293 (también conocidas como células 293) y 293T (derivadas de células renales embrionarias humanas), células COS (p. ej., células COS-7), mioblastos primarios de ratón y células NIH 3T3.

Los vectores adecuados incluyen virus, como adenovirus, virus asociados a adenovirus (VAA), vaccinia, herpesvirus, baculovirus y retrovirus, parvovirus, lentivirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos, ADN desnudo, complejos ADN-lípido y otros vehículos de recombinación que se suelen emplear en la técnica que han sido descritos para la expresión en varios huéspedes eucariotas y procariotas, y se pueden emplear para la terapia génica así como también para la expresión proteica simple.

En un ejemplo no limitante, la transfección transitoria se puede llevar a cabo en células GripTite 293 MSR (*Invitrogen Corp.*, Carlsbad, CA, EE. UU.) empleando el reactivo Fugene de alto rendimiento (*Roche*). Las células se pueden sembrar en un recipiente de ensayo adecuado, tal como una placa de 96 pocillos (Costar) con una densidad de, por ejemplo, 7.5-10k células/pocillo, y se pueden incubar en condiciones adecuadas, como por ejemplo, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas antes de la transfección. Después de la transfección con constructos de expresión que contienen una  $\alpha$ -Gal A mutante específica, las células se pueden incubar de nuevo, por ejemplo, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora antes de agregar DGJ de 50 nM a 1 mM. Las células se pueden incubar posteriormente durante 4-5 días antes de la lisis y el ensayo.

**Ensayo de estimulación/actividad enzimática:** Normalmente, después de incubar con una SPC (p. ej., DGJ, DNJ o IFG), las células huésped se lisan por adición de tampón de lisis (o agua desionizada) y perturbación física (pipetear, agitar en vórtex y/o agitar, y/o someter a ultrasonidos) a temperatura ambiente o sobre hielo, seguida de la extracción de los lisados combinados sobre hielo, posteriormente se divide la combinación de listados en alícuotas pequeñas y se congela.

Los lisados se pueden descongelar inmediatamente antes del ensayo y se deben suspender empleando una mezcladora tipo vórtex y someter a ultrasonidos antes de agregarlos a los pocillos adecuados, p. ej., en una microplaca. En el contexto de la enfermedad de Fabry, se agrega posteriormente N-acetilgalactosamina (GalNAc) a cada pocillo (para inhibir la  $\alpha$ -galactosidasa B), seguida de una breve incubación. Posteriormente se agrega 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (4-MU Gal) u otro sustrato DGJ debidamente marcado y la placa se mezcla suavemente durante un periodo de tiempo breve, se cubre y se incuba a 37 °C durante un tiempo suficiente para la hidrólisis del sustrato, normalmente aproximadamente 1 hora. Para detener la reacción, se agrega tampón de NaOH-glicina, pH 10.7, a cada pocillo y la placa se lee en un lector de fluorescencia en placas (p. ej., Wallac 1420 Victor3™ o un instrumento similar). Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron habitualmente a 355 nm y 460 nm, respectivamente. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por hora. Para cada muestra de un paciente al menos tres muestras normales se pueden evaluar al mismo tiempo.

Será posible que un experto en la técnica consiga llevar a cabo fácilmente varias modificaciones de este ensayo. Los ejemplos de sustratos artificiales que se pueden emplear para detectar la actividad de  $\alpha$ -Gal A incluyen, pero no se limitan a, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y 4-MU GAL. Obviamente, serán adecuados para emplear únicamente sustratos que se pueden escindir con  $\alpha$ -Gal A. Cabe destacar que aunque se prefiera emplear un sustrato fluorogénico, se contempla el uso de otros métodos para determinar la actividad enzimática en el método, incluido el uso de sustratos cromogénicos o técnicas de inmunocuantificación.

En un ejemplo específico, después de incubar con una SPC, por ejemplo, DGJ, las células huésped se pueden lavar dos veces con PBS, posteriormente se pueden incubar en 200  $\mu$ l de medio recién preparado a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante dos horas, seguido de 2 lavados con PBS adicionales. A continuación, las células se pueden lizar en 60  $\mu$ L de tampón de lisis (citrato sódico 27 mM/fosfato sódico dibásico 46 mM, 0.5% de Triton X-100, pH 4.6). Posteriormente, se pueden agregar 10  $\mu$ L de lisado a 50  $\mu$ L de tampón de ensayo (tampón de lisis sin Triton X-100, pero que contiene 4-MU- $\alpha$ -D-galactopiranosido (4-MUG) 6 mM y N-acetil-D-galactosamina (GalNac) 117 mM) y se incuba a 37 °C durante 1 h. Se pueden agregar posteriormente 70  $\mu$ L de solución de terminación (glicina 0.4 M, pH 10.8) y la fluorescencia se lee en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Se puede sustraer el fondo definido por el recuento de la solución que contiene sustrato únicamente del recuento de la fluorescencia bruta. Se empleó un kit de ensayo para proteínas MicroBCA (*Pierce*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para determinar la concentración de proteína en 40  $\mu$ L de lisado celular. Se procesó una curva estándar para la 4-metilumbeliferona (4-MU) con concentraciones de 30  $\mu$ M a 1.3 nM en paralelo para calcular la actividad absoluta de  $\alpha$ -Gal A expresada como nmol/mg de proteína/h o se normalizó posteriormente para % de actividad de la enzima natural sin tratar.

**Tabla de tratamiento de referencia**

En otra realización, los métodos descritos anteriormente se pueden emplear para generar una “tabla de tratamiento de referencia” o “tabla de terapia de tratamiento”, donde la tabla de tratamiento de referencia es una lista de mutaciones proteicas y donde la tabla indica la capacidad de respuesta de cada mutación a una SPC, tal como DGJ, DNJ o IFG. La tabla de tratamiento de referencia se puede emplear posteriormente para determinar si una SPC particular, por ejemplo, DGJ, DNJ o IFG, podría ser una SPC eficaz para tratar a un paciente con una mutación de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba particular, respectivamente.

Como se emplea en la presente, “tabla de terapia de tratamiento” o “tabla de tratamiento de referencia” se refiere a cualquier registro por escrito que indica si una mutación particular responde a la terapia con SPC y no se limita necesariamente a los registros por escrito presentados en forma tabular.

En una realización, la tabla de tratamiento de referencia puede ser empleada por un médico o especialista para seleccionar una SPC para tratar a un paciente, por ejemplo, un paciente con Fabry, Pompe o Gaucher que expresa una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante específica, respectivamente, donde la SPC se selecciona porque la tabla de tratamiento de referencia identifica la SPC como un compuesto que puede aumentar la actividad de la  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante del paciente cuando la  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante se expresa en una célula huésped.

**Trastornos tratables**

Aunque la presente solicitud haya sido presentada en gran parte en el contexto de las enfermedades de Fabry, Pompe y Gaucher, y las SPC DGJ, DNJ y IFG, respectivamente, se debe sobreentender que es aplicable a cualquier SPC y enfermedad. En una realización no limitante, se puede generar una tabla de tratamiento de referencia para cualquier SPC candidata y cualquier trastorno por acumulación lisosomal o cualquier trastorno que implique el plegamiento erróneo de proteínas. Estas enfermedades incluyen otros trastornos por acumulación lisosomal, por ejemplo, fibrosis quística (CFTR) (células epiteliales respiratorias o de glándulas sudoríparas), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL; LPL-adipocitos o células endoteliales vasculares), cáncer (p53; PTEN-células tumorales), enfermedad de Alzheimer ( $\alpha$ -secretasa), enfermedad de Parkinson (glucocerebrosidasa), obesidad (MC4R) y amiloidosis (transtiretina) entre otros.

**Criterios de determinación de elegibilidad**

Los criterios para determinar la elegibilidad para una terapia con SPC depende del tipo de *GLA*, *GAA* o *Gba* mutante que exprese un paciente. En una realización, los pacientes con la enfermedad de Fabry, Pompe o Gaucher se podrían categorizar como aptos para la terapia con SPC si la actividad de  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba, respectivamente, en una célula huésped que expresa la misma mutación que el paciente, en presencia de una SPC, tal como DGJ, DNJ o IFG, fuera al menos 1.5 a 20 veces más (de 2% a 100%) que la actividad de una célula huésped que expresa una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba natural.

Este descubrimiento proporciona un método para mejorar el diagnóstico y facilitar las decisiones concernientes al tratamiento clínico de las enfermedades de Fabry, Pompe y Gaucher, en particular, y del trastorno por acumulación lisosomal en general. Además, este método se puede extender a un gran rango de enfermedades definidas genéticamente en tipos de células adecuados. Esta clase de enfermedades incluyen el resto de trastornos por acumulación lisosomal, fibrosis quística (CFTR) (células epiteliales respiratorias o de glándulas sudoríparas), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL; LPL-adipocitos o células endoteliales vasculares), cáncer (p53; PTEN-células tumorales), enfermedad de Alzheimer ( $\alpha$ -secretasa), enfermedad de Parkinson (glucocerebrosidasa), obesidad (MC4R) y amiloidosis (transtiretina) entre otros.

**Kits**

La presente descripción también proporciona un kit de prueba diagnóstico comercial para tomar las decisiones concernientes al tratamiento terapéutico. El kit proporciona todos los materiales indicados anteriormente, y más particularmente en los Ejemplos que se presentan a continuación, para preparar y llevar a cabo cada prueba en un envase conveniente, que opcionalmente incluye instrucciones y un manual analítico.

A modo de ejemplo no limitante, un kit para evaluar la actividad de  $\alpha$ -Gal A puede contener, como mínimo:

- a. un panel de células huésped, donde cada una expresa una  $\alpha$ -Gal A mutante, o como alternativa, una célula huésped, un vector que codifica una  $\alpha$ -Gal A mutante y un medio para transfectar la célula huésped de forma que la célula huésped exprese la  $\alpha$ -Gal A mutante;
- b. una chaperona farmacológica específica;
- c. un sustrato cromogénico o fluorogénico para el ensayo enzimático (que incluye un estándar adecuado); y
- d. GalNAc.

El kit también puede contener instrucciones para llevar a cabo de forma óptima el ensayo de estimulación de la proteína. En otra realización, el kit contendrá los tubos, los tampones (p. ej., tampón de lisis) y las microplacas adecuados.

En una realización, la SPC se suministra en forma seca y será reconstituida antes de la adición.

- 5 Los pacientes que expresan una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante cuyo análisis es positivo para la estimulación enzimática con una SPC candidata en ensayos de la presente invención se pueden tratar posteriormente con ese agente SPC candidato, mientras que para los pacientes que expresan una  $\alpha$ -Gal A, GAA o Gba mutante que no presenta estimulación enzimática con una SPC candidata se puede obviar el tratamiento lo cual supondría un ahorro de dinero y evitaría el desgaste emocional por la falta de respuesta a la modalidad de tratamiento.

## 10 EJEMPLOS

La presente invención se describe además por medio de los ejemplos que se presentan continuación. El uso de dichos ejemplos es ilustrativo solamente y no limita el alcance ni el significado de la invención ni de cualquiera de los términos ejemplificados en ningún modo. De forma análoga, la invención no se limita a ninguna de las realizaciones preferidas particulares descritas en la presente. De hecho, muchas modificaciones y variantes de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta descripción. Por lo tanto, la invención queda limitada solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance total de los equivalentes posibles que se deriven de las reivindicaciones.

20 EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones que provocan la enfermedad de Fabry y que son sensibles a la chaperona farmacológica DGJ

El presente ejemplo proporciona el ensayo diagnóstico *in vitro* para determinar la capacidad de respuesta de un paciente con Fabry a una chaperona farmacológica específica.

## 25 Introducción

La enfermedad de Fabry es un trastorno por acumulación lisosomal provocado por mutaciones en el gen que codifica la  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -GAL A). Hay constancia de más de 600 mutaciones de Fabry y aproximadamente el 60% son en sentido erróneo. En la actualidad, el iminoazúcar DGJ está siendo estudiado en estudios clínicos de fase 2 como una chaperona farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Previamente, se ha demostrado que la DGJ media aumentos selectivos y dependientes de la dosis en los niveles de  $\alpha$ -Gal A en muchas líneas celulares linfoides derivadas de pacientes con Fabry. Para identificar mutaciones sensibles a DGJ adicionales, se transfectaron transitoriamente células GripTite 293 MSR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.) con vectores de expresión que contienen todas las mutaciones en sentido erróneo conocidas de  $\alpha$ -Gal A y varias pequeñas delecciones e inserciones en fase generadas por mutagénesis dirigida. Los constructos de  $\alpha$ -Gal A mutantes se expresaron transitoriamente en células HEK-293. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de DGJ, y la actividad de  $\alpha$ -Gal A se midió en lisados celulares. Se ha realizado un ensayo de validación para más de 35 mutaciones en sentido erróneo y los resultados obtenidos en células HEK-293 fueron similares tanto a los de células linfoides derivadas de pacientes con Fabry y cultivos de linfocitos T primarios (remítase a la Patente de EE. UU. con N.º de serie: 11/749.512), así como también a las respuestas de la enzima  $\alpha$ -Gal A observadas en los leucocitos de pacientes con Fabry después de la administración oral de DGJ en estudios clínicos de fase 2.

## Métodos y materiales

45 **Mutagénesis:** Todas las mutaciones se generaron por mutagénesis dirigida siguiendo los protocolos estándares de biología molecular. Para generar mutaciones puntuales, la mutagénesis dirigida se empleó en la expresión del vector pcDNA3.1 (*Invitrogen*) que contenía ADNc de  $\alpha$ -GAL A humano en fase. Se diseñaron pares de cebadores específicos que contenían la mutación deseada (Figura 6). La mutagénesis se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando ADN polimerasa *PfuUltra* de alta fidelidad (*Stratagene*) en un termociclo. Cada mezcla de reacción contenía un volumen total de 50  $\mu$ l con lo siguiente: 41.6  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O, 5.0  $\mu$ l de 10X tampón de reacción *PfuUltra* de alta fidelidad, 0.5  $\mu$ l de cebador-5'-directo (50  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l de cebador-3'-inverso, 1.0  $\mu$ l de mezcla dNTP (que contenía 25 mM de cada dA, dT, dC, dG), 0.9  $\mu$ l de GLA humana en pcDNA3 (2ng/ $\mu$ l de ADN), 0.5  $\mu$ l de ADN polimerasa *PfuUltra* de alto rendimiento. Los parámetros del termociclo empleados fueron los siguientes: i) 94 °C durante 30 segundos, ii) 94 °C durante 30 segundos, 55-60 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 6 minutos, iii) repetir (ii) 16 veces. Posteriormente, se agregaron 0.5  $\mu$ l de *Dpn I* (New England Biolabs) a cada reacción y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se empleó un volumen de 7.5  $\mu$ l para cada reacción de mutagénesis para transformar células DH5 $\alpha$  (*New England Biolabs*). Las células se colocaron posteriormente en placas LB-agar con 75  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las colonias bacterianas se recogieron, se cultivaron en LB líquido con ampicilina durante la noche con agitación a 37 °C y se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit QuickLyse Miniprep (*Qiagen*). Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de la longitud completa del gen GLA humano. Para algunas de las mutaciones, el ADNc de GLA humano estaba

contenido en el vector plasmídico pCXN. La mutagénesis tuvo lugar en este vector con la ADN polimerasa NEB Fusion. Tras confirmar la mutación por secuenciación, el plásmido fue digerido con *EcoRI* y subclonado en el vector de expresión pcDNA3.1. La orientación correcta se confirmó por digestión con *Xho I*.

5 **Expresión y transfección transitoria:** La transfección transitoria se llevó a cabo en células GripTite 293 MSR (*Invitrogen Corp.*, Carlsbad, CA, EE. UU.) empleando el reactivo Fugene de alto rendimiento (*Roche*). Resumiendo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) con una densidad de 7.5-10k células/pocillo y se incubaron a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con 0.1 µg de ADN y 0.35 µL de reactivo Fugene de alto rendimiento por pocillo (proporción de ADN: Reactivo de 2:7). Después de la transfección con constructos de expresión que contenían mutaciones de α-Gal A específicas, las células se incubaron de nuevo a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora antes de agregar DGJ de 20 nM a 1 mM. Las células se incubaron posteriormente durante 4-5 días antes de la lisis y el ensayo.

15 **Medida de la actividad de α-GAL A:** Las células se lavaron dos veces con PBS, luego se incubaron con 200 µl de medio fresco a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante dos horas, seguido de 2 lavados con PBS adicionales. A continuación, las células se lisaron en 60 µL de tampón de lisis (citrato sódico 27 mM/fosfato sódico dibásico 46 mM, 0.5% de Triton X-100, pH 4.6). Se agregaron 10 µL de lisado a 50 µL de tampón de ensayo (tampón de lisis sin Triton X-100, pero que contenía 4-MU-α-D-galactopiranosido (4-MUG) 6 mM y N-acetil-D-galactosamina (GalNac) 117 mM) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Se agregaron posteriormente 70 µL de solución de terminación (glicina 0.4 M, pH 10.8) y la fluorescencia se leyó en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Se sustrajo el fondo definido por el recuento de la solución que contiene sustrato únicamente del recuento de la fluorescencia bruta. Se empleó un kit de ensayo para proteínas MicroBCA (*Pierce*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para determinar la concentración de proteína en 40 µL de lisado celular. Se procesó una curva estándar para la 4-metilumbeliferona (4-MU) con concentraciones de 30 µM a 1.3 nM en paralelo para calcular la actividad absoluta de α-Gal A expresada como nmol/mg de proteína/h o se normalizó posteriormente como % de actividad de la enzima natural sin tratar.

25 La transfección transitoria y las medidas de actividad de α-Gal A se llevaron a cabo por cuadruplicado y se repitieron al menos 3 veces para cada mutación para calcular la actividad de α-Gal A promedia para cada concentración de DGJ. Se determinó si la respuesta a DGJ era significativa mediante una prueba t de Student bilateral para datos apareados ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

35 Todas las mutaciones de Fabry enumeradas se generaron por mutagénesis dirigida (Figura 1). Las mutaciones representadas en cursiva no se ensayaron, mientras que las representadas en texto normal fueron las mutaciones de α-Gal A que respondieron al tratamiento con DGJ en el ensayo de transfección transitoria y las representadas en negrita y subrayadas no respondieron al tratamiento con DGJ en el ensayo de transfección transitoria. La magnitud del incremento en los niveles de α-Gal A después del tratamiento con DGJ y los valores de CE<sub>50</sub> se enumeran para cada mutación ensayada que respondió al tratamiento con DGJ (Figura 2).

40 La actividad de α-Gal A (expresada como nmol/mg de proteína/h de 4-MU liberada) se midió en lisados preparados a partir de células GripTite 293 transfectadas incubadas con concentraciones crecientes de DGJ. Una respuesta dependiente de la concentración típica se muestra para L300P y una respuesta negativa típica a DGJ se muestra para R227Q. La natural presenta una actividad basal elevada y no responde a DGJ en este ensayo (Figura 3).

45 Los niveles de α-Gal A se midieron en tres ensayos diferentes, se presentaron como porcentaje de natural y se compararon para cada mutación representándolos juntos. Los tres ensayos diferentes examinaron los niveles de α-Gal A en linfocitos T y linfoblastos aislados de pacientes con Fabry (por ejemplo, remítase a la Patente de EE. UU. con N.º de serie 11/749.512), así como también en leucocitos (Leu) de estudios de DGJ de fase 2.

50 Las barras vacías indican el nivel basal (sin tratamiento con DGJ) y las barras llenas indican un nivel elevado después del tratamiento con DGJ (Figura 4).

55 Las mutaciones de Fabry ensayadas se muestran en la estructura secundaria de α-Gal A (Figura 5). No se observó correlación significativa entre la respuesta y la ubicación en la secuencia proteica de una mutación, lo que sugiere que tanto las mutaciones sensibles como las que no lo son están ampliamente distribuidas a lo largo de toda la proteína. El color del texto indica la respuesta a DGJ: verde=responde; rojo=no responde; marrón indica que, de las múltiples mutaciones en esa misma ubicación, algunas respondieron al tratamiento con DGJ, mientras que otras no respondieron.

## Conclusión

60

Estos resultados descritos son comparables a los obtenidos a partir de linfocitos T o linfoides derivados de pacientes con Fabry, así como también a las respuestas de la enzima  $\alpha$ -Gal A observadas en leucocitos de pacientes con Fabry después de la administración oral de DGJ en estudios clínicos de fase 2.

5 Así pues, el ensayo de transfección transitoria de GripTite 293 MSR es un método fiable para identificar mutaciones sensibles a DGJ y caracterizar la magnitud y potencia de esta respuesta.

Entre las mutaciones sensibles identificadas, los incrementos en los niveles de  $\alpha$ -Gal A por el tratamiento con DGJ variaron de 1.3 a 40 veces más (de 2% a 100% de natural), con valores de  $CE_{50}$  de entre 200 nM y >100 mM.

Las formas mutantes sensibles a DGJ y las que no lo eran no parecieron estar localizadas en regiones o dominios particulares de la estructura de la proteína  $\alpha$ -Gal A.

10 EJEMPLO 2: Método para evaluar los efectos de una SPC sobre la actividad de la glucocerebrosidasa *ex vivo* – Ejemplo predictivo

15 La enfermedad de Gaucher (EG) la provoca una deficiencia de glucocerebrosidasa lisosomal (GCCase). La actividad deficiente de GCCase produce la acumulación de glucosilceramida (GlcCer) y el desarrollo de síntomas como anemia, trombocitopenia, hepatoesplenomegalia, necrosis ósea, infartos y osteoporosis, y en algunos casos, una enfermedad neuropática. La chaperona farmacológica específica tartrato de isofagomina (IFG) se une selectivamente y estabiliza la GCCase mutante (N370S/N370S) en el RE y aumenta su tráfico al lisosoma.

20 Para evaluar el efecto de IFG sobre diferentes variantes de GCCase, se preparará un ensayo diagnóstico *ex vivo* empleando células Cos7 para identificar mutaciones sensibles a IFG.

25 Empleando las técnicas descritas en los Ejemplos 1 y 4, se prepararán líneas celulares COS-7 que expresan mutaciones en sentido erróneo y varias deleciones e inserciones pequeñas en fase por mutagénesis dirigida. El ensayo se preparará para todas las mutaciones enumeradas en el eje x de la Figura 8. La respuesta de la actividad a IFG se determinará para cada ensayo de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (remítase, p. ej., a la Patente de EE. UU. N.º 6.916.829).

30 Para determinar la correlación entre la respuesta a IFG medida en las células COS-7 y la de las células derivadas de un paciente, también se midió la respuesta de actividad a IFG en macrófagos y linfoblastos derivados de un paciente. Los macrófagos se derivaron con éxito de 46 de 63 pacientes y tras incubar con IFG (3, 10, 30 o 100  $\mu$ M) durante 5 días los niveles de GCCase aumentaron en los macrófagos de 42 a 46 pacientes (media = 2.3 veces más; rango: de 1.1- a 6.5 veces más). Los niveles de actividad residual y la respuesta a IFG fueron más regulares para los mismos genotipos cuando se midieron en linfoblastos en comparación con macrófagos, potencialmente debido a la variabilidad en la disponibilidad de macrófagos entre pacientes diferentes. Los resultados se muestran en la Figura 8.

35 La respuesta a IFG para células derivadas de un paciente se comparará con los resultados obtenidos en la línea celular Cos7.

40 EJEMPLO 3: Efecto de una SPC sobre la actividad de  $\alpha$ -GAL A en la piel, el corazón, el riñón o el plasma *in vivo*

45 Para determinar si el incremento de los niveles de  $\alpha$ -Gal A mutante se traduce en un incremento de la actividad de  $\alpha$ -Gal A *in situ*, se investigó el efecto de la administración de DGJ sobre los niveles tisulares de GL-3 *in vivo* en ratones hR301Q  $\alpha$ -Gal A Tg/KO.

50 Se trataron ratones hR301Q  $\alpha$ -Gal A Tg/KO macho de ocho semanas durante 4 semanas con 300 mg/kg de DGJ en agua potable diariamente o con menos frecuencia (4 días de toma/3 días de descanso). Tras administrar la dosis, se prepararon lisados de piel, corazón, riñón y plasma por homogenización de ~50 mg de tejido en tampón de lisis (remítase a lo indicado anteriormente). 20  $\mu$ L de lisado se mezclaron con 50  $\mu$ L de sustrato (como se indicó anteriormente). Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se agregaron 70  $\mu$ L de solución de terminación y se leyó la fluorescencia en un lector de placas Víctor como se describe anteriormente. Se sustrajo el fondo de la actividad enzimática en los lisados y se normalizó para la concentración proteica. Se procesó una curva 4-MU estándar para la conversión de los datos de fluorescencia en actividad absoluta de  $\alpha$ -Gal A expresada como nmol/mg de proteína/h.

55 Se lavaron las muestras de tejido para eliminar la sangre y se pesaron y homogeneizaron con un sistema de solventes en un sistema FastPrep®. Se extrajo el homogenado posteriormente empleando extracción en fase sólida en un cartucho C18. El eluyente se evaporó y se reconstituyó antes de inyectarlo en un sistema LC-MS/MS. Se midieron doce isoformas de GL-3 empleando ESI-MS/MS en modo positivo. Se consiguió la separación por LC en

una columna 00839a Zorbax C18.

Se detectaron reducciones significativas en los niveles de GL-3 con dosis diarias y menos frecuentes de DGJ en la piel, el corazón, el riñón y el plasma (Figura 9). Se detectó una tendencia a una reducción mayor en los niveles de GL-3 en múltiples tejidos y en plasma con dosis menos frecuentes de DGJ. En conjunto, estos resultados indican que DGF merece un estudio más amplio en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Fabry.

EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones que provocan la enfermedad de Pompe y que son sensibles a la chaperona farmacológica DNJ

La enfermedad de Pompe la provoca la actividad deficiente de alfa-glucosidasa ácida (GAA) que altera el metabolismo glucogénico lisosomal. La deficiencia enzimática provoca la acumulación glucogénica lisosomal y produce debilitamiento progresivo de los músculos esqueléticos, función cardíaca reducida, insuficiencia respiratoria y deterioro del SNC en las últimas etapas de la enfermedad. Las mutaciones genéticas en el gen GAA resultan en una expresión menor o producen formas mutantes de la enzima con una estabilidad alterada y/o una actividad biológica que provoca, en última instancia, la enfermedad. Las chaperonas farmacológicas representan una nueva estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades genéticas.

Para evaluar los efectos de DNJ sobre diferentes variantes de GAA, se prepararon un ensayo diagnóstico *in vitro* empleando células COS-7 y HEK-293 para identificar mutaciones sensibles a DNJ (Figuras 10, 12 y 14).

Se empleó una estrategia de mutagénesis dirigida para introducir mutaciones específicas en el ADN complementario (ADNc) que codifica la  $\alpha$ -glucosidasa ácida natural humana (GAA). El constructo inicial de ADN de GAA natural se generó por subclonación de la región codificante de GAA del clón 5739991 de ADNc (Invitrogen) en el vector de expresión pcDNA6/V5-HisA de mamífero (Invitrogen). El constructo de ADN resultante (denominado ADNc de GAA natural) se empleó como plantilla de ADN en la mutagénesis posterior. Estas mutaciones en sentido erróneo por pequeñas inserciones o deleciones se citan en la base de datos Erasmus y se sabe que están asociadas al trastorno por acumulación de glucógeno de tipo 2 (GSD II, por sus siglas en inglés), también conocido como la enfermedad de Pompe. Resumiendo, el ADNc de GAA natural se amplificó por PCR empleando cebadores mutagénicos para obtener ADN plasmídico con la mutación deseada. Estas mutaciones se confirmaron por secuenciación del ADN antes de su expresión proteica en las células.

Las células COS-7 (derivadas de células embrionarias renales de mono verde) se sembraron asépticamente en placas de cultivo de 12 pocillos con una densidad celular de  $\sim 1.4 \times 10^5$  células por pocillo en 3 ml de medio esencial de Dulbecco modificado (DMEM) que contenía un 10% (v/v) de suero bovino fetal y se cultivaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. El día siguiente, las células (normalmente con un 60-80% de confluencia) se transfectaron con 0.75  $\mu$ g del constructo de ADN individual mediante un reactivo de transfección lipídico tal como FUGENE de alto rendimiento (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dos pocillos se transfectaron con cada constructo de ADN de forma que un pocillo se incubó con DNJ (normalmente 0  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M o 100  $\mu$ M) mientras que al otro pocillo se le agregó un volumen equivalente de PBS. Se transfectaron dos pocillos más con el vector vacío (sin ADNc de GAA) y se incubaron con o sin DNJ para emplearlos como control del fondo para la expresión de GAA en monos endógenos. De forma análoga, se transfectaron 2 pocillos más con ADNc de GAA natural humano y se incubaron con o sin DNJ para emplearlos como control positivo. Todas las muestras se incubaron durante  $\sim 48$  h a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras un periodo de incubación de 48 horas, el medio gastado se retiró y las células se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con 1-2 ml de medio DMEM recién preparado durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>. El medio se retiró posteriormente y las células se lavaron inmediatamente con PBS y se lisaron con 200  $\mu$ l de tampón de lisis (Bis-Tris 25 mM (pH 6.5), NaCl 150 mM, 1% (v/v) de Triton X-100) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas. Posteriormente, la placa de cultivo celular se agitó cuidadosamente en un instrumento agitador orbital rotatorio durante 10 min a temperatura ambiente para completar la lisis celular. Los lisados celulares resultantes se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1.5 ml y se centrifugaron a 20000 x g durante 10 min para que sedimentaran los desechos celulares. Posteriormente, se transfirieron aproximadamente 175  $\mu$ l de cada muestra de sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1.5 ml nuevo. Este lisado celular se empleó para todos los ensayos posteriores, entre ellos la determinación de la actividad enzimática de GAA y de la concentración proteica total e inmunotransferencia de Western.

La actividad enzimática de GAA residual se determinó para cada GAA expresada de forma transitoria empleando un sustrato de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -glucopiranosida (4-MU- $\alpha$ -glucosa) fluorogénico (Sigma). Resumiendo, 10  $\mu$ l de cada lisado celular se ensayaron (por triplicado) en una reacción de 100  $\mu$ l en placas de 96 pocillos de fondo negro transparente empleando 4-MU- $\alpha$ -glucosa 3 mM y KOAc 50 mM (pH 4.0). La muestra de GAA expresada de forma transitoria se diluyó 20 veces con el tampón de lisis para garantizar que la reacción enzimática se mantuviera en el rango lineal del instrumento. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 hora y se detuvieron con la adición de 50  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500 mM (pH 10.5). Posteriormente, el ensayo se leyó en un lector de

fluorescencia en placas (con excitación a 355 nm/emisión a 460 nm) para cuantificar la cantidad de fluorescencia de 4-MU dependiente de GAA liberada. La actividad enzimática de GAA se extrapola a una curva estándar de 4-MU libre tras sustraer la fluorescencia de fondo (es decir, el control del vector vacío).

- 5 Se emplearon 25 microlitros de lisado de cada pocillo en un ensayo paralelo para determinar la concentración proteica celular total empleando el ensayo para determinar proteínas mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración proteica celular total se extrapola a una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).
- 10 La actividad enzimática de GAA para cada muestra se normalizó para la concentración proteica celular total y se expresó como nmol de 4-MU liberada/mg de proteína total/h para definir la actividad específica de GAA. La actividad específica de GAA resultante después del tratamiento con DNJ se comparó con la actividad enzimática de GAA de la muestra sin tratar correspondiente para determinar si una mutación de GAA específica responde a DNJ.
- 15 También se determinó el  $CE_{50}$  de DNJ (Figura 14) para una única línea celular HEK-293 transfectada con la mutación P545L de GAA.

Para determinar la correlación entre la respuesta a DNJ medida en las células COS-7 y la de las células derivadas de un paciente, también se midió la respuesta de actividad a DNJ en macrófagos y linfoblastos derivados de un paciente *ex vivo*.

- 20 También se generaron líneas celulares de fibroblastos y linfocitos derivados de pacientes con Pompe como se describió anteriormente (remítase a la Patente de EE. UU. con N.º de serie: 11/749.512). También se derivaron líneas celulares de fibroblastos de pacientes homocigóticos para las mutaciones P545L o R854X GAA (Figura 13).
- 25 Se derivaron líneas celulares de linfocitos de pacientes heterocigóticos para el defecto por corte y empalme de GAA (IVS1AS, T>G, -13) y una mutación por cambio de marco de GAA (Figura 15).

La actividad de GAA se midió en las líneas celulares de linfocitos después de incubarlas con DNJ 0  $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 100  $\mu$ M, o 300  $\mu$ M (Figura 15). La actividad de GAA también se midió en las líneas celulares de fibroblastos después de incubarlas con DNJ (Figura 13).

- 30 En este estudio, se demuestra que la chaperona farmacológica 1-desoxinogiramicina-HCl (DNJ) se une a GAA mutante e incrementa su actividad. En fibroblastos (Figura 13) y linfocitos (Figura 15) derivados de pacientes con Pompe, así como también en células COS-7 (Figuras 10 y 12) o HEK-293 (Figura 14) transfectadas de forma transitoria que expresan ciertas mutaciones de GAA en sentido erróneo, DNJ aumenta de forma significativa los niveles de GAA.
- 35 La DNJ aumentó la actividad de GAA para 26 mutaciones (Figura 10) de entre 131 mutaciones ensayadas (datos no incluidos). Aparte de aumentar la actividad de estas GAA mutantes, la DNJ también fomentó el procesamiento de GAA en las formas 95 / 76 / 70 kDa.

Además, se detectaron aumentos en la actividad de GAA dependientes de la dosis en linfocitos derivados de pacientes que contenían el defecto común por corte y empalme IVS1AS, T>G, -13 en un alelo y una mutación por cambio de marco en el segundo alelo (Figura 15).

- 40 La presente invención no debe quedar limitada en su alcance por las realizaciones específicas que se describen en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención, aparte de las que se describen aquí, resultarán evidentes para un experto en la técnica a partir de la descripción que antecede y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones queden comprendidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente que expresa una forma mutante de  $\alpha$ -Gal A y que se ha determinado que responde al tratamiento con una chaperona farmacológica específica, donde se determina que el paciente responde al tratamiento con la chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A mediante un método que comprende
- a. sembrar unas primeras y segundas células huésped en un recipiente de ensayo;
- b. poner en contacto las primeras células huésped con la chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A; y
- 10 c. comparar la actividad de  $\alpha$ -Gal A en las segundas células huésped que no están en contacto con la chaperona farmacológica específica, con la actividad de  $\alpha$ -Gal A en la primera célula huésped que está en contacto con la chaperona farmacológica específica,
- donde
- 15 la chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de esta;
- las primeras y segundas células huésped son células HEK-293 MSR que expresan la forma mutante de  $\alpha$ -Gal A del paciente; y donde:
- 20 un incremento de 1.3 a 40 veces más en la actividad de  $\alpha$ -Gal A en las primeras células huésped que están en contacto con la chaperona farmacológica específica en comparación con la actividad de  $\alpha$ -Gal A expresada por las segundas células huésped que no están en contacto con la chaperona farmacológica específica; o
- una actividad de  $\alpha$ -Gal A en las primeras células huésped que están en contacto con la chaperona farmacológica específica de al menos aproximadamente un 2-100% de la actividad de  $\alpha$ -Gal A de células HEK-293 MSR que expresan una forma natural de  $\alpha$ -Gal A;
- 25 indica que el paciente responderá al tratamiento con la chaperona farmacológica específica.
2. Un método para determinar si un paciente que expresa una forma mutante de  $\alpha$ -Gal A responderá al tratamiento con una chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A, comprendiendo el método:
- a. sembrar unas primeras y segundas células huésped en un recipiente de ensayo;
- 30 b. poner en contacto las primeras células huésped con la chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A; y
- c. comparar la actividad de  $\alpha$ -Gal A en las segundas células huésped que no están en contacto con la chaperona farmacológica específica, con la actividad de  $\alpha$ -Gal A en la primera célula huésped que está en contacto con la chaperona farmacológica específica,
- 35 donde
- la chaperona farmacológica específica para  $\alpha$ -Gal A es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de esta;
- 40 las primeras y segundas células huésped son células HEK-293 MSR que expresan la forma mutante de  $\alpha$ -Gal A del paciente; y donde:
- 45 un incremento de 1.3 a 40 veces más en la actividad de  $\alpha$ -Gal A en las primeras células huésped que están en contacto con la chaperona farmacológica específica en comparación con la actividad de  $\alpha$ -Gal A expresada por las segundas células huésped que no están en contacto con la chaperona farmacológica específica; o
- una actividad de  $\alpha$ -Gal A en las primeras células huésped que están en contacto con la chaperona farmacológica específica de al menos aproximadamente un 2-100% de la actividad de  $\alpha$ -Gal A de células HEK-293 MSR que expresan una forma natural de  $\alpha$ -Gal A;
- 50 indica que el paciente responderá al tratamiento con la chaperona farmacológica específica.
3. Una chaperona farmacológica específica para el uso según se reivindica en la reivindicación 1 o un método según se reivindica en la reivindicación 2, donde la forma mutante de  $\alpha$ -Gal A se debe a una mutación en sentido erróneo en un gen que codifica  $\alpha$ -Gal A.

4. Una chaperona farmacológica específica para el uso o un método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, donde se identifica que el paciente expresa una  $\alpha$ -galactosidasa A es una  $\alpha$ -galactosidasa A mutante seleccionada del grupo conformado por las mutaciones de  $\alpha$ -galactosidasa A: A121T, A156V, A20P, A288D, A288P, A292P A348P, A73V, C52R, C94Y, D234E, D244H, D244N, D264Y, E338K, E341D, E358K, E398K, E48K, E59K, E66Q, F113L, G144V, G183D, G260A, G271S, G325D, G328A, G35R, G373D, G373S, H225R, I219N, I242N, I270T, I289F, I303N, I317T, I354K, I91T, L14P, L166V, L243F, L300F, L310F, L32P, L45R, M267I, M284T, M296I, M296V, M72V, M76R, N224S, N263S, N298K, N298S, N320I, N320Y, N34K, P205R, P259L, P265L, P265R, P293A, P293S, P409S, P40L, P40S, Q279E, Q279H, Q279R, Q280H, Q280K, Q312H, Q321E, Q321R, Q327E, R301P, R342Q, R363C, R363H, R49G, R49L, R49S, S201Y, S276N, S297C, S345P, T194I, V269M, V316E, W340R, W47L y W95S.
5. Una chaperona farmacológica específica para el uso o un método según se reivindica en la reivindicación 4, donde la  $\alpha$ -galactosidasa A mutante se selecciona del grupo conformado por las mutaciones de  $\alpha$ -galactosidasa A: G144V, H225R, S276G, R301P y N320I.
6. Una chaperona farmacológica específica para el uso o un método según se reivindica en la reivindicación 5, donde la chaperona farmacológica específica es clorhidrato de 1-desoxigalactonojirimicina.
7. Una chaperona farmacológica específica para su uso o un método según se reivindica en la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde la primera célula huésped se pone en contacto con 1-desoxigalactonojirimicina en una concentración de 20 nM a 1 mM.
8. Una chaperona farmacológica específica para su uso o un método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la actividad de la proteína se determina utilizando un ensayo fluorimétrico que cuantifica la hidrólisis de sustrato en lisados de la célula huésped.
9. Una chaperona farmacológica específica para su uso o un método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el paciente es una mujer.
10. Un método para producir una tabla de terapia de tratamiento, donde la tabla de terapia de tratamiento indica si una chaperona farmacológica específica es un compuesto eficaz para incrementar la actividad de una  $\alpha$ -Gal A mutante, donde el método comprende llevar a cabo un método según se reivindica en la reivindicación 2; y registrar el resultado de dicho método en la tabla de terapia de tratamiento, donde una chaperona farmacológica específica registrada en la tabla de terapia de tratamiento que provoca:
- un incremento de 1.3 a 40 veces más en la actividad de  $\alpha$ -Gal A en la primera célula huésped que está en contacto con la chaperona farmacológica específica en comparación con la actividad de  $\alpha$ -Gal A expresada por la segunda célula huésped que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica; o
- una actividad de  $\alpha$ -Gal A en la primera célula huésped que está en contacto con la chaperona farmacológica específica de al menos aproximadamente un 2-100% de la actividad de  $\alpha$ -Gal A de una célula huésped que expresa una forma natural de la proteína;
- es una chaperona farmacológica específica que se puede utilizar como terapia para un paciente que expresa la proteína mutante.

Fig. 1A

Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

Sentido erróneo	L45R	M72R	R112H	G147R	G183S	R227P	D264V	A285P	Q312R	R356G	P409S	V390FX8
M1J	H46L	M72V	R112S	S148N	G183V	R227Q	D264Y	W287C	D313G	R356W	P409T	401ins1aa/T 401S
M1K	H46R	A73V	F113L	S148R	Y184C	A230T	P265L	W287G	D313Y	Q357X	T410A	del20-24aa
M1L	H46Y	M76R	F113S	Y152C	M187T	D231G	P265R	A288D	V316E	E358A	T410I	del13-8aa
M1R	W47G	M76T	H117S	D155H	M187V	D231N	D266E	A288P	I317N	E358G	T410K	del153aa
M1T	W47L	W81C	R118C	A156T	L191P	D231V	D266H	I289F	I317T	E358K	T410P	del205-7aa
M1V	E48D	W81S	L120P	A156V	L191Q	D234E	D266N	I289S	N320I	I359T	G411D	del254aa
A13P	E48K	G85D	L120S	A156Y	T194I	D234Y	D266V	M290I	N320K	G360C	L414S	del358aa
L14P	R49C	G85M	A121P	W162C	V199M	S235C	D266Y	A291T	N320Y	G360D	L415P	ins247-8aa
L16H	R49G	Y86C	A121T	W162G	S201F	S235F	M267I	A292P	Q321E	G360S	L33Y	
L16P	R49L	Y86D	Y124D	W162R	S201Y	W236C	M267R	A292T	Q321L	G361R	L166G	
F18S	R49P	Y88D	H125P	G163V	C202W	W236L	L268S	F293A	Q321R	P362L	H46S	
L19P	R49S	L89P	S126G	D165H	C202Y	W236R	V269A	P293H	G325D	R363C	I124F	
A20P	F50C	L89R	G128E	D165V	P205L	S238N	V269M	F293S	G325S	R363H		
A31V	M51I	C90R	L129P	D165Y	P205R	I239T	I270T	P293T	Q327E	R363P		
L32P	M51K	B1T	L131P	D166Y	P205S	I242F	G271C	F295C	Q327K	L372P	Complex	
D33Y	C52G	D92G	G132E	L166V	P205T	I242N	G271S	M296I	G328A	L372R	D65V/Q57L	
N34K	C52R	D92H	G132R	L167P	L206P	L243F	G271V	M296V	G328E	G373D	L120P/A121 I	
N34S	C52S	D92N	Y134H	K168N	Y207C	L243W	N272K	S297C	G328R	G373R		
G35R	C52Y	D92Y	Y134S	K168R	Y207H	D244N	N272S	S297F	G328Y	G373S	Small Ins/Del	
L36E	L54P	D93G	A135V	F169S	Y207S	D244H	F273L	N298H	E338K	A377D	19del5aa	
L36S	D55V	D93N	D136H	D170H	N215D	S247C	L275F	N298K	V339E	C378R	86del6aa	
A37V	C56F	D93Y	D136Y	D170Y	N215S	S247P	S276G	N298S	W340R	C378Y	113del8aa	
P40L	C56G	C94S	G138E	G171C	Y216C	Q250P	S276N	D299G	E341D	C382W	120del2aa/L 120H	
P40S	C56Y	C94Y	G138R	G171D	Y216D	E53T	Q279E	L300F	E341K	C382Y	152ins1aa/Y 152D	
T41I	Q57L	W95L	N139T	G171R	I219N	A257P	Q279H	L300H	R342L	I384N	153del1aa	
M42L	E59K	W95S	T141I	C172F	C223G	G258R	Q279K	L300P	R342Q	T385P	205del3aa	
M42R	P60L	A97P	C142R	C172G	C223R	G258V	Q279R	R301G	L344P	G386P	205del7aa	
M42T	C63Y	A97V	C142W	C172R	C223Y	F259L	Q280H	R301P	S345P	P389R	254del1aa 281del1aa/V 281A	
M42V	S65T	R100K	C142Y	C172S	N224D	F259R	Q280K	R301Q	A348P	F396Y		
G43D	E66G	R100T	A143P	C172W	N224S	G260A	T282A	I303N	W349R	E398K	358del1aa	
G43R	E66K	E103Q	A143T	C172Y	H225D	G261D	T282N	K308N	A350P	L403S	382del1aa	
G43S	E66Q	L106R	G144V	C174G	H225R	W262C	Q283P	A309P	A352D	I407K	403del1aa	
G43V	L68F	Q107L	P146S	G183A	W226C	N263S	M284T	L310F	I354K	I407R	247ins3aa	
W44C	M72I	R112C	G147E	G183D	W226R	D264A	A285D	Q312H	N355K	P409A	247ins8aa	

Fig. 1B

## Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

Sentido erróneo	<u>R49L</u>	<u>D93V</u>	P146S	C202Y	<u>A257P</u>	<u>M284T</u>	<u>N320Y</u>	C378Y
<u>M1T</u>	<u>R49P</u>	<u>C94Y</u>	<u>G147R</u>	C202W	<u>G258R</u>	A285P	<u>Q321E</u>	C378R
<u>M1R</u>	<u>R49S</u>	C94S	<u>S148N</u>	<u>P205R</u>	<u>P259R</u>	A285D	<u>Q321R</u>	C382Y
M1I	F50C	<u>W95S</u>	S148R	<u>P205L</u>	<u>P259L</u>	W287G	<u>G325D</u>	<u>C382W</u>
<u>L14P</u>	<u>M51K</u>	<u>A97V</u>	<u>Y152C</u>	<u>P205T</u>	<u>G260A</u>	<u>W287C</u>	Q327K	<u>I384N</u>
<u>L16P</u>	<u>M51I</u>	<u>A97P</u>	<u>D155H</u>	<u>Y207C</u>	<u>G261D</u>	<u>A288D</u>	<u>Q327E</u>	T385P
<u>L16H</u>	C52G	R100K	<u>A156V</u>	<u>Y207S</u>	W262C	<u>A288P</u>	G328R	<u>Q386P</u>
<u>L19P</u>	<u>C52R</u>	R100T	<u>A156T</u>	<u>N215S</u>	<u>N263S</u>	<u>I289F</u>	<u>G328A</u>	<u>P389R</u>
<u>A20P</u>	C52S	E103Q	W162R	<u>Y216D</u>	D264V	M290I	<u>G328E</u>	F396Y
A31V	<u>C56F</u>	<u>R112H</u>	W162C	<u>I219N</u>	<u>D264Y</u>	<u>A292P</u>	<u>G328V</u>	<u>E398K</u>
<u>L32P</u>	<u>C56G</u>	<u>R112S</u>	<u>G163V</u>	C223R	<u>P265R</u>	<u>P293A</u>	<u>E338K</u>	<u>L403S</u>
<u>D33Y</u>	<u>C56Y</u>	<u>R112C</u>	D165V	<u>C223G</u>	<u>P265L</u>	<u>P293S</u>	<u>V339E</u>	I407K
<u>N34K</u>	<u>E59K</u>	<u>F113L</u>	<u>L166G</u>	C223Y	<u>D266N</u>	<u>P293T</u>	<u>W340R</u>	<u>P409T</u>
N34S	<u>C63Y</u>	F113S	<u>L166V</u>	<u>N224S</u>	<u>D266H</u>	<u>F295C</u>	<u>E341D</u>	<u>P409A</u>
<u>G35R</u>	<u>S65T</u>	<u>R118C</u>	L167P	<u>N224D</u>	D266V	<u>M296I</u>	E341K	<u>P409S</u>
<u>A37V</u>	<u>E66G</u>	<u>L120P</u>	<u>K168N</u>	<u>H225R</u>	D266E	<u>M296V</u>	<u>R342Q</u>	T410K
<u>P40L</u>	<u>E66K</u>	<u>L120S</u>	K168R	W226R	M267R	<u>S297C</u>	L344P	<u>T410A</u>
<u>P40S</u>	<u>E66Q</u>	A121P	<u>F169S</u>	<u>W226C</u>	<u>M267I</u>	<u>S297F</u>	<u>S345P</u>	<u>G411D</u>
<u>T41I</u>	<u>L68F</u>	<u>A121T</u>	D170V	R227Q	<u>L268S</u>	<u>N298S</u>	<u>A348P</u>	<u>L414S</u>
<u>M42T</u>	<u>M72R</u>	V124D	<u>D170H</u>	<u>A230T</u>	<u>V269A</u>	<u>N298K</u>	A350P	L415P
<u>M42L</u>	<u>M72I</u>	G128E	G171D	<u>D231N</u>	<u>V269M</u>	<u>N298H</u>	<u>A352D</u>	
<u>M42V</u>	<u>M72V</u>	L129P	<u>G171R</u>	<u>D231G</u>	<u>I270T</u>	<u>D299G</u>	<u>I354K</u>	
G43D	<u>A73V</u>	L131P	C172Y	<u>D234E</u>	G271C	<u>L300F</u>	N355K	
G43S	<u>M76R</u>	<u>G132E</u>	C172F	<u>D234Y</u>	<u>G271S</u>	<u>L300H</u>	<u>R356W</u>	
G43V	<u>W81C</u>	<u>G132R</u>	C172W	<u>S235C</u>	G271V	<u>L300P</u>	<u>E358G</u>	
G43R	<u>W81S</u>	Y134S	C172R	<u>W236R</u>	<u>N272K</u>	<u>R301G</u>	<u>E358K</u>	

Fig. 1B (Cont.)

<u>W44C</u>	<u>G85D</u>	<u>A135V</u>	<u>C172G</u>	<u>W236L</u>	<u>N272S</u>	<u>R301Q</u>	<u>E358A</u>	
<u>L45R</u>	<u>Y86C</u>	<u>D136H</u>	<u>G183D</u>	<u>W236C</u>	<u>S276N</u>	<u>R301P</u>	<u>I359T</u>	
H46R	<u>Y88D</u>	<u>G138E</u>	<u>G183S</u>	<u>I239T</u>	<u>S276G</u>	<u>I303N</u>	<u>G360S</u>	<u>Ins/Del</u> <u>pequeña</u>
<u>H46S</u>	<u>L89P</u>	<u>G138R</u>	<u>M187T</u>	<u>I242F</u>	<u>Q279R</u>	<u>L310F</u>	<u>G361R</u>	<u>del20-24aa</u>
H46L	<u>L89R</u>	<u>T141I</u>	<u>M187V</u>	<u>I242N</u>	<u>Q279H</u>	<u>Q312H</u>	<u>P362L</u>	<u>del13-8aa</u>
H46Y	<u>I91T</u>	<u>C142R</u>	<u>L191Q</u>	<u>L243F</u>	<u>Q279E</u>	<u>D313Y</u>	<u>R363H</u>	<u>del153aa</u>
<u>W47G</u>	<u>D92N</u>	<u>C142W</u>	<u>L191P</u>	<u>D244N</u>	<u>Q279K</u>	<u>V316E</u>	<u>R363C</u>	<u>del205-7aa</u>
<u>W47L</u>	<u>D92H</u>	<u>C142Y</u>	<u>T194I</u>	<u>D244H</u>	<u>Q280H</u>	<u>I317N</u>	<u>G373D</u>	<u>del254aa</u>
<u>E48D</u>	<u>D92Y</u>	<u>A143T</u>	<u>V199M</u>	<u>S247P</u>	<u>Q280K</u>	<u>I317T</u>	<u>G373R</u>	<u>del358aa</u>
<u>E48K</u>	<u>D93G</u>	<u>A143P</u>	<u>S201F</u>	<u>S247C</u>	<u>T282N</u>	<u>N320I</u>	<u>G373S</u>	<u>ins247-8aa</u>
<u>R49G</u>	<u>D93N</u>	<u>G144V</u>	<u>S201Y</u>	<u>Q250P</u>	<u>Q283P</u>	<u>N320K</u>	<u>A377D</u>	

Fig. 1C

## Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

Sentido erróneo	<u>R49L</u>	<u>D93V</u>	P146S	<u>C202Y</u>	<u>A257P</u>	<u>M284T</u>	<u>N320Y</u>	<u>C378Y</u>
<u>M1T</u>	<u>R49P</u>	<u>C94Y</u>	<u>G147R</u>	C202W	<u>G258R</u>	<u>A285P</u>	<u>Q321E</u>	<u>C378R</u>
<u>M1R</u>	<u>R49S</u>	C94S	<u>S148N</u>	<u>P205R</u>	<u>P259R</u>	A285D	<u>Q321R</u>	<u>C382Y</u>
M1I	F50C	<u>W95S</u>	<u>S148R</u>	<u>P205L</u>	<u>P259L</u>	W287G	<u>G325D</u>	<u>C382W</u>
<u>L14P</u>	<u>M51K</u>	<u>A97V</u>	<u>Y152C</u>	<u>P205T</u>	<u>G260A</u>	<u>W287C</u>	<u>Q327K</u>	<u>I384N</u>
<u>L16P</u>	<u>M51I</u>	<u>A97P</u>	<u>D155H</u>	<u>Y207C</u>	<u>G261D</u>	<u>A288D</u>	<u>Q327E</u>	<u>T385P</u>
<u>L16H</u>	C52G	R100K	<u>A156V</u>	<u>Y207S</u>	W262C	<u>A288P</u>	G328R	<u>Q386P</u>
<u>L19P</u>	<u>C52R</u>	R100T	<u>A156T</u>	<u>N215S</u>	<u>N263S</u>	<u>I289F</u>	<u>G328A</u>	<u>P389R</u>
<u>A20P</u>	<u>C52S</u>	<u>E103Q</u>	W162R	<u>Y216D</u>	D264V	M290I	<u>G328E</u>	<u>F396Y</u>
<u>A31V</u>	<u>C56F</u>	<u>R112H</u>	<u>W162C</u>	<u>I219N</u>	<u>D264Y</u>	<u>A292P</u>	<u>G328V</u>	<u>E398K</u>
<u>L32P</u>	<u>C56G</u>	<u>R112S</u>	<u>G163V</u>	C223R	<u>P265R</u>	<u>P293A</u>	<u>E338K</u>	<u>L403S</u>
<u>L33Y</u>	<u>C56Y</u>	<u>R112C</u>	<u>D165V</u>	<u>C223G</u>	<u>P265L</u>	<u>P293S</u>	<u>V339E</u>	<u>I407K</u>
<u>N34K</u>	<u>E59K</u>	<u>F113L</u>	<u>L166G</u>	C223Y	<u>D266N</u>	<u>P293T</u>	<u>W340R</u>	<u>P409T</u>
<u>N34S</u>	<u>C63Y</u>	F113S	<u>L166V</u>	<u>N224S</u>	<u>D266H</u>	<u>F295C</u>	<u>E341D</u>	<u>P409A</u>
<u>G35R</u>	<u>S65T</u>	<u>R118C</u>	<u>L167P</u>	<u>N224D</u>	D266V	<u>M296I</u>	E341K	<u>P409S</u>
<u>A37V</u>	<u>E66G</u>	<u>L120P</u>	<u>K168N</u>	<u>H225R</u>	D266E	<u>M296V</u>	<u>R342Q</u>	<u>T410K</u>
<u>P40L</u>	<u>E66K</u>	<u>L120S</u>	<u>K168R</u>	<u>W226R</u>	M267R	<u>S297C</u>	<u>L344P</u>	<u>T410A</u>
<u>P40S</u>	<u>E66Q</u>	<u>A121P</u>	<u>F169S</u>	<u>W226C</u>	<u>M267I</u>	<u>S297F</u>	<u>S345P</u>	<u>G411D</u>
<u>T41I</u>	<u>L68F</u>	<u>A121T</u>	D170V	R227Q	<u>L268S</u>	<u>N298S</u>	<u>A348P</u>	<u>L414S</u>
<u>M42T</u>	<u>M72R</u>	<u>V124D</u>	<u>D170H</u>	<u>A230T</u>	<u>V269A</u>	<u>N298K</u>	<u>A350P</u>	<u>L415P</u>
<u>M42L</u>	<u>M72I</u>	G128E	G171D	<u>D231N</u>	<u>V269M</u>	<u>N298H</u>	<u>A352D</u>	
<u>M42V</u>	<u>M72V</u>	L129P	<u>G171R</u>	<u>D231G</u>	<u>I270T</u>	<u>D299G</u>	<u>I354K</u>	
<u>G43D</u>	<u>A73V</u>	L131P	<u>C172Y</u>	<u>D234E</u>	G271C	<u>L300F</u>	<u>N355K</u>	
<u>G43S</u>	<u>M76R</u>	<u>G132E</u>	<u>C172F</u>	<u>D234Y</u>	<u>G271S</u>	<u>L300H</u>	<u>R356W</u>	
<u>G43V</u>	<u>W81C</u>	<u>G132R</u>	<u>C172W</u>	<u>S235C</u>	G271V	<u>L300P</u>	<u>E358G</u>	
<u>G43R</u>	<u>W81S</u>	<u>Y134S</u>	<u>C172R</u>	<u>W236R</u>	<u>N272K</u>	<u>R301G</u>	<u>E358K</u>	

Fig. 1C (Cont.)

<u>W44C</u>	<u>G85D</u>	<u>A135V</u>	C172G	<u>W236L</u>	<u>N272S</u>	<u>R301Q</u>	<u>E358A</u>	
<u>L45R</u>	<u>Y86C</u>	<u>D136H</u>	<u>G183D</u>	<u>W236C</u>	<u>S276N</u>	<u>R301P</u>	<u>I359T</u>	
H46R	<u>Y88D</u>	G138E	<u>G183S</u>	<u>I239T</u>	<u>S276G</u>	<u>I303N</u>	<u>G360S</u>	Ins/Del pequeña
<u>H46S</u>	<u>L89P</u>	<u>G138R</u>	<u>M187T</u>	<u>I124F</u>	<u>Q279R</u>	<u>L310F</u>	<u>G361R</u>	<u>del20-24aa</u>
H46L	L89R	<u>T141I</u>	<u>M187V</u>	<u>I242N</u>	<u>Q279H</u>	<u>Q312H</u>	<u>P362L</u>	<u>del13-8aa</u>
H46Y	<u>I91T</u>	C142R	<u>L191Q</u>	<u>L243F</u>	<u>Q279E</u>	D313Y	<u>R363H</u>	<u>del153aa</u>
<u>W47G</u>	D92N	<u>C142W</u>	<u>L191P</u>	<u>D244N</u>	Q279K	<u>V316E</u>	<u>R363C</u>	<u>del205-7aa</u>
<u>W47L</u>	<u>D92H</u>	<u>C142Y</u>	<u>T194I</u>	<u>D244H</u>	<u>Q280H</u>	<u>I317N</u>	<u>G373D</u>	<u>del254aa</u>
<u>E48D</u>	D92Y	<u>A143T</u>	<u>V199M</u>	<u>S247P</u>	<u>Q280K</u>	<u>I317T</u>	<u>G373R</u>	<u>del358aa</u>
<u>E48K</u>	<u>D93G</u>	<u>A143P</u>	<u>S201F</u>	<u>S247C</u>	<u>T282N</u>	<u>N320I</u>	<u>G373S</u>	<u>ins247-8aa</u>
<u>R49G</u>	<u>D93N</u>	<u>G144V</u>	<u>S201Y</u>	<u>Q250P</u>	<u>Q283P</u>	<u>N320K</u>	<u>A377D</u>	

Mutación	Aumento relativo	CE <sub>50</sub> (µM)	Mutación	Aumento relativo	CE <sub>50</sub> (µM)	Mutación	Aumento relativo	CE <sub>50</sub> (µM)
M1R	2.6±0.4	3±1	G163V	3.5±0.4	27±9	A288D	6±1	200±40
L14P	2.5±0.4	3±1	L166V	4.8±0.5	13±4	A288P	20±1	25±1
L16H	5±1	0.3±0.1	K168N	22±3	70±30	I289F	19±4	300±50
L16P	5±1	0.8±0.3	F169S	2.7±0.4	1±0	A292P	3±1	160±40
L19P	2.3±0.3	1.3±0.5	G171C	9±2	190±80	P293A	21±3	475±100
A20P	1.5±0.1	0.3±0.1	G171R	4±1	4±1	P293S	19±2	560±210
L32P	7±1	2.2±0.3	C172S	7±2	680±200	P293T	12±2	36±8
D33Y	3±1	5±1	G183A	2.3±0.3	7±3	F295C	15±2	20±3
N34K	19±2	100±30	G183D	15±3	40±10	M296I	2.6±0.1	0.7±0.2
G35R	5±2	7±2	G183S	7±1	7±2	M296V	1.9±0.1	0.7±0.3
L36F	10±1	13±4	Y184C	15±1	74±1	S297C	3±1	620±20
A37V	1.6±0.1	23±9	M187T	8±2	23±8	N298H	9.4±0.4	700±100
P40L	3.8±0.2	39±16	M187V	5±1	16±1	N298K	5±2	38±18
P40S	3±1	3±1	L191P	2.0±0.3	7±2	N298S	2.8±0.1	1.4±0.2
T41I	1.3±0.1	0.3±0.1	L191Q	16±3	150±60	D299G	15±2	1500±140
M42L	1.5±0.1	7±2	T194I	12±2	19±1	L300F	6±1	3±1
M42R	5±1	12±5	V199M	1.2±0.1	4±2	L300P	12±1	6±2
M42T	18±1	42±16	S201F	8±2	2±1	R301G	1.8±0.2	2.5±0.4
M42V	14±2	120±20	S201Y	6.0±0.3	15±3	R301P	42±4	120±14
L45R	17±4	40±5	P205L	9±1	260±50	R301Q	6.2±0.3	3.8±0.2
W47L	5±1	11±3	P205R	4±1	70±30	I303N	14±1	70±20
E48D	7±2	100±37	P205S	5±2	4±1	K308N	7±1	24±8
E48K	6±1	4±2	P205T	8±2	2±0	A309P	26±5	33±10
R49G	3±1	4±1	Y207C	7±2	500±200	L310F	17±0	70±10
R49L	11±2	80±20	Y207S	3.2±0.4	67±5	Q312H	12±2	15±2
R49P	3±1	3±1	N215D	1.2±0.1	9±4	Q312R	2±0	10±1
R49S	4±1	5±2	N215S	3±0	4±1	D313G	1.4±0.1	8±2
M51I	1.5±0.1	3±1	Y216C	13±1	36±8	V316E	5±1	600±100
M51K	2.9±0.3	2±0	Y216D	16±1	350±150	I317N	9±1	80±10
C52R	4±1	53±23	I219N	13±1	167±67	I317T	5±1	10±2
L54P	16±2	8±2	N224D	13±3	190±40	N320I	23±3	40±10
D55V	15±2	3±1	N224S	2.6±0.1	6±2	N320Y	18±2	300±80
C56F	16±1	28±6	H225R	27±2	900±100	Q321E	21±3	90±30
C56G	7±1	400±100	A230T	4±1	27±12	Q321L	12±1	18±3
C56Y	14±3	50±18	D234E	14±3	340±50	Q321R	3±1	7±1
E59K	3±1	35±14	S235C	4.8±0.1	120±40	G325D	14±4	360±120
P60L	5±2	1.7±0.7	W236L	9±2	900±150	G325S	3±1	1.7±0.1
S65T	3±1	2.2±0.6	S238N	2.8±0.4	1.5±0.3	Q327E	2.4±0.2	11±2
E66G	2±1	4±1	I239T	1.7±0.1	3±1	G328A	19±5	14±2
E66K	4±2	11±4	I242N	12±1	9±1	E338K	4±0	16±4
E66Q	2±1	5±2	L243F	8±1	10±2	V339E	2±0	7±2
L68F	11±2	100±30	L243W	37±2	21±4	W340R	10±2	100±40
M72R	7±1	700±250	D244N	4±2	4±1	E341D	3±0	17±4
M72V	2.2±0.2	0.6±0.1	D244H	3±1	1.2±0.4	R342Q	4±2	16±7
A73V	1.4±0.1	0.9±0.3	S247C	2.0±0.3	8±1	S345P	8±1	76±5
M76R	3±1	6±2	S247P	16±3	350±120	A348P	2±0	5±2
M76T	9±1	11±3	Q250P	2.1±0.1	6±2	A352D	5±1	160±30
W81C	19±1	70±20	I253T	1.7±0.1	1.4±0.3	I354K	19±4	17±3
W81S	4±1	25±12	A257P	3.3±0.4	5±1	R356W	3±1	1.0±0.1
G85D	7±1	12±2	G258V	16±4	15±4	E358A	21±2	9±2
G85M	2.3±0.2	2.6±0.6	P259L	8±3	9±1	E358G	7±1	20±10
Y88D	3.4±0.4	52±17	P259R	3.3±0.4	2±1	E358K	3±1	400±100
I91T	12±1	6±2	G260A	9±3	12±1	I359T	1.5±0.1	4±2
C94Y	2.1±0.4	0.8±0.4	G261D	16±3	150±50	G360D	12±0	15±3
W95S	4±1	300±50	N263S	5±1	2.5±0.4	G360S	1.8±0.2	9±3
A97P	8±1	43±14	D264Y	13±3	18±4	G361R	10±1	7±2
A97V	3±1	0.8±0.2	P265L	2.7±0.2	1.1±0.1	P362L	7±2	3±1
R112C	15±2	300±60	P265R	13±1	97±27	R363C	2.3±0.3	2±1
R112H	5±1	2.5±0.5	M267I	1.6±0.1	6±2	R363H	1.7±0.1	1.0±0.4
R112S	8±2	90±38	L268S	1.5±0.1	0.7±0.3	R363P	21±5	120±40
F113L	2.3±0.2	2±1	V269A	13±2	22±9	G373D	3.2±0.4	5±2
I117S	3±1	2±1	V269M	4±1	2.0±0.6	G373S	2.6±0.4	2±1
R118C	1.4±0.1	6±2	I270T	11±2	10±0	E398K	1.3±0.1	7±2
L120P	6±2	20±9	G271S	22±8	24±2	L403S	1.6±0.1	16±5
A121T	3±1	0.3±0.1	N272K	3±1	17±7	P409A	10±2	5±1
A135V	14±2	350±120	N272S	5±1	228±86	P409S	15±2	3±1
D136H	5±1	23±5	S276G	22±1	9±1	P409T	5±1	1.3±0.5
A143T	1.3±0.1	4±1	S276N	9±2	22±7	T410A	19±3	2±1
G144V	21±6	38±14	Q279E	5±1	23±5	T410I	14±4	3.8±0.2
G147R	2.4±0.4	4±2	Q279H	5±1	61±26	T410P	20±5	1200±580
S148N	18±3	1400±400	Q279R	4±0	12±5	G411D	15±0	6±2
Y152C	4±1	26±11	Q280H	5±1	6±1	L414S	6±1	18±3
A156T	13±1	50±10	Q280K	1.7±0.1	1.1±0.3	254del1	1.6±0.1	3±1
A156V	19±2	44±9	T282A	15±5	24±3	247ms8	21±1	400±180
A156Y	5±1	50±10	M284T	20±5	28±8	D55V/Q57L	24±5	8±4
W162G	9±1	13±4	W287C	20±4	1000±100	401ms/T401S	4±1	11±3

**FIG. 2A: Mutaciones sensibles a DGJ descritas en la Figura 1A: Potencia y magnitud de respuesta**

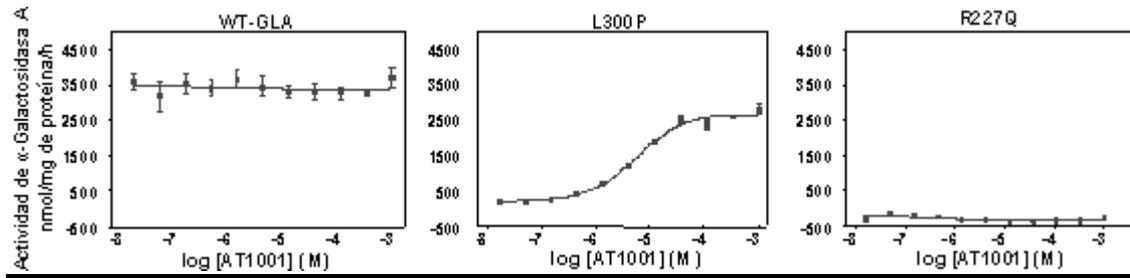
Mutación	Aumento relativo (veces)	CE <sub>50</sub> (µM)	Mutación	Aumento relativo (veces)	CE <sub>50</sub> (µM)
L14P	3.0±0.4	2.6±0.8	D244H	3.0±1.0	1.2±0.4
A20P	1.5±0.1	0.3±0.1	P259R	3.0±0.4	2.1±0.5
L32P	7.0±1.0	2.2±0.3	P259L	8.4±3.0	9.0±0.5
D33Y	2.9±0.5	5.4±1.4	G260A	8.5±2.6	12±1
N34K	18±2	100±31	N263S	4.8±1.2	2.5±0.4
G35R	5.0±1.6	7.0±1.5	D264Y	13±3	18±4
P40L	4.0±0.2	39±16	P265R	13±1	96±27
P40S	3.0±0.6	2.6±0.8	P265L	2.7±0.2	1.1±0.1
T41I	1.0±0.1	0.3±0.1	P265R	13±1	97±27
M42T	18±1	42±16	M267I	1.6±0.2	5.6±2.5
M42V	14±2	123±23	L268S	1.5±0.1	0.7±0.3
L45R	17±4	39±5	V269A	13±2	22±9
W47L	5.0±1.0	11±3	V269M	3.8±0.9	2.6±0.6
E48D	6.7±1.8	105±37	I270T	11±2	10.0±0.3
E48K	6.0±1.0	4.4±2.0	G271S	22±8	24±2
R49G	3.0±0.5	3.6±1.4	N272K	3.3±0.7	17±7
R49L	11±2	76±19	N272S	4.6±0.8	228±86
R49S	4.0±1.0	5.3±2.6	S276N	9.0±2.3	22±7
M51I	1.5±0.1	2.9±0.8	S276G	22±1	9.0±1.0
M51K	3.0±0.3	1.8±0.6	Q279E	4.5±0.6	22±5
C52R	3.6±0.6	53±23	Q279H	4.7±0.7	61±26
C56F	16±1	28±6	Q279R	3.5±0.3	11.9±5.6
C56G	6.5±1.0	400±77	Q280H	4.7±1.0	5.4±0.8
E59K	3.4±0.5	35±14	Q280K	1.7±0.1	1.1±0.3
S65T	3.0±0.5	2.2±0.6	M284T	20±4	28±8
E66G	1.6±0.2	3.9±1.5	W287C	20±4	968±74
E66K	3.7±1.0	10.8±4.5	A288D	5.7±0.6	199±36
E66Q	2.3±0.7	5.0±2.0	A288P	20±1	25±1
L68F	10.9±1.7	112±28	I289F	18±4	308±48
M72R	6.6±1.4	685±255	A292P	3.0±0.5	159±42
M72V	2.0±0.2	0.6±0.1	P293A	20±2	475±96
A73V	1.4±0.1	0.9±0.3	P293S	19±2	563±218
M76R	3.0±0.7	6.0±2.0	F295C	15±2	18±5
W81S	3.8±1.4	25±12	M296I	2.6±0.1	0.7±0.2
Y88D	3.4±0.4	52±17	M296V	1.9±0.1	0.7±0.3
I91T	12±2	5.9±2.5	S297C	3.0±0.7	616±230
C94Y	2.0±0.4	0.8±0.3	N298S	2.8±0.0	1.4±0.2
W95S	4.0±0.8	312±52	N298K	5.2±2.2	38±18
A97V	3.0±0.5	0.8±0.3	L300F	5.5±1.3	3.4±0.8
A97P	7.7±1.4	43±14	L300P	12±1	6.0±1.6
R112H	5.0±0.5	2.5±0.5	R301Q	6.5±0.3	3.8±0.4
R112C	15±2	297±59	R301P	42±4	118±14
R112S	8.0±1.8	91±28	I303N	13±1	68±22
F113L	2.3±0.2	2.4±1.0	L310F	17±0	71±11
R118C	1.4±0.1	6.0±2.0	Q312H	12±2	15±2
L120P	5.7±2.3	20±9	V316E	5.0±0.7	627±143
A121T	2.6±0.5	0.3±0.1	I317T	5.0±1.4	10±2
D136H	5.0±1.0	23±5	I317N	9.4±1.0	83±24
A143T	1.3±0.1	4.3±1.3	N320I	23±3	39±12
G144V	21±6	38±14	N320Y	18±1	295±76
G147R	2.4±0.4	4.2±1.6	Q321E	21±3	90±35
S148N	18±2	1391±442	Q321R	3.4±1.1	7.0±0.8
A156T	13±1	47±10	G325D	12±2	323±102
A156V	19±2	44±9	Q327E	2.4±0.2	11±2
L166V	5.0±0.5	13±4	G328A	18±5	14±2
K168N	22±3	68±32	E338K	4.4±0.2	16±4
G183S	6.8±1.0	7.1±1.9	W340R	10.0±1.5	103±38
G183D	15±3	42±13	E341D	2.9±0.1	17±4
M187T	8.4±2.0	23±8	R342Q	4.0±1.4	16±7
M187V	4.9±1.2	16±1	S345P	8.2±0.6	76±5
L191P	20±0	6.5±2.5	A348P	1.6±0.0	4.8±2.3
L191Q	16±4	148±61	A352D	5.0±0.5	163±28
T194I	12±2	19±1	I354K	19±4	17±3
V199M	1.2±0.0	3.5±1.6	R356W	2.8±0.6	0.9±0.1
S201F	8±2	2.1±0.6	E358A	21±2	9.4±2.0
S201Y	6.0±0.3	15±3	E358G	7.3±0.6	20±0
P205L	8.5±0.8	260±54	E358K	2.8±0.6	400±117
P205R	4.0±0.7	70±30	G361R	9.7±0.8	7.2±2.2
P205T	7.7±2.0	2.4±0.4	P362L	7.2±1.5	2.7±0.7
Y207S	3.2±0.4	67±5	R363H	1.7±0.1	1.0±0.4
N215S	2.6±0.3	4.3±0.9	R363C	2.3±0.3	2.1±0.9
I219N	13±1	167±67	G373D	3.2±0.4	5.4±2.6
N224D	13±3	186±39	G373S	2.6±0.4	2.2±0.7
N224S	2.6±0.1	6.3±1.8	E398K	1.3±0.0	6.9±2.4
H225R	27±2	860±135	P409S	14±2	2.7±0.6
D234E	14±3	341±47	T410A	19±3	2.3±0.9
I242N	12±1	9.3±1.0	G411D	15±0	5.8±2.0
L243F	8±1	9.9±1.5	L414S	5.8±0.6	18±3
D244N	4.0±1.0	3.5±1.3	Ins247-8	21±1	405±176

**FIG. 2B: Mutaciones sensibles a DGJ descritas en la Figura 1B: Potencia y magnitud de respuesta**

Mutación	Nº de veces de aumento	CE <sub>50</sub> (uM)	Mutación	Nº de veces de aumento	CE <sub>50</sub> (uM)
L14P	2.50±0.44	2.59±0.75	M267I	1.59±0.08	5.66±2.38
A20P	1.47±0.10	0.34±0.16	V269M	3.81±0.90	2.60±0.62
L32P	6.85±1.04	2.24±0.34	I270T	10.99±1.62	10.02±0.31
N34K	18.53±2.32	100.89±30.83	G271S	22.10±8.22	24.17±1.96
G35R	5.40±1.59	6.98±1.51	S276N	9.04±2.33	21.54±7.07
P40L	3.75±0.24	39.03±15.93	S276G	22.16±0.61	8.99±0.97
P40S	3.10±0.61	2.57±0.75	Q279E	4.52±0.63	22.46±4.98
T41I	1.29±0.09	0.32±0.10	Q279H	4.69±0.70	61.31±26.33
L45R	17.04±3.88	38.70±5.30	Q279R	3.47±0.34	11.93±5.58
W47L	4.73±1.22	10.83±3.20	Q280H	4.69±1.05	5.45±0.85
E48K	6.00±1.12	4.44±2.08	Q280K	1.70±0.10	1.09±0.26
R49G	3.44±0.54	3.64±1.36	M284T	19.92±4.56	28.31±7.83
R49L	10.93±1.71	75.71±18.70	W287C	20.11±3.61	968.45±74.22
R49S	3.56±0.81	5.26±2.62	A288D	5.67±0.61	198.63±36.31
M51K	287±0.26	1.82±0.56	A288P	19.52±0.70	25.33±1.44
C52R	3.62±0.57	53.08±22.95	I289F	18.53±4.44	308.39±48.52
E59K	3.41±0.49	34.77±13.52	A292P	3.07±0.51	158.87±41.66
E66Q	2.29±0.68	5.33±2.26	P293A	20.56±2.58	474.88±96.29
M72V	2.19±0.15	0.59±0.14	P293S	18.73±2.32	562.60±218.18
A73V	1.39±0.14	0.94±0.34	F295C	14.85±2.54	18.44±4.69
M76R	2.98±0.71	6.18±2.02	M296I	2.56±0.07	0.69±0.17
I91T	12.15±1.20	5.93±2.36	M296V	1.94±0.05	0.70±0.32
C94Y	2.12±0.36	0.79±0.35	S297C	2.99±0.74	616.10±230.41
W95S	4.02±0.79	312.17±52.17	N298S	2.79±0.02	1.42±0.21
A97V	2.70±0.50	0.78±0.26	N298K	5.20±2.22	38.12±18.48
R112H	4.85±0.48	2.54±0.47	L300F	5.53±1.31	3.35±0.80
R112C	15.34±1.94	296.59±59.28	L300P	12.38±1.39	6.04±1.56
F113L	2.33±0.19	2.39±0.90	R301Q	6.54±0.33	3.85±0.35
A121T	2.62±0.48	0.33±0.05	R301P	41.85±4.24	118.30±13.89
A143T	1.34±0.06	4.26±1.30	I303N	13.46±1.24	68.23±22.49
G144V	38.32±13.72	2.5±0.76	L310F	17.39±0.15	71.46±10.68
A156V	19.06±2.33	44.42±8.94	Q312H	12.39±2.11	15.38±2.49
L166V	4.77±0.51	12.94±4.03	V316E	4.99±0.74	627.13±142.62
G183D	14.71±3.41	41.60±12.82	I317T	5.06±1.37	10.14±2.48
T194I	12.39±2.05	18.93±0.89	N320I	23.24±2.77	38.92±11.74
S201F	8.43±2.18	2.08±0.63	N320Y	18.34±1.47	295.33±76.01
S201Y	5.97±0.34	15.31±3.24	Q321E	20.65±2.84	89.80±34.91
P205R	4.09±0.66	69.75±30.16	Q321R	3.35±1.12	7.01±0.80
P205T	7.69±2.03	2.42±0.42	G325D	12.23±1.99	323.52±102.44
Y207S	3.24±0.44	66.62±5.11	Q327E	2.43±0.23	11.30±2.06
N215S	2.55±0.34	4.25±0.87	G328A	18.54±5.39	13.56±1.82
I219N	13.22±0.64	167.06±66.53	E338K	4.37±0.15	16.27±4.34
N224S	2.57±0.14	6.34±1.84	W340R	10.13±1.50	103.46±37.51
H225R	27.40±1.84	859.83±134.62	E341D	2.86±0.11	16.83±3.83
D234E	13.64±3.01	341.35±47.17	R342Q	4.03±1.45	15.70±6.79
I242N	12.02±0.70	9.29±1.05	S345P	8.15±0.61	76.21±4.89
L243F	8.36±0.67	9.86±1.51	A348P	1.60±0.03	4.75±2.29
D244N	4.05±1.47	3.50±1.26	I354K	18.89±3.89	17.20±2.91
D244H	3.17±0.97	1.24±0.42	R356W	2.78±0.57	0.95±0.09
P259R	3.31±0.42	2.10±0.49	E358K	2.81±0.57	400.63±117.46
P259L	8.40±2.98	9.04±0.51	R363H	1.71±0.13	0.98±0.39
G260A	8.47±2.58	12.29±1.04	R363C	2.33±0.28	2.08±0.92
N263S	4.77±1.19	2.49±0.35	G373D	3.22±0.42	5.43±2.58
D264Y	13.15±3.23	18.24±3.73	G373S	2.64±0.42	2.24±0.69
P265R	12.61±1.21	96.58±26.62	E398K	1.28±0.03	6.94±2.43
P265L	2.74±0.20	1.10±0.07	P409S	14.45±1.75	2.67±0.61

**FIG. 2C: Mutaciones sensibles a DGJ descritas en la Figura 1C: Potencia y magnitud de respuesta**

FIG. 3



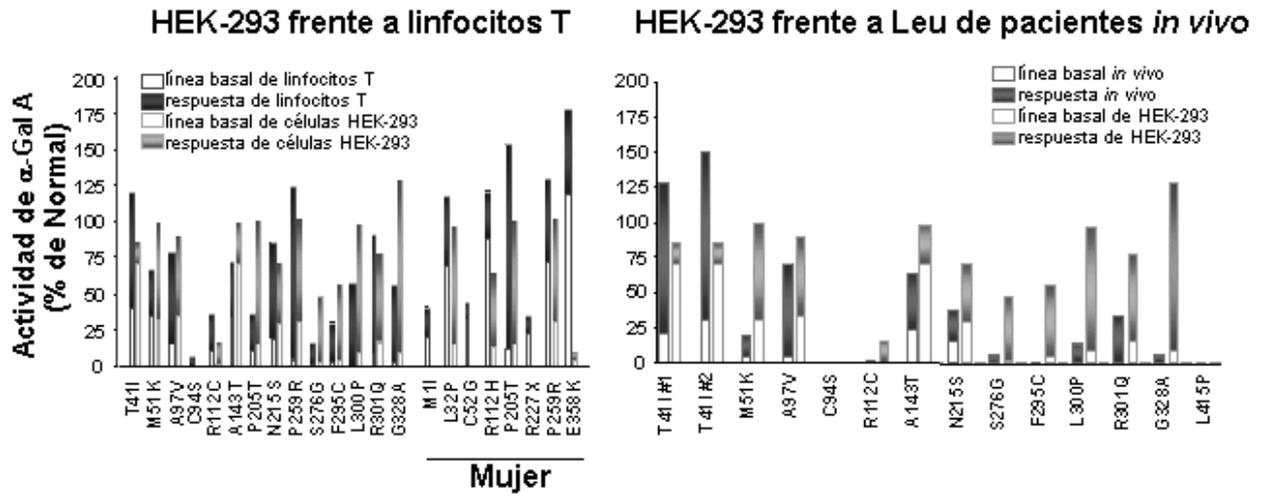


FIG. 4

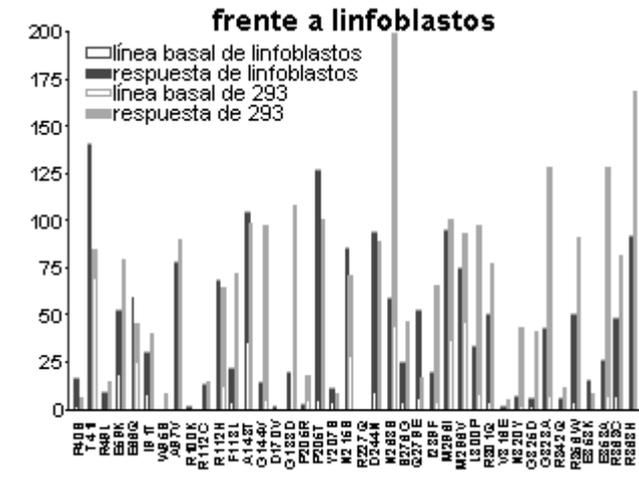


FIG. 5

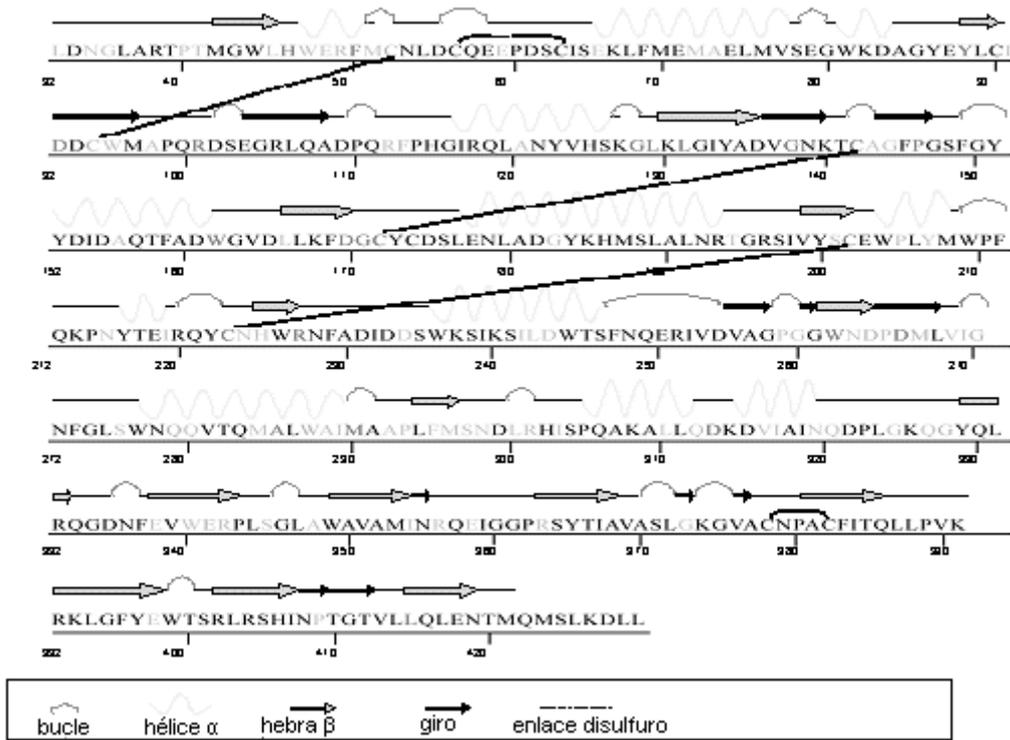


Fig. 6

Mutación de $\alpha$ -Gal A	Cebador	Mutación de $\alpha$ -Gal A	Cebador
GLA-M1I-5'	CGTGACAATACAGCTGAG	GLA-R227Q-3'	GTCAGCAAAAATTTTGCCAGTGAT TGC
GLA-M1I-3'	CTCAGCTGTATTGTCACG	GLA-A230T-5'	gcgaaat ttt actgacattgatg
GLA-M1T-5	CACCGTGACA ACG CAGCTGAGG	GLA-A230T-3'	CAT CAA TGT CAG TAA AAT TTC GC
GLA-M1T-3	CCT CAG CTG CGT TGT CAC GGT G	GLA-D231N-5	GGCGAAATTTTGCT aAC ATTGATGATTCTTG
GLA-L14P-5'	GGCTGCGCGCCTGCGCTTCG	GLA-D231N-3	CAG GAA TCA TCA ATG TTA GCA AAA TTT CGC C
GLA-L14P-3'	CGAAGCGCAGGCGCGCAGCC	GLA-D231G-5'	CGAAATTTTGCT GgC ATTGATGATATTC
GLA-L16P/H-5'	GCGCTTGC GCMTCGCTTCCTGG	GLA-D231G-3'	GAA TAT CAT CAA TGC CAG CAA AAT TTC G
GLA-L16P/H-3'	CCAGGAAGCGAKGCGCAAGCGC	GLA-D234E-5'	tgacattgat gag tcctggaaaag
GLA-L19P-5'	GCTTCGCTTCCCGGCCCTCGTTTC	GLA-D234E-3'	CTT TTC CAG GAC TCA TCA ATG TCA
GLA-L19P-3'	GAAACGAGGGCCGGGAAGCGAAGC	GLA-D234Y-5	GCTGACATTGAT tAT TCCTGGAAAAG
GLA-A31V-5'	GGGGCTAGAGTACTGGACAATGG	GLA-D234Y-3	CTT TTC CAG GAA TAA TCA ATG TCA GC
GLA-A31V-3'	CCATTGTCCAGTACTCTAGCCCC	GLA-S235C-5	CTGACATTGATGAT TgC TGGAAAAGTATAAAGAG
GLA-L32P-5'	GCTAGAGCACCGGACAATGGA	GLA-S235C-3	CTC TTT ATA CTT TTC CAG CAA TCA TCA ATG TCA G
GLA-L32P-3'	TCCATTGTCCGGTGCTCTAGC	GLA-W236R-5	GCTGACATTGATGATTCC cGG AAAAGTATAAAGAGTATC
GLA-L32P-5'	GCTAGAGCACCGGACAATGGA	GLA-W236R-3	GAT ACT CTT TAT ACT TTT CCG GGA ATC ATC AAT GTC AGC
GLA-L32P-3'	TCCATTGTCCGGTGCTCTAGC	GLA-W236L-5'	TGATGATTCC TTG AAAAGTATAA
GLA-D33Y-5'	CTAGAGCACTGTACAATGGATTG	GLA-W236L-3'	TTA TAC TTT TCA AGG AAT CAT CA
GLA-D33Y-3'	CAATCCATTGTACAGTGCTCTAG	GLA-W236L-5	ctGACATTGATGATTCC TtG AAAAGTATAAAGAG
GLA-N34K-5'	GCACTGGACAAAGGATTGGC	GLA-W236L-3	CTC TTT ATA CTT TTC AAG GAA TCA TCA ATG TCA G
GLA-N34K-3'	GCCAATCCTTTGTCCAGTGTC	GLA-W236C-5	GCTGACATTGATGATTCC TGt AAAAGTATAAAGAGTATCTTGG
GLA-N34S-5'	GCACTGGACAGTGGATTGGC	GLA-W236C-3	CCA AGA TAC TCT TTA TAC TTT TAC AGG AAT CAT CAA TGT CAG C
GLA-N34S-3'	GCCAATCCACTGTCCAGTGTC	GLA-I239T-5'	TGGAAAAGT ACA AAGAGTATC
GLA-G35R-5'	CTGGACAATAGATTGGCAAGG	GLA-I239T-3'	GAT ACT CTT TGT ACT TTT CCA

Fig. 6 (Cont.)

GLA-G35R-3'	CCTTGCCAATCTATTGTCCAG	GLA-I239T-5	GATTCCTGGAAAAGT AcA AAGAGTATCTTGGACTG
GLA-A37V-5'	AATGGATTGGTAAGGACGCC	GLA-I239T-3	CAG TCC AAG ATA CTC TTT GTA CTT TTC CAG GAA TC
GLA-A37V-3'	GGCGTCCTTACCAATCCATT	GLA-I242F-5'	AGTATAAAGAGT TTC TTGGACTGGAC
GLA-P40L-5'	GCAAGGACGCTTACCATGGG	GLA-I242F-3'	GTC CAG TCC AAG AAA CTC TTT ATA CT
GLA-P40L-3'	CCCATGGTAAGCGTCCTTGC	GLA-I242N-5'	GTATAAAGAGT AAC TTGGACTGG
GLA-P40S-5'	GCAAGGACGTCTACCATGGG	GLA-I242N-3'	CCA GTC CAA GTT ACT CTT TAT AC
GLA-P40S-3'	CCCATGGTAGACGTCCCTTGC	GLA-L243F-5'	AGAGTATCTTCGACTGGACATC
GLA-M42T-5	AGGACGCCTACC AcG GGCTGGCTGCAC	GLA-L243F-3'	GAT GTC CAG TCG AAG ATA CTC T
GLA-M42T-3	GTG CAG CCA GCC CGT GGT AGG CGT CCT	GLA-D244H-5'	GAGTATCTTG CACTGGACATC
GLA-M42L-5	AGGACGCCTACC TTG GGCTGGCTGCAC	GLA-D244H-3'	GAT GTC CAG TCG AAG ATA CTC T
GLA-M42L-3	GTG CAG CCA GCC CAA GGT AGG CGT CCT	GLA-S247C-5'	CTTGGACTGGACATGTTTTAACC AGGAGAG
GLA-M42V-5	AGGACGCCTACC GTG GGCTGGCTGC	GLA-S247C-3'	CTC TCC TGG TTA AAA CAT GTC CAG TCC AAG
GLA-M42V-3	GCA GCC AGC CCA CGG TAG GCG TCC T	GLA-S247P-5'	GGACTGGACA CCTTTTAACCA
GLA-G43D/V-5'	CTACCATGGWCTGGCTGCAC	GLA-S247P-3'	TGG TTA AAA GGT GTC CAG TCC
GLA-G43D/V-3'	GTGCAGCCAGWCCATGGTAG	GLA-A257P-5'	GTTGATGTT CCTGGACCAG
GLA-G43R-5'	CTACCATGCGCTGGCTGCAC	GLA-A257P-3'	CTG GTC CAG GAA CAT CAA C
GLA-G43R-3'	GTGCAGCCAGCGCATGGTAG	GLA-G258R-5'	GATGTTGCT CGACCAGGGG
GLA-W44C-5'	CATGGGCTGTCTGCACTGG	GLA-G258R-3'	CCC CTG GTC GAG CAA CAT C
GLA-W44C-3'	CCAGTGCAGACAGCCCATG	GLA-P259R-5'	GATGTTGCTGGACGAGGGGGTT GGA
GLA-L45R-5'	ATGGGCTGGCGGCACTGGGAG	GLA-P259R-3'	TCCAACCCCTCGTCCAGCAACA TC
GLA-L45R-3'	CTCCCAGTGCCGCCAGCCCAT	GLA-P259L-5'	GTTGCTGGACTAGGGGGTTGG
GLA-H46R-5'	CTGGCTGCGCTGGGAGC	GLA-P259L-3'	CCA ACC CCC TAG TCC AGC AAC
GLA-H46R-3'	GCTCCCAGCGCAGCCAG	GLA-G260A-5'	GCTGGACCA GCG GGTTGGAATG
GLA-H46Y-5'	CTGGCTGTACTGGGAGC	GLA-G260A-3'	CAT TCC AAC CCG CTG GTC CAG C
GLA-H46Y-3'	GCTCCCAGTACAGCCAG	GLA-G261D-5'	GGACCAGGG GAT TGAATGAC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-W47G-5'	CTGGCTGCACGGGGAGCGCTTC	GLA-G261D-3'	GTC ATT CCA ATC CCC TGG TCC
GLA-W47G-3'	GAAGCGCTCCCCGTGCAGCCAG	GLA-W262C-5'	CAGGGGGT TGC AATGACCCAG
GLA-W47L-5'	CTGGCTGCACTTGGAGCGCTTC	GLA-W262C-3'	CTG GGT CAT TGC AAC CCC CTG
GLA-W47L-3'	GAAGCGCTCCAAGTGCAGCCAG	GLA-N263S-5'	GGGGTTGG AGT GACCCAGA
GLA-E48K-5'	GCTGCACTGGAAGCGCTTCATG	GLA-N263S-3'	TCT GGG TCA CTC CAA CCC C
GLA-E48K-3'	CATGAAGCGCTTCCAGTGCAGC	GLA-D264V-5'	GGTTGGAAT GTC CCAGATATG
GLA-R49P/L-5'	ACTGGGAGCYCTTCATGTGC	GLA-D264V-3'	CAT ATC TGG GAC ATT CCA ACC
GLA-R49P/L-3'	GCACATGAAGRGCTCCCAGT	GLA-D264Y-5'	GGGTTGGAAT TAC CCAGATATG
GLA-R49S/G-5'	CACTGGGAGRGCTTCATGT	GLA-D264Y-3'	CAT ATC TGG GTA ATT CCA ACC C
GLA-R49S/G-3'	ACATGAAGCYCTCCCAGTG	GLA-P265R-5'	TGGAATGAC CGA GATATGTTA
GLA-F50C-5'	CTGGGAGCGCTGCATGTGCAAC	GLA-P265R-3'	TAA CAT ATC TCG GTC ATT CCA
GLA-F50C-3'	GTTGCACATGCAGCGCTCCCAG	GLA-P265L-5'	TTGGAATGAC CTA GATATGTTAG
GLA-M51K-3'	GAGCGCTTCAAGTGCAACCTTG	GLA-P265L-3'	CTA ACA TAT CTA GGT CAT TCC AA
GLA-M51K-5'	CAAGGTTGCACTTGAAGCGCTC	GLA-D266N/H-5'	GGAATGACCCA mAT ATGTTAGTG
GLA-M51I-5'	GCGCTTCATATGCAACC	GLA-D266N/H-3'	CAC TAA CAT ATT GGG TCA TTC C
GLA-M51I-3'	GGTTGCATATGAAGCGC	GLA-D266H-5'	GGTTGGAATGACCCA cAT ATGTTAGTGATTGG
GLA-C52S-5'	GAGCGCTTCATGTCCAACCTTGACTG	GLA-D266H-3'	CCA ATC ACT AAC ATA TGT GGG TCA TTC CAA CC
GLA-C52S-3'	CAGTCAAGGTTGGACATGAAGCGCTC	GLA-D266V-5'	GAATGACCCA GTT ATGTTAGTG
GLA-C52G/R-5'	CGCTTCATGSGCAACCTTGAC	GLA-D266V-3'	CAC TAA CAT AAC TGG GTC ATT C
GLA-C52G/R-3'	GTCAAGGTTGCSCATGAAGCG	GLA-D266E-5'	ATGACCCA GAA ATGTTAGTGA
GLA-C56G-5'	CAACCTTGACGGCCAGGAAG	GLA-D266E-3'	TCA CTA ACA TTT CTG GGT CAT
GLA-C56G-3'	CTTCCTGGCCGTCAAGGTTG	GLA-M267R-5'	GACCCAGAT AGG TTAGTGATTG
GLA-C56Y/F-5'	CAACCTTGACTWCCAGGAAGAG	GLA-M267R-3'	CAA TCA CTA ACC TAT CTG GGT C
GLA-C56Y/F-3'	CTCTTCCTGGWAGTCAAGGTTG	GLA-M267I-5'	GACCCAGAT ATA TTAGTGATTGG
GLA-C56Y-5'	GTGCAACCTTGACTACCAGGAAGAGCCAG	GLA-M267I-3'	CCA ATC ACT AAT ATA TCT GGG TC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-C56Y-3	CTG GCT CTT CCT GGT AGT CAA GGT TGC AC	GLA-L268S-5'	CCA GAT ATG TCA GTG ATT GGC
GLA-C63Y-5	gaGCCAGATTCC TAC ATCAGTGAGAagc	GLA-L268S-3'	GCC AAT CAC TGA CAT ATC TGG
GLA-C63Y-3	GCT TCT CAC TGA TGT AGG AAT CTG GCT C	GLA-V269A-5'	gatatgta gcg attggcaac
GLA-S65T-5'	TCCTGCATCACTGAGAAGCTC	GLA-V269A-3'	GTT GCC AAT CGC TAA CAT ATC
GLA-S65T-3'	GAGCTTCTCAGTGATGCAGGA	GLA-V269M-5'	CAG ATA TGT TAA TGA TTG GCA AC
GLA-E66K-5'	CTGCATCAGTAAGAAGCTCTTC	GLA-V269M-3'	GTT GCC AAT CAT TAA CAT ATC TG
GLA-E66K-3'	GAAGAGCTTCTTACTGATGCAG	GLA-I270T-5'	TATGTTAGTGA C TGGCAACTTTG
GLA-E66G-5'	CTGCATCAGTGGGAAGCTCTTC	GLA-I270T-3'	CAA AGT TGC CAG TCA CTA ACA TA
GLA-E66G-3'	GAAGAGCTTCCCACTGATGCAG	GLA-G271V-5'	TTAGTGATTGTCAACTTTG
GLA-L68F-5'	CAGTGAGAAGTTCTTCATGG	GLA-G271V-3'	CAAAGTTGACAATCACTAA
GLA-L68F-3'	CCAGGAAGAAGTTCTCACTG	GLA-G271C-5'	GTTAGTGATT T GCAACTTTGG
GLA-L68F-5	GCATCAGTGAGAAG tTC TTCATGGAGATG	GLA-G271C-3'	CCA AAG TTG CAA ATC ACT AAC
GLA-L68F-3	CAT CTC CAT GAA GAA CTT CTC ACT GAT GC	GLA-G271S-5'	TGTTAGTGATT A GCAACTTTGGC
GLA-M72R-5'	CTTCATGGAGAGGGCAGAGCTC	GLA-G271S-3'	GCC AAA GTT GCT AAT CAC TAA CA
GLA-M72R-3'	GAGCTCTGCCCTCTCCATGAAG	GLA-N272K-5'	GTGATTGGC AAA TTTGGCCTCAG
GLA-M72I-5'	CTTCATGGAGATAGCAGAGCTC	GLA-N272K-3'	CTG AGG CCA AAT TTG CCA ATC AC
GLA-M72I-3'	GAGCTCTGCTATCTCCATGAAG	GLA-N272S-5'	GTGATTGGC AGC TTTGGCCTC
GLA-A73V-5'	CATGGAGATGGTAGAGCTCATG	GLA-N272S-3'	GAG GCC AAA GCT GCC AAT CAC
GLA-A73V-3'	CATGAGCTCTACCATCTCCATG	GLA-S276G-5'	CAACTTTGGCCTCGGCTGGAA TCAG
GLA-M76R-5'	GCAGAGCTCAGGGTCTCAGAAG	GLA-S276G-3'	CTGATTCCAGCCGAGGCCAAA GTTG
GLA-M76R-3'	CTTCTGAGACCCTGAGCTCTGC	GLA-S276N-5'	CTTTGGCCTC AAC TGGAATCAGC
GLA-W81C-5'	CTCAGAAGGC TGt AAGGATGCAGGT	GLA-S276N-3'	GCT GAT TCC AGT TGA GGC CAA AG
GLA-W81C-3'	ACC TGC ATC CTT ACA GCC TTC TGA G	GLA-Q279R-5'	AGCTGGAAT CGG CAAGTAACTC
GLA-W81S-5'	CTCAGAAGGCTCGAAGGATGCA	GLA-Q279R-3'	GAG TTA CTT GCC GAT TCC AGC T
GLA-W81S-3'	TGCATCCTTCGAGCCTTCTGAG	GLA-Q279H-5'	CAGCTGGAAT CAC CAAGTAACTC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-G85D-5'	GAAGGATGCAGATTATGAGTAC	GLA-Q279H-3'	GAG TTA CTT GGT GAT TCC AGC TG
GLA-G85D-3'	GTACTCATAATCTGCATCCTTC	GLA-Q279K-5'	CAGCTGGAAT AAG CAAGTAAC
GLA-Y86C-5	GGATGCAGGT TGT GAGTACCTCTGc	GLA-Q279K-3'	GTT ACT TGC TTA TTC CAG CTG
GLA-Y86C-3	GCA GAG GTA CTC ACA ACC TGC ATC C	GLA-Q280H-5'	GGAATCAGCAT GTAACCTCAGA
GLA-Y88D-5'	GGTTATGAGGACCTCTGCATTG	GLA-Q280H-3'	TCT GAG TTA CAT GCT GAT TCC
GLA-Y88D-3'	CAATGCAGAGGTCTCATAACC	GLA-Q280K-5'	CTGGAATCAG AAA GTAACCTCAG
GLA-L89P/R-5'	GTTATGAGTACCSCTGCATTGATG	GLA-Q280K-3'	CTG AGT TAC TTT CTG ATT CCA
GLA-L89P/R-3'	CATCAATGCAGSGGTACTCATAAC	GLA-T282N-5'	CAGCAAGTAAATCAGATGGCC
GLA-D92N/H/Y-5'	CCTCTGCATTHATGACTGTTG	GLA-T282N-3'	GGC CAT CTG ATT TAC TTG CTG
GLA-D92N/H/Y-3'	CAACAGTCATDAATGCAGAGG	GLA-Q283P-5'	CAAGTAACT CCG ATGGCCCTC
GLA-D92N-5'	TACCTCTGCATT AAT GACTGTTGGATG	GLA-Q283P-3'	GAG GGC CAT CGG AGT TAC TTG
GLA-D92N-3'	CAT CCA ACA GTC ATT AAT GCA GAG GTA	GLA-M284T-5'	GTAACCTCAG ACG GCCCTCTG
GLA-D92H-5'	TACCTCTGCATT CAT GACTGTTGGATG	GLA-M284T-3'	CAG AGG GCC GTC TGA GTT AC
GLA-D92H-3'	CAT CCA ACA GTC ATG AAT GCA GAG GTA	GLA-A285P-5'	TAACTCAGATG C CCTCTGGGCT
GLA-D92Y-5	GAGTACCTCTGCATT tAT GACTGTTGGATGGCTC	GLA-A285P-3'	AGC CCA GAG GGG CAT CTG AGT TA
GLA-D92Y-3	GAG CCA TCC AAC AGT CAT AAA TGC AGA GGT ACT C	GLA-A285D-5'	AACTCAGATGG A CCTCTGGGCT
GLA-D93G-5'	CTGCATTGATGGCTGTTGGATG	GLA-A285D-3'	AGC CCA GAG GTC CAT CTG AGT T
GLA-D93G-3'	CATCCAACAGCCATCAATGCAG	GLA-W287G-5'	GATGGCCCTC GGG GCTATCAT
GLA-D93V-5'	CTGCATTGATGTCTGTTGGATG	GLA-W287G-3'	ATG ATA GCC CCG AGG GCC ATC
GLA-D93V-3'	CATCCAACAGACATCAATGCAG	GLA-W287C-5'	ATGGCCCTC TGT GCTATCATG
GLA-D93N-5'	CTGCATTGATAACTGTTGGATG	GLA-W287C-3'	CAT GAT AGC ACA GAG GGC CAT
GLA-D93N-3'	CATCCAACAGTTATCAATGCAG	GLA-A288D-5'	GCCCTCTGG GAT ATCATGGCTG
GLA-C94S-5'	GCATTGATGACTCTTGGATGGCTC	GLA-A288D-3'	CAG CCA TGA TAT CCC AGA GGG C
GLA-C94S-3'	GAGCCATCCAAGAGTCATCAATGC	GLA-A288P-5'	GCCCTCTGG CCT ATCATGG

Fig. 6 (Cont.)

GLA-C94Y-5'	GCATTGATGACTATTGGATGGCTC	GLA-A288P-3'	CCA TGA TAG GCC AGA GGG C
GLA-C94Y-3'	GAGCCATCCAATAGTCATCAATGC	GLA-I289F-5'	CTCTGGGCT TTC ATGGCTGCTCCTT
GLA-W95S-5'	GATGACTGTTCGATGGCTCCC	GLA-I289F-3'	AAG GAG CAG CCA TGA AAG CCC AGA G
GLA-W95S-3'	GGGAGCCATCGAACAGTCATC	GLA-M290I-5'	GGGCTATC ATC GCTGCTCCTT
GLA-A97P-5'	CTGTTGGATGCCTCCCCAAAGAG	GLA-M290I-3'	AAG GAG CAG CGA TGA TAG CCC
GLA-A97P-3'	CTCTTTGGGGAGGCATCCAACAG	GLA-A292P-5'	CTATCATGGCT CCT CCTTTATTC
GLA-R100K/T-5'	GCTCCCCAAAMAGATTCAGAAG	GLA-A292P-3'	GAA TAA AGG AGG AGC CAT GAT AG
GLA-R100K/T-3'	CTTCTGAATCTKTTTGGGGAGC	GLA-P293A-5'	CATGGCTGCT GCT TTATTCATG
GLA-R100T-5'	GGCT CCC CAA ACA GAT TCA GAA GG	GLA-P293A-3'	CAT GAA TAA AGC AGC AGC CAT G
GLA-R100T-3'	CCT TCT GAA TCT GTT TGG GGA GCC	GLA-P293S/T-5'	CATGGCTGCT WCT TTATTCATG
GLA-E103Q-5'	CAAAGAGATTCACAAGGCAGACTTC	GLA-P293S/T-3'	CAT GAA TAA AGW AGC AGC CAT G
GLA-E103Q-3'	GAAGTCTGCCTTGTGAATCTCTTTG	GLA-F295C-5'	GCTGCTCCTTTA TGC ATGTCTAATGACC
GLA-R112S-5'	GCAGACCCTCAGAGCTTTCCTCATG	GLA-F295C-3'	GGT CAT TAG ACA TGC ATA AAG GAG CAG C
GLA-R112S-3'	CATGAGGAAAGCTCTGAGGGTCTGC	GLA-S297C/F-5'	CTTTATTCATG TKT AATGACCTCCG
GLA-R112C-5'	CAGACCCTCAGTGCTTTCCTCATG	GLA-S297C/F-3'	CGG AGG TCA TTA MAC ATG AAT AAA G
GLA-R112C-3'	CATGAGGAAAGCACTGAGGGTCTG	GLA-N298S-5'	ATTCATGTCT AGT GACCTCCGAC
GLA-F113S-5'	CCCTCAGCGCTCTCCTCATG	GLA-N298S-3'	GTC GGA GGT CAC TAG ACA TGA AT
GLA-F113S-3'	CATGAGGAGAGCGCTGAGGG	GLA-N298K-5'	TATTCATGTCTAAGGACCTCC GAC
GLA-R118C-5'	CTCATGGGATTTGCCAGCTAGC	GLA-N298K-3'	GTCGGAGGTCCTTAGACATGA ATA
GLA-R118C-3'	GCTAGCTGGCAAATCCCATGAG	GLA-N298H-5'	TATTCATGTCT cAT GACCTCCGAC
GLA-L120P-5'	GATTCGCCAGCCAGCTAATTATG	GLA-N298H-3'	GTC GGA GGT CAT GAG ACA TGA ATA
GLA-L120P-3'	CATAATTAGCTGGCTGGCGAATC	GLA-D299G-5'	TCATGTCTAAT GGC CTCCGACACATC
GLA-A121P/T-5'	TC GCC AGC TAM CTA ATT ATG TTC ACA GC	GLA-D299G-3'	GAT GTG TCG GAG GCC ATT AGA CAT GA
GLA-A121P/T-3'	GCT GTG AAC ATA ATT AGK TAG CTG GCG A	GLA-L300P-5'	GTCTAATGACCCCGACACAT CAG
GLA-V124D-5'	GCTAGCTAATTAT GaT CACAGCAAAGGAC	GLA-L300P-3'	CTGATGTGTCGGGGGTCATTA GAC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-V124D-3'	GTC CTT TGC TGT GAT CAT AAT TAG CTA GC	GLA-L300F-5'	GTCTAATGACTTCCGACACAT C
GLA-G128E-5'	CACAGCAAAGaACTGAAGCTAG	GLA-L300F-3'	GATGTGTCGGAAGTCATTAGA C
GLA-G128E-3'	CTA GCT TCA GTT CTT TGC TGT G	GLA-L300H-5'	GTCTAATGACCACCGACACAT C
GLA-L129P-5'	CAG CAA AGG ACC GAA GCT AGG	GLA-L300H-3'	GATGTGTCGGTGGTCATTAGA C
GLA-L129P-3'	ATC CCT AGC TTC GGT CCT TTG CTG	GLA-R301G-5'	CTAATGACCTCGGACACATCA GC
GLA-L131P-5'	AGGACTGAAGC C AGGGATTTATGC	GLA-R301G-3'	GCTGATGTGTCCGAGGTCATT AG
GLA-L131P-3'	GCA TAA ATC CCT GGC TTC AGT CCT	GLA-R301P-5'	CTAATGACCTCCCACACATCA GC
GLA-G132E-5'	GGA CTGAAGCTA GaG ATTTATGCAGATG	GLA-R301P-3'	GCTGATGTGTGGGAGGTCATT AG
GLA-G132E-3'	CAT CTG CAT AAA TCT CTA GCT TCA GTC C	GLA-I303N-5'	CTCCGACACAACAGCCCTCAA GC
GLA-G132R-5'	GAC TGA AGC TAA GGA TTT ATG CAG ATG	GLA-I303N-3'	GCTTGAGGGCTGTTGTGTCCG AG
GLA-G132R-3'	CAT CTG CAT AAA TCC TTA GCT TCA GTC	GLA-L310F-5'	GCCAAAGCTTTCCTTCAGGA
GLA-Y134S-5'	GCT AGG GAT TTC TGC AGA TGT TGG	GLA-L310F-3'	TCCTGAAGGAAAGCTTTGGC
GLA-Y134S-3'	CCA ACA TCT GCA GAA ATC CCT AGC	GLA-Q312H-5'	GCTCTCCTTCACGATAAAGGAC G
GLA-A135V-5'	GCT AGG GAT TTA TGT AGA TGT TGG A	GLA-Q312H-3'	CGTCCTTATCGTGAAGGAGAG C
GLA-A135V-3'	TCC AAC ATC TAC ATA AAT CCC TAG C	GLA-D313Y-5'	CTCTCCTTCAGTATAAAGGACG
GLA-D136H-5'	GGA TTT ATG CAC ATG TTG GAA	GLA-D313Y-3'	CGTCCTTATACTGAAGGAGAG
GLA-D136H-3'	TTC CAA CAT GTG CAT AAA TCC	GLA-V316E-5'	GATAAGGACGAAATTGCCATC
GLA-D136H-5	GGGATTTATGCA cAT GTTGAAATAA AACC	GLA-V316E-3'	GATGGCAATTTTCGTCCTTATC
GLA-D136H-3	GGT TTT ATT TCC AAC ATG TGC ATA AAT CCC	GLA-I317N/T-5'	AAGGACGTAAMTGCCATCAAT C
GLA-G138E-5'	TGC AGA TGT TGA AAA TAA AAC CTG	GLA-I317N/T-3'	GATTGATGGCAKTTACGTCCT T
GLA-G138E-3'	CAG GTT TTA TTT TCA ACA TCT GCA	GLA-N320I-5'	AATTGCCATCATTACAGGACCC C
GLA-G138R-5'	TGC AGA TGT TAG AAA TAA AAC CTG	GLA-N320I-3'	GGGGTCCTGAATGATGGCAAT T
GLA-G138R-3'	CAG GTT TTA TTT CTA ACA TCT GCA	GLA-N320K-5'	AATTGCCATCAAGCAGGACCC C
GLA-G138E-5	GGATTTATGCAGATGTT GaA AATAAACCTGCGCAGC	GLA-N320K-3'	GGGGTCCTGCTTGATGGCAAT T
GLA-G138E-3	GCT GCG CAG GTT TTA TTT TCA ACA TCT GCA TAA ATC C	GLA-N320Y-5'	AATTGCCATCTATCAGGACCC C

Fig. 6 (Cont.)

GLA-G138R-5'	GGATTTATGCAGATGTT AATAAAACCTGCGCAGC	cGA	GLA-N320Y-3'	GGGGTCCTGATAGATGGCAATT
GLA-G138R-3'	GGA TTT ATG CAG ATG TTC GAA ATA AAA CCT GCG CAG C		GLA-Q321E-5'	TGCCATCAATGAGGACCCCTTG
GLA-T141I-5'	GGA AAT AAA ATC TGC GCA GGC T		GLA-Q321E-3'	CAAGGGGTCCTCATTGATGGCA
GLA-T141I-3'	AGC CTG CGC AGA TTT TAT TTC C		GLA-Q321R-5'	TGCCATCAATCGGGACCCCTTG
GLA-C142R-5'	GGA AAT AAA ACC CGC GCA GGC TTC		GLA-Q321R-3'	CAAGGGGTCCCGATTGATGGCA
GLA-C142R-3'	GAA GCC TGC GCG GGT TTT ATT TCC		GLA-G325D-5'	GGACCCCTTGGACAAGCAAG
GLA-C142Y/W-5'	GA AAT AAA ACC TRC GCA GGC TTCC		GLA-G325D-3'	CTTGCTTGTCCAAGGGGTCC
GLA-C142Y/W-3'	GGA AGC CTG CGY AGG TTT TAT TTC		GLA-Q327K/E-5'	CTTGGGCAAGRAAGGGTACCAG
GLA-C142W-5'	GGAAATAAAACCTGGGCAGGCTTCCCTG		GLA-Q327K/E-3'	CTGGTACCCTTYCTTGCCCAAG
GLA-C142W-3'	CAG GGA AGC CTG CCC AGG TTT TAT TTC C		GLA-G328R-5'	GGCAAGCAAAGGTACCAGC
GLA-A143T-5'	GAAATAAAACCTGCACAGGCTTCCC		GLA-G328R-3'	GCTGGTACCTTTGCTTGCC
GLA-A143T-3'	GGGAAGCCTGTGCAGGTTTTATTTC		GLA-G328A/V-5'	GGCAAGCAAGYGTACCAGC
GLA-A143P-5'	ATAAAACCTGC cCA GGCTTCCC		GLA-G328A/V-3'	GCTGGTACRCTTGCTTGCC
GLA-A143P-3'	GGG AAG CCT GgG CAG GTT TTA T		GLA-G328E-5'	TGGGCAAGCAA GAG TACCAGCTTAG
GLA-G144V-5'	CCT GCG CAG TCT TCC CTG G		GLA-G328E-3'	CTA AGC TGG TAC TCT TGC TTG CCC A
GLA-G144V-3'	CCA GGG AAG ACT GCG CAG G		GLA-E338K-5'	GAGACAACCTTAAAGTGTGGG
GLA-G147R-5'	GGC TTC CCT AGG AGT TTT Gg		GLA-E338K-3'	CCCACACTTTAAAGTTGTCTC
GLA-G147R-3'	cCAA AAC TCC TAG GGA AGC C		GLA-W340R-5'	CTTTGAAGTGCGGGAACGAC
GLA-S148N-5'	TTC CCT GGG AAT TTT GGA TAC		GLA-W340R-3'	GTCGTTCCCGCACTTCAAAG
GLA-S148N-3'	GTA TCC AAA ATT CCC AGG GAA		GLA-E341D-5'	GAAGTGTGGGACCGACCTCTCT C
GLA-S148R-5'	C CCT GGG AGG TTT GGA TACT		GLA-E341D-3'	GAGAGAGGTTCGGTCCCACACTT C
GLA-S148R-3'	AGT ATC CAA ACC TCC CAG GG		GLA-E341K-5'	GAAGTGTGGAAACGACCTCTCT C
GLA-Y152C-5'	GTTTTGGATACTGCGACATTGATG		GLA-E341K-3'	GAGAGAGGTTCGTTTCCACACTTC
GLA-Y152C-3'	CATCAATGTCGCGAGTATCCAAAAC		GLA-R342Q-5'	GTGTGGGAACAACCTCTCTCAG

Fig. 6 (Cont.)

GLA-D155H-5'	CTACGACATT C ATGCCAGAC	GLA-R342Q-3'	CTGAGAGAGGTTGTTCCACAC
GLA-D155H-3'	GTC TGG GCA TGA ATG TCG TAG	GLA-L344P-5'	GAACGACCTCCCTCAGGCTTAG
GLA-A156T-5'	GACATTGAT ACC CAGACCTTg	GLA-L344P-3'	CTAAGCCTGAGGGAGGTCGTTC
GLA-A156T-3'	CAA AGG TCT GGG TAT CAA TGT C	GLA-S345P-5'	CGACCTCTCCAGGCTTAGCC
GLA-W162R-5'	CTTTGCTGACCGGGGAGTAGATC	GLA-S345P-3'	GGCTAAGCCTGGGAGAGGTCG
GLA-W162R-3'	GATCTACTCCCCGGTCAGCAAAG	GLA-A348P-5'	CTCAGGCTTACCCTGGGCTGTAG
GLA-W162C-5'	CTTTGCTGACTGCGGAGTAGATC	GLA-A348P-3'	CTACAGCCCAGGGTAAGCCTGA G
GLA-W162C-3'	GATCTACTCCGCAGTCAGCAAAG	GLA-A350P-5'	CTTAGCCTGGCCTGTAGCTATG
GLA-G163V-5'	GCTGACTGGGTAGTAGATCTG	GLA-A350P-3'	CATAGCTACAGGCCAGGCTAAG
GLA-G163V-3'	CAGATCTACTACCCAGTCAGC	GLA-A352D-5'	CTGGGCTGTAGATATGATAAAC
GLA-D165V-5'	CTGGGGAGTAGTTCTGCTAAAATTTG	GLA-A352D-3'	GTTTATCATATCTACAGCCCAG
GLA-D165V-3'	CAAATTTTAGCAGAACTACTCCCCAG	GLA-I354K-5'	GTAGCTATGAAAAACCGGCAGG
GLA-L167P-5'	GAGTAGATCTGC C AAAATTTGATGG	GLA-I354K-3'	CCTGCCGGTTTTTCATAGCTAC
GLA-L167P-3'	CCA TCA AAT TTT GGC AGA TCT ACT C	GLA-N355K-5'	GCTATGATAAAACGGCAGGAG
GLA-K168R-5'	GTAGATCTGCTA AGA TTTGATGGTTTG	GLA-N355K-3'	CTCCTGCCGTTTTTATCATAGC
GLA-K168R-3'	CAA ACC ATC AAA TCT TAG CAG ATC TAC	GLA-R356W-5'	GCTATGATAAACTGGCAGGAGAT TT
GLA-F169S-5'	gtaGATCTGCTAAAA TCT GATGGTTGTTACtg	GLA-R356W-3'	AATCTCCTGCCAGTTTATCATAG C
GLA-F169S-3'	CAG TAA CAA CCA TCA GAT TTT AGC AGA TCT AC	GLA-E358G/A-5'	ACCGGCAGGSGATTGGTGGAC
GLA-D170V-5'	GCTAAAATTTG T TGGTTGTTACTG	GLA-E358G/A-3'	GTCCACCAATCSCCTGCCGGT
GLA-D170V-3'	CAG TAA CAA CCA ACA AAT TTT AGC	GLA-E358K-5'	GATAAACCGGCAGAAGATTGGT GG
GLA-D170H-5'	GCTAAAATTTTC AT GGTTGTTACTG	GLA-E358K-3'	CCACCAATCTTCTGCCGGTTTTAT C
GLA-D170H-3'	CAG TAA CAA CCA TGA AAT TTT AGC	GLA-E358A-5'	GATAAACCGGCAG GcG ATTGGTGGACCTC
GLA-G171D-5'	CTAAAATTTGAT GAT TGTTACTGTGAC	GLA-E358A-3'	GAG GTC CAC CAA TCG CCT GCC GGT TTA TC
GLA-G171D-3'	GTC ACA GTA ACA ATC ATC AAA TTT TAG	GLA-I359T-5'	CCGGCAGGAGACTGGTGGACCT C
GLA-G171R-5'	CTAAAATTTGAT CGT TGTTACTGTGAC	GLA-I359T-3'	GAGGTCCACCAGTCTCCTGCCG G

Fig. 6 (Cont.)

GLA-G171R-3'	GTC ACA GTA ACA ACG ATC AAA TTT TAG	GLA-G360S-5'	CAGGAGATTAGTGGACCTCGC
GLA-C172Y/F-5'	CTAAAATTTGATGGT TWT tactgtgacagT	GLA-G360S-3'	GCGAGGTCCACTAATCTCCTG
GLA-C172Y/F-3'	ACT GTC ACA GTA AWA ACC ATC AAA TTT TAG	GLA-G361R-5'	GGAGATTGGTAGACCTCGCTC
GLA-C172W-5'	CTAAAATTTGATGGT TGG tactgtgacagT	GLA-G361R-3'	GAGCGAGGTCTACCAATCTCC
GLA-C172W-3'	ACT GTC ACA GTA CCA ACC ATC AAA TTT TAG	GLA-P362L-5'	GATTGGTGGACTTCGCTCTTATAC
GLA-C172R-5'	CTAAAATTTGATGGT CGT tactgtgacagT	GLA-P362L-3'	GTATAAGAGCGAAGTCCACCAATC
GLA-C172R-3'	ACT GTC ACA GTA ACG ACC ATC AAA TTT TAG	GLA-R363H-5'	GGTGGACCTCACTCTTATAC
GLA-C172G-5'	CTAAAATTTGATGGT GGT tactgtgacagT	GLA-R363H-3'	GTATAAGAGTGAGGTCCACC
GLA-C172G-3'	ACT GTC ACA GTA ACC ACC ATC AAA TTT TAG	GLA-R363C-5'	GGTGGACCTTGCTCTTATAC
GLA-G183D-5'	TTGGCAGATG A TTATAAGCAC	GLA-R363C-3'	GTATAAGAGCAAGGTCCACC
GLA-G183D-3'	GTG CTT ATA ATC ATC TGC CAA	GLA-G373R-5'	TGCTTCCCTG CGT AAAGGAGTGG
GLA-G183S-5'	TTGGCAGAT A GTTATAAGCAC	GLA-G373R-3'	CCA CTC CTT TAC GCA GGG AAG CA
GLA-G183S-3'	GTG CTT ATA ACT ATC TGC CAA	GLA-A377D-5'	GTAAAGGAGTGGACTGTAATCC TG
GLA-M187T-5'	GTTATAAGCAC A C GTCCTTGCCCT	GLA-A377D-3'	CAGGATTACAGTCCACTCCTTATAC
GLA-M187T-3'	AGG GCC AAG GAC GTG TGC TTA TAA C	GLA-C378Y-5'	AAAGGAGTGGCCTATAATCCTGCC
GLA-M187V-5'	GTTATAAGCAC G TGTCCTTGCC	GLA-C378Y-3'	GGCAGGATTATAGGCCACTCCTTT
GLA-M187V-3'	GGC CAA GGA CAC GTG CTT ATA AC	GLA-C378R-5'	AAAGGAGTGGCCCCGTAATCCTGCC
GLA-L191Q-5'	GTCCTTGCCCCAGAATAGGACTG	GLA-C378R-3'	GGCAGGATTACGGGCCACTCCTTT
GLA-L191Q-3'	CAG TCC TAT TCT GGG CCA AGG AC	GLA-C382Y-5'	GTAATCCTGCCTACTTTCATCACAC
GLA-L191P-5'	GTCCTTGCCCC C GAATAGGACTG	GLA-C382Y-3'	GTGTGATGAAGTAGGCAGGATTAC
GLA-L191P-3'	CAG TCC TAT TCG GGG CCA AGG AC	GLA-I384N-5	CTGCCTGCTTC AaC ACACAGCTCCTC
GLA-T194I-5'	CTGAATAGGATTGGCAGAAGC	GLA-I384N-3	GAG GAG CTG TGT GTT GAA GCA GGC AG
GLA-T194I-3'	GCT TCT GCC AAT CCT ATT CAG	GLA-T385P-5'	CCTGCTTCATCCCACAGCTCCTC
GLA-V199M-5'	CAGAAGCATTATGTACTCCTG	GLA-T385P-3'	GGAGGAGCTGTGGGATGAAGCAGG
GLA-V199M-3'	CAG GAG TAC ATA ATG CTT CTG	GLA-Q386P-5'	CTTCATCACAC CCG CTCCTCCCTGT

Fig. 6 (Cont.)

GLA-S201F-5'	CATTGTGTACTTCTGTGAGTGG	GLA-Q386P-3'	ACA GGG AGG AGC GGT GTG ATG AAG
GLA-S201F-3'	CCACTCACAGAAGTACACAATG	GLA-P389R-5'	CACAGCTCCTC CGT GTGAAAAGGAAGCT
GLA-S201Y-5'	CATTGTGTACTACTGTGAGTGGC	GLA-P389R-3'	AGC TTC CTT TTC ACA CGG AGG AGC TGT G
GLA-S201Y-3'	GCC ACT CAC AGT AGT ACA CAA TG	GLA-F396Y-5'	GGAAGCTAGGGTACTATGAAT GG
GLA-C202Y-5'	GTG TAC TCC TAT GAG TGG CCT C	GLA-F396Y-3'	CCATTCATAGTACCCTAGCTTC C
GLA-C202Y-3'	GAG GCC ACT CAT AGG AGT ACA C	GLA-E398K-5'	AGGGTTCTATAAATGGACTTC A
GLA-C202W-5'	GTGTACTCCTGG GAGTGGCCTCT	GLA-E398K-3'	TGAAGTCCATTTATAGAACCC T
GLA-C202W-3'	AGA GGC CAC TCC CAG GAG TAC AC	GLA-L403S-5'	GACTTCAAGGTCAAGAAGTCA C
GLA-P205T-5'	CTGTGAGTGGACTCTTTATATG	GLA-L403S-3'	GTGACTTCTTGACCTTGAAGTC
GLA-P205T-3'	CATATAAAGAGTCCACTCACAG	GLA-I407K-5'	GAAGTCACAAAAATCCCACAG
GLA-P205R/L-5'	CTGTGAGTGG CKT CTTTATATG	GLA-I407K-3'	CTGTGGGATTTTTGTGACTTC
GLA-P205R/L-3'	CAT ATA AAG AMG CCA CTC ACAG	GLA-P409T/A/S-5'	GTCACATAAATDCCACAGGCA CTG
GLA-Y207S-5'	TGGCCTCTT TCT ATGTGGCCC	GLA-P409T/A/S-3'	CAGTGCCTGTGGHATTTATGT GAC
GLA-Y207S-3'	GGG CCA CAT AGA AAG AGG CCA	GLA-T410K-5'	CACATAAATCCCAAAGGCACT G
GLA-Y207C-5'	AGTGGCCTCTT TgT ATGTGGCCCTT	GLA-T410K-3'	CAGTGCCTTTGGGATTTATGTG
GLA-Y207C-3'	AAG GGC CAC ATA CAA AGA GGC CAC T	GLA-T410A-5'	CACATAAATCCCGCAGGCACT G
GLA-Y216D-5	CCTTTCAAAAGCCCAAT gAT ACAGAAATCCGACAG	GLA-T410A-3'	CAGTGCCTGCGGGATTTATGT G
GLA-Y216D-3	CTG TCG GAT TTC TGT ATC ATT GGG CTT TTG AAA GG	GLA-G411D-5'	ATCCACAGACACTGTTTTGC
GLA-I219N-5'	CAATTATACAGAA AAC CGACAGTACTGC	GLA-G411D-3'	GCAAAACAGTGTCTGTGGGAT
GLA-I219N-3'	GCA GTA CTG TCG GTT TTC TGT ATA ATT G	GLA-L414S-5'	GGCACTGTTTCGCTTCAGCTA G
GLA-C223R/G-5'	CGACAGTAC SGC AATCACTGG	GLA-L414S-3'	CTAGCTGAAGCGAAACAGTGC C
GLA-C223R/G-3'	CCA GTG ATT GCS GTA CTG TCG	GLA-del20-24aa-5'	GCGCTTCGCTTCTGGACATCC CTGGGGC
GLA-C223Y-5'	CGACAGTACTAC AATCACTGG	GLA-del20-24aa-3'	GCCCCAGGGATGTCCAGGAAG CGAAGCGC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-C223Y-3'	CCA GTG ATT GTA GTA CTG TCG	GLA-del113-8aa-5'	GCAGACCCTCAGCGCCAGCTAGCTAATTATG
GLA-N224S-5'	CAGTACTGCAGTCACTGGCGA	GLA-del113-8aa-3'	CATAATTAGCTAGCTGGCGCTGAGGGTCTGC
GLA-N224S-3'	TCG CCA GTG ACT GCA GTA CTG	GLA-del153aa-5'	GTTTTGGATACTACATTGATGCC CAG
GLA-N224D-5'	CAGTACTGCGATCACTGGC	GLA-del153aa-3'	CTGGGCATCAATGTAGTATCCA AAAC
GLA-N224D-3'	GCC AGT GAT CGC AGT ACT G	GLA-del205-7aa-5'	CTCCTGTGAGTGGATGTGGCCCT T
GLA-H225R-5'	tactgcaat cgc tggcgaat	GLA-del205-7aa-3'	AAGGGCCACATCCACTCACAGG AG
GLA-H225R-3'	ATT TCG CCA GCG ATT GCA GTA	GLA-del254aa-5'	CAGGAGAGAATTGATGTTGCTG G
GLA-W226R-5'	gcaatcac cgg cgaat	GLA-del254aa-3'	CCAGCAACATCAATTCTCTCCTG
GLA-W226R-3'	ATT TCG CCG GTG ATT GC	GLA-del358aa-5'	GATAAACCGGCAGATTGGTGGA CCT
GLA-W226C-5'	gcaatcactgtcgaaatttgc	GLA-del358aa-3'	AGGTCCACCAATCTGCCGTTTA TC
GLA-W226C-3'	GCA AAA TTT CGA CAG TGA TTG C	GLA-Ins247-8aa-5'	GACTGGACATCTTGGACATCTTT TAACCAGGAGAG
GLA-R227Q-5'	GCAATCACTGGCAAAAATTTTGCTGAC	GLA-Ins247-8aa-3'	CTCTCCTGGTTAAAAGATGTCCA AGATGTCCAGTC

S=G+C; W=A+T; H=A+C+T; D=T+G+A; M=A+C; K=T+G; R=A+G; Y=T+C;

Fig. 7

GAATTCTCCGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACATCTGGGCTGCGCG  
CTTGCGCTTCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATCCCTGGGGCTAGAGCACTGGACAAT  
GGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGA  
CTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTC  
ATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGAT  
GGCTCCCCAAAGAGATTGAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGG  
ATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGT  
TGAAATAAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGA  
CCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAA  
AATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGT  
GTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCC  
GACAGTACTGCAATCACTGGCGAAAATTTGCTGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATAAAG  
AGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGG  
TTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAA  
CTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACA  
TCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCC  
TTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTC  
TCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCT  
TATACCATCGCAGTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCAC  
ACAGCTCCTCCCTGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTAAAGAAGTC  
ACATAAATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTA  
GACTTACTTTAA

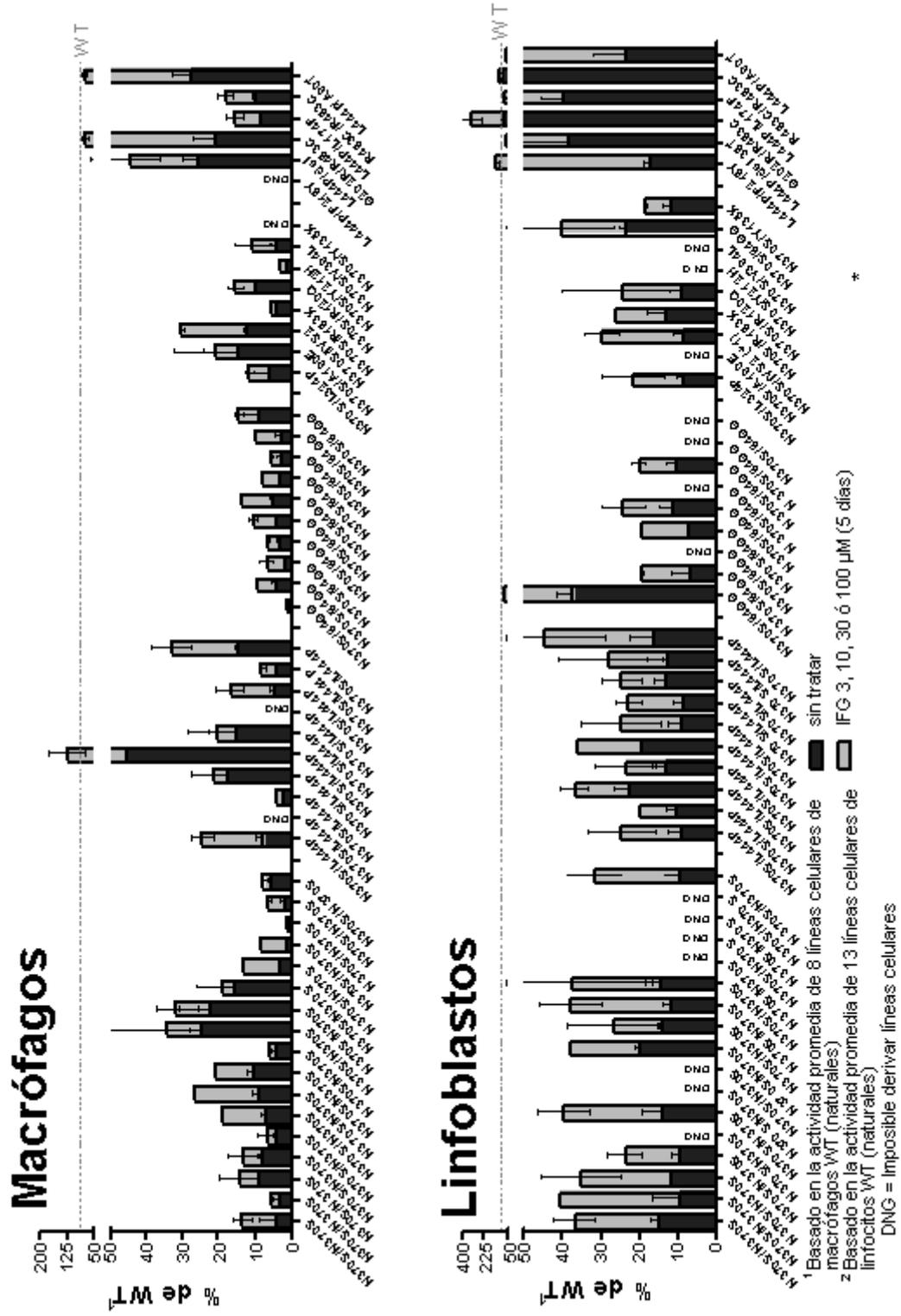


Fig. 8

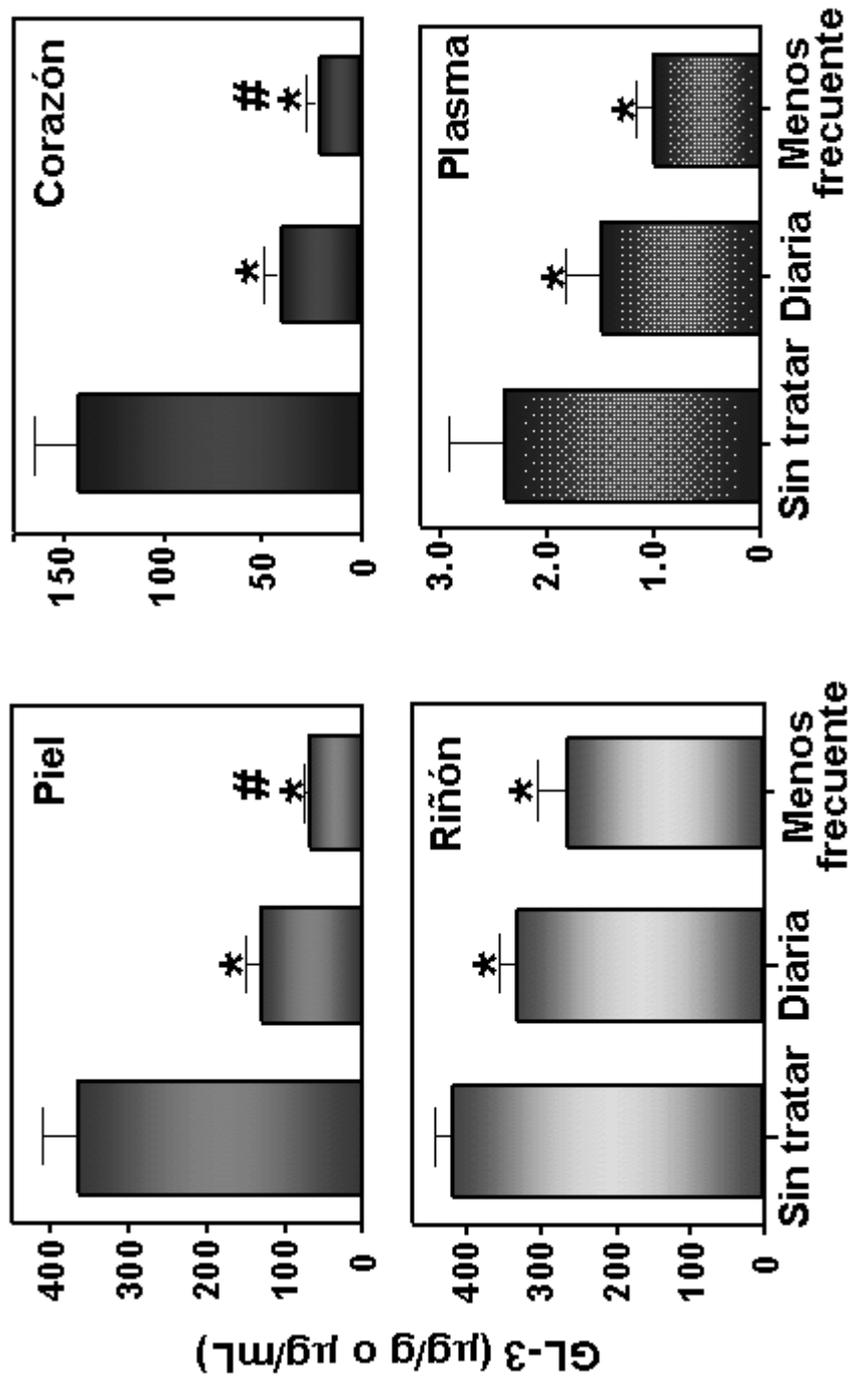


Fig. 9

Fig. 10

## **GAA en sentido erróneo sensible**

mutación de GAA	n	% de actividad de GAA natural	
		Sin D.N.J	Con DNJ 100 $\mu$ M
E262K	3	0.5 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.6
P266S	3	14.2 $\pm$ 0.3	22.4 $\pm$ 1.0
P285R	3	2.2 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.8
P285S	3	7.0 $\pm$ 0.9	11.8 $\pm$ 0.9
L291F	2	3.4 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.2
L291H	3	4.3 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 0.8
L291P	3	3.0 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 1.5
M318K	3	3.2 $\pm$ 0.9	11.2 $\pm$ 2.6
G377R	6	0.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
A445P	6	1.0 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3
Y455C	1	3.1	8.6
Y455F	3	4.6 $\pm$ 0.5	11.0 $\pm$ 2.2
P457L	4	6.4 $\pm$ 0.8	13.5 $\pm$ 1.7
G483R	2	1.7 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 0.9
G483V	2	0.8 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 1.9
M519V	4	3.1 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.1
S529V	4	6.4 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.4
P545L	20	3.0 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 0.9
G549R	3	7.5 $\pm$ 1.1	13.5 $\pm$ 1.9
L552P	3	2.5 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 1.2
Y575S	7	0.4 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.4
E579K	7	3.8 $\pm$ 0.3	13.4 $\pm$ 1.1
A610V	3	0.5 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.3
H612Q	3	0.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4
A644P	2	0.8 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.3
$\Delta$ N470	4	1.4 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.4

ES 2 541 933 T3

Fig. 11

Secuencia de ácidos nucleicos de la alfa-glucosidasa lisosomal humana (GAA) (N.º de acceso a GenBank: Y00839).

```

cagttgggaa agctgagggt gtcgccgggg cgcggggtgg aggtcgggga tgaggcagca 60
ggtaggacag tgacctcggg gacgcgaagg acccgggcca cctctagggt ctctcgtcc 120
gcccgttgtt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgagc tgacggggaa actgaggcac 180
ggagcgggcc ttaggagct gtccaggcca tctccaacca tgggagtgag gcacccgcc 240
tgctcccacc ggctctggc cgtctgcgc ctcgtgtcct tggcaaccgc tgcactctg 300
gggcacatcc tactccatga ttctctgtg gttccccgag agctgagtgg ctctcccca 360
gtctggagg agactcacc agctcaccag cagggagcca gcagaccagg gccccgggat 420
gcccaggcac acccggccg tccagagca gtgccacac agtgcgacgt ccccccaac 480
agccgttcg attgcgcc tgacaaggcc ataccagg aacagtgcga gggcgggc 540
tgctgctaca tccctgcaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtc 600
ttctccac ccagtacc cagctacaag ctggagaacc tgagtctc tgaatgggc 660
tacaggcca cctgaccg taccacccc acctcttcc ccaaggacat cctgacctg 720
cggctggacg tgatgatga gactgagaac cgctccact tcacgatca agatccagct 780
aacaggcgt acgaggtgcc ctggagacc cgcgtgtcc acagcgggc acctccca 840
ctctacagc tgagtttc cgaggagccc ttcggggtga tctgcaccg gcagctggac 900
ggccgctgc tgctgaacac gacgggtggc ccctgttct ttgggacca gttcctcag 960
ctgtccact cgtgcctc cgagtatac acaggctcg ccgagcact cagtccctg 1020
atgctcagca ccagctggac caggatcac ctgtggaacc gggaccttc gccacgccc 1080
ggtgcgaacc tctacgggtc tcaccttc tactggtgc tggaggacgg cgggtcggca 1140
cacgggtgt tctgctaaa cagcaatgc atggatgtg tctgcagcc gagccctgcc 1200
cttagctgga ggtcgacagg tgggactct gatgtctaca tctctggg cccagagccc 1260
aagagcgtg tgacagcagta cctggacgt gtgggatacc cgttcagcc gccatactg 1320
ggcctgggt tccactgtg ccgtggggc tactctcca ccgtatcac ccgccagtg 1380
gtggagaaca tgaccagggc cacttccc ctggacgtc aatggaacga cctggactac 1440
atggactccc ggagggact cacttcaac aaggatggct tccgggact cccggccatg 1500
gtgcaggagc tgaccaggg cggccggcgc tacatgatga tctggatcc tgccatcagc 1560
agctcgggcc ctgccgggag ctacagccc tacgacgagg gtctcgggag gggggtttc 1620
atccaacg agaccggcca gccgtgatt ggggaaggtat gggcgggtc cactgcctc 1680
cccacttca ccaacccac agcctggcc tgggggagg acatggtggc tgagttcat 1740
gaccagtg ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttcaa ctcatcaga 1800
ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctact gcctggggtg 1860
gtgggggga cctccaggc ggcaccatc tgtgctcca gccaccagt tctctcaca 1920
cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tgcctcca caggcgctg 1980
gtgaaggctc gggggacacg ccatttgc atctccgct cgaccttgc tggccacggc 2040
cgatagccc gccactggac gggggacgtg tggagctct gggagcagct cgctctcc 2100
gtgccagaaa tctgcagtt taacctgct ggggtgcctc tggcggggc cgactctgc 2160
ggcttctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcct ggaccagct gggggcctc 2220
taccttca tgcggaacca caacagcctg ctactctgc cccaggagcc gtacagctc 2280
agcgagccg cccagcagc catgaggaag gcctcacc tgcctacgc actctccc 2340
cactctaca cactgttcca ccaggccc gtcgctggg agaccgtgc ccggccctc 2400
ttctggagt tcccaagga ctctagcacc tggactgtg accaccagct cctgtgggg 2460

```

ES 2 541 933 T3

gaggccctgc tcatcacc	2520
cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca	2580
ccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggagctg ggtgacgctg	2640
ccggccccc tggacacat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat cccctgcag	2700
ggcctggcc tcacaaccac agagtccgc cagcagccca tggcctggc tgtggcctg	2760
accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg	2820
ctggagcgag gggcctacac acaggtcacc ttctggcca ggaataacac gatcgtgaat	2880
gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggccctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg	2940
ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tcctgtctc caactcacc	3000
tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt	3060
ctcgtcagct ggtgttagcc gggcggagtg tgttagtctc tccagaggga ggctggttcc	3120
ccagggaaagc agagcctgtg tgcgggcagc agctgtgtgc gggcctgggg gttgcatgtg	3180
tcacctggag ctgggcaacta accattccaa gccgccgat cgcttgttcc cactcctgg	3240
gccggggctc tggccccaa cgtgtctagg agagcttct cctagatcg cactgtgggc	3300
cggggcctgg agggctgctc tgtgttaata agattgtaag gtttgcctc ctcacctgtt	3360
gccggcatgc gggtagtatt agccacccc ctccatctgt tcccagcacc ggagaagggg	3420
gtgctcaggt ggaggtgtgg ggtatgcacc tgagctcctg cttegegcct gctgctctgc	3480
cccaacgcga ccgctccccg gctgcccaga gggctggatg cctgccggtc cccgagcaag	3540
cctgggaact caggaaaatt cacaggactt gggagattct aatcttaag tgcaattatt	3600
ttaataaaaag gggcatttgg aatc	3624

Fig. 12.

### Actividad de la $\alpha$ -Glucosidasa ácida

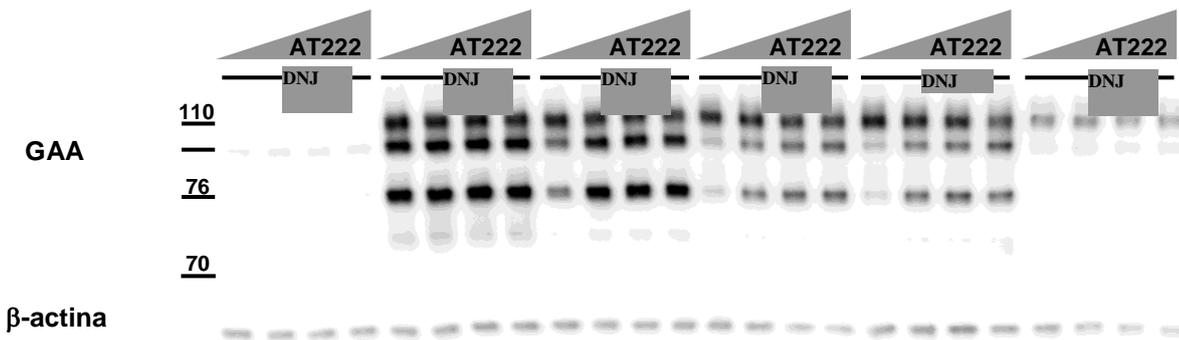
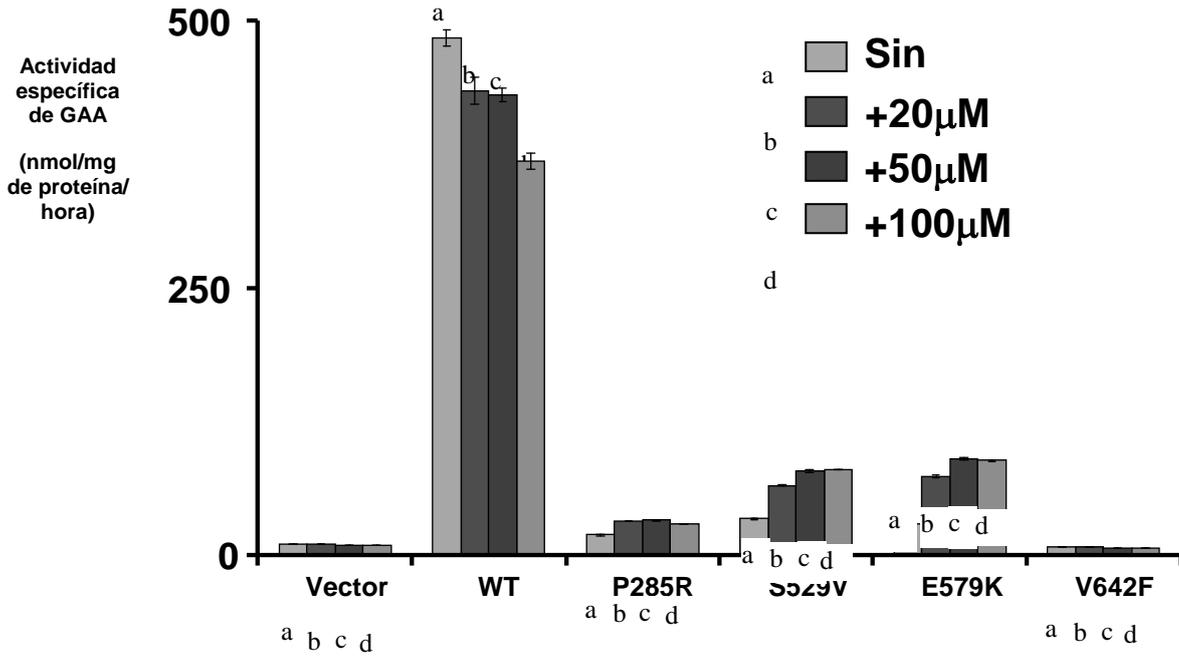


Fig. 13

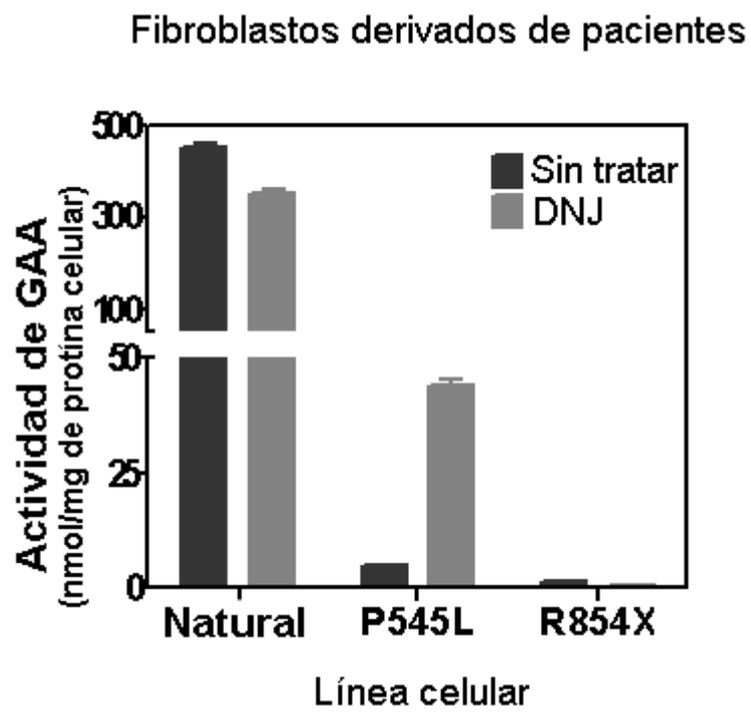


Fig. 14

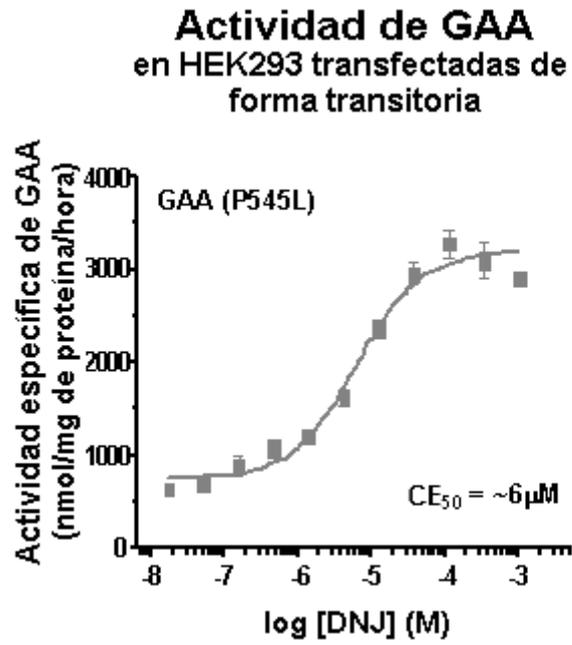
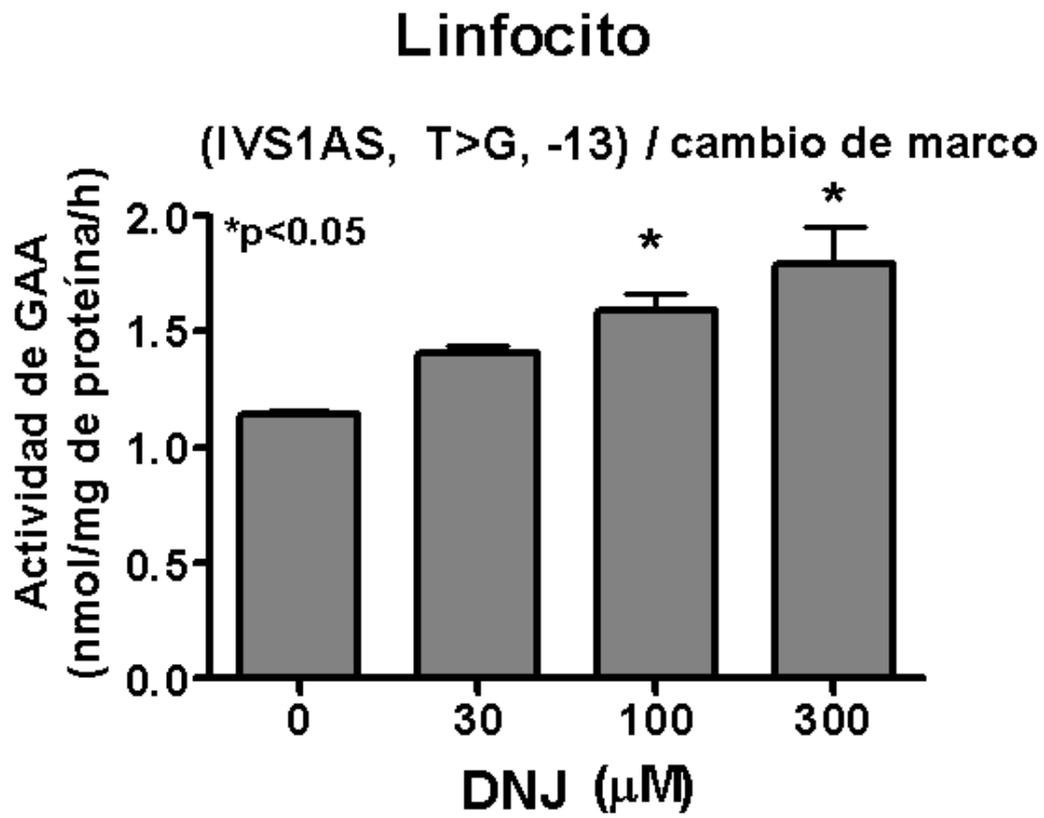


Fig. 15



**Fig. 16**

Secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la alfa-glucosidasa lisosomal humana

(GAA) (N.º de acceso a GenBank: Y00839).

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
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			

ES 2 541 933 T3

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  
 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  
 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

# ES 2 541 933 T3

			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	
			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											