

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 726**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06833313 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 1961816**

54 Título: **Nueva enzima altamente funcional que tiene especificidad de sustrato modificada**

30 Prioridad:

18.11.2005 JP 2005333660

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

08.10.2015

73 Titular/es:

**TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF
MEDICAL SCIENCE (50.0%)
1-6, Kamikitazawa 2-chome, Setagaya-ku
Tokyo, JP y
ALTIF LABORATORIES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AIKAWA, SEIICHI;
AIKAWA, FUMIKO;
SAKURABA, HITOSHI;
TAJIMA, YOUICHI y
ITO, MAI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 726 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

Nueva enzima altamente funcional que tiene especificidad de sustrato modificada

Campo técnico

La presente invención se refiere a una proteína recombinante que tiene actividad de α -galactosidasa.

5 Técnica antecedente

Para la deficiencia enzimática hereditaria, para la que no se conocen tratamientos radicales hasta la fecha, se ha estado desarrollando terapia de sustitución enzimática en la que se produce una enzima por ingeniería genética y a continuación se administra en un vaso sanguíneo por goteo intravenoso o similar. Como un ejemplo de deficiencia enzimática hereditaria cuya prevalencia es relativamente elevada y que se indica como una enfermedad especificada (enfermedad intratable), se conoce bien la enfermedad de Fabry (deficiencia de α -galactosidasa hereditaria, que es una de un grupo de enfermedades genéticas y también se denomina enfermedad lisosomal) (véase Kenneth J. Dean y col., Fabry Disease, "Practical Enzymology of the Sphingolipidoses", EE.UU., Aln R. Liss, Inc., 1997, páginas 173-216).

15 La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico de glicolípidos que se desarrolla como sigue a continuación: Como resultado de una disminución de la actividad de una enzima llamada " α -galactosidasa", que es una de las enzimas presentes en un lisosoma, que es uno de los orgánulos intracelulares humanos, y de la deficiencia de la enzima, el glicolípidos denominado globotriaosilceramida (también denominado trihexósido de ceramida), que es un sustrato *in vivo* de la enzima, no se descompone ni se acumula en el organismo (por ejemplo, vasos sanguíneos, pieles, córnea, nervios, riñones y corazón).

20 Dado que el gen que codifica la α -galactosidasa se encuentra en el cromosoma X, esta enfermedad tiene un modo de herencia por el cromosoma X. Por lo tanto, en esta enfermedad, una característica clínica definitiva se observa principalmente en hemocigoto en machos. Se cree que la "enfermedad de Fabry clásica", que tiene curso clínico habitual, se desarrolla en aproximadamente uno de cada 40.000 niños varones. Síntomas tales como dolor en la mano y en el pie, hipohidrosis, angioqueratoma, y opacidad de la córnea aparecen durante el período juvenil y la adolescencia; estos síntomas evolucionan y entonces provocan daño orgánico sistémico tal como insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, y trastorno cerebrovascular durante la madurescencia y a partir de ese momento; y éstos se convierten en la causa de muerte. Además, una enfermedad que no adquiere tal curso clínico habitual como la "enfermedad de Fabry clásica" y que se desarrolla tarde y adquiere un curso relativamente moderado, es una "variante de la enfermedad de Fabry". En pacientes que tienen este tipo de enfermedad, se observa actividad de α -galactosidasa residual aunque esta es baja. Como una variante de la enfermedad de Fabry, por ejemplo, se conoce la "enfermedad de Fabry cardíaca". La acumulación de glicolípidos mencionada anteriormente se produce principalmente en el corazón. Por lo tanto, se produce hipertrofia cardíaca y se provocan trastornos tales como insuficiencia cardíaca y arritmia. Por otro lado, en pacientes heterocigotos hembra de Fabry, se observan diversos tipos de características clínicas de acuerdo con las características del cromosoma X. De forma específica, existen casos que varían de casos graves que son similares a los de los hemocigotos en machos a casos en los que no se observa básicamente ningún síntoma. Sin embargo, de acuerdo con investigación reciente, ha quedado claro que la mayoría de los pacientes heterocigotos hembra de Fabry desarrollan algunos síntomas cuando tienen mayor edad. Existe un punto de vista según el cual no se deberían tratar como "vehículos" sino como "pacientes".

40 Recientemente, también se ha establecido terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry, y una α -galactosidasa humana recombinante producida en una célula derivada de mamíferos se ha usado ampliamente como un principio activo de un agente terapéutico de la enfermedad de Fabry en la terapia anterior (véase Eng CM y col., Am J Hum Genet, 68: 711-722 (2001); Eng CM y col., N Engl J Med, 345: 9-16 (2001); y Schiffmann R y col., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97: 365-370 (2000)).

45 Además, también se ha propuesto un procedimiento en el que una α -galactosidasa humana recombinante, producida usando una célula (por ejemplo, levadura) diferente a una célula animal como un huésped, se usa para el tratamiento médico (terapia de sustitución enzimática) de la enfermedad de Fabry (véase la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Sin examinar N° 2002-369692), un procedimiento terapéutico génico en el que una enzima se sustituye mediante la introducción de un gen que codifica α -galactosidasa humana en una célula de un tejido afectado para expresar el gen (véase la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Sin examinar N° (Traducción de la Solicitud de PCT) N° 2002-522509), y similares.

Divulgación de la invención

55 Sin embargo, dado que a menudo se administra un agente enzimático existente usado en sustitución enzimática para el tratamiento de la enfermedad de Fabry a pacientes que originalmente no tienen una enzima (α -galactosidasa humana), la enzima contenida en el agente terapéutico se reconoce como una sustancia extraña en muchos pacientes administrados con el agente enzimático, y por lo tanto, se produce un anticuerpo. Como resultado, los efectos secundarios adversos, principalmente, las reacciones alérgicas se expresan con una frecuencia elevada. Esto se produce del mismo modo en el caso en el que la enzima se sustituye usando un procedimiento de terapia

génica.

Además, tal agente enzimático usado en sustitución enzimática se administra en los vasos sanguíneos, pero la α -galactosidasa en sí misma es inestable en la sangre. Por consiguiente, en la terapia actual, el agente enzimático se debe administrar frecuentemente (una vez cada dos semanas), y puede ser necesario aumentar la dosificación por administración. Además, la α -galactosidasa humana tiene un número relativamente pequeño de cadenas de azúcar (cadenas de azúcar de tipo N) a la que se puede unir el resto de manosa-6-fosfato (M6P), siendo las cadenas de azúcar necesarias para la α -galactosidasa humana a incorporar en una célula (más específicamente, en un lisosoma en una célula) en un órgano afectado. Por lo tanto, es difícil tomar la α -galactosidasa humana de la sangre e incorporarla en una célula. En particular, la eficacia de incorporación en el riñón o el corazón, que es el principal órgano afectado en la enfermedad de Fabry, es baja, y por lo tanto el efecto terapéutico para la nefropatía o cardiopatía es insuficiente. Por consiguiente, con el fin de permitir que una cierta cantidad de enzima se incorpore en una célula diana en la terapia, se requiere una gran cantidad de enzima. En consecuencia, es necesario administrar un agente enzimático usado en sustitución enzimática más frecuentemente y en una cantidad más elevada. Dicha terapia supone una gran carga para los pacientes física, mental y económicamente, y por lo tanto afecta de forma adversa a la "calidad de vida (QOL)".

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar, como una enzima que se puede usar para sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry, una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa, que no muestra ningún efecto secundario alérgico adverso, que muestra una estabilidad elevada en sangre (en plasma) y que se puede incorporar fácilmente en una célula de un órgano afectado.

Los presentes inventores dirigieron estudios intensos con el fin de resolver los problemas anteriores. Como resultado, los presentes inventores se centraron en la " α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA)", que tiene una especificidad del sustrato diferente de la de la α -galactosidasa pero que tiene una estructura tridimensional muy similar a la de la α -galactosidasa como un conjunto. Los presentes inventores han encontrado que cuando la especificidad del sustrato, específicamente de α -NAGA se convierte con el fin de que tenga actividad de α -galactosidasa cambiando la estructura del sitio activo de α -NAGA usando una técnica de recombinación génica, se puede crear una nueva enzima altamente funcional excelente para tratar la enfermedad de Fabry que se puede usar para solucionar los problemas mencionados anteriormente. Este hallazgo dio como resultado la finalización de la presente invención.

En el contexto de la presente invención se desvela:

(1) Una proteína que tiene actividad adquirida de α -galactosidasa mediante el cambio de la estructura del sitio activo de la α -N-acetilgalactosaminidasa humana de tipo silvestre.

Un ejemplo de la proteína es una proteína que tiene la especificidad del sustrato de la α -galactosidasa.

(2) Una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa, proteína que está formada por una secuencia de aminoácidos en la que al menos uno del aminoácido en la posición 188 y el aminoácido en la posición 191 en la secuencia de la α -N-acetilgalactosaminidasa humana de tipo silvestre se sustituye con otro aminoácido o una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen o añaden uno o varios aminoácidos excepto el aminoácido en la posición 188 y el aminoácido en la posición 191 incluidos en la secuencia de aminoácidos sustituida.

Un ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico o ácido aspártico en la sustitución con otro aminoácido.

Además, otro ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido en la posición 191 está sustituido con uno seleccionado entre el grupo que consiste en leucina, valina, isoleucina, fenilalanina y metionina en la sustitución con otro aminoácido.

Además, otro ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con leucina en la sustitución con otro aminoácido.

(3) Una proteína descrita como (a) o (b):

(a) una proteína que contiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se describen de (i) a (iii):

(i) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con un aminoácido distinto de la serina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2;

(ii) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 191 está sustituido con un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la

secuencia N° 2; y

5 (iii) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con un aminoácido distinto de la serina y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2; o

10 (b) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen o añaden uno o varios aminoácidos distintos del aminoácido o aminoácidos localizados en el sitio o sitios de sustitución en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se describen de (i) a (iii), y que tiene actividad de α -galactosidasa.

Un ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido distinto de la serina es ácido glutámico o ácido aspártico.

Además, otro ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido distinto de la alanina es uno seleccionado entre el grupo que consiste en leucina, valina, isoleucina, fenilalanina y metionina.

15 Además, otro ejemplo de la proteína es una proteína en la que el aminoácido distinto de la serina es ácido glutámico, y el aminoácido distinto de la alanina es leucina.

Una proteína de acuerdo con la invención que tiene actividad de α -galactosidasa se describe como (a) o (b):

20 (a) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido de 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2 en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico o ácido aspártico y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con leucina, valina, isoleucina, fenilalanina o metionina; o

25 (b) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos que se describe en (a), en la que se sustituyen de uno a diez aminoácidos distintos de los aminoácidos localizados en los sitios de sustitución, en la que los aminoácidos en las posiciones 28 a la 31, los aminoácidos en las posiciones 77 a la 81, los aminoácidos en las posiciones 117 a 127, los aminoácidos en las posiciones 150 a 158, el aminoácido en la posición 192, los aminoácidos en las posiciones 209 a 220, los aminoácidos en las posiciones 242 a 254 y los aminoácidos en las posiciones 45, 124, 177, 201, 350, 359, y 385 no están mutados.

En un ejemplo de la proteína de acuerdo con la presente invención, el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico, y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con leucina.

30 (4) Además, en el contexto de la presente invención se desvela un gen que codifica la proteína de acuerdo con una cualquiera de las referencias (1) a (3).

(5) Además se desvela un gen que contiene ADN que se describe por (a) o (b):

(a) ADN que contiene una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii):

35 (i) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en la que las bases en las posiciones 562 a 564 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1;

40 (ii) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en la que las bases en las posiciones 571 a 573 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1; y

45 (iii) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en la que las bases en las posiciones 562 a 564 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina y las bases en las posiciones 571 a 573 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1; o

50 (b) ADN que codifica una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa y que se hibrida con ADN formado por una secuencia de bases complementaria con el ADN que contiene una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii) en una condición rigurosa, en el que las bases que corresponden a las bases en los sitios de sustitución son idénticas a las bases en los sitios de sustitución.

Un ejemplo del gen es un gen en el que el aminoácido distinto de la serina es ácido glutámico o ácido aspártico.

Además, otro ejemplo del gen es un gen en el que el aminoácido distinto de la alanina es uno seleccionado entre el

grupo que consiste en leucina, valina, isoleucina, fenilalanina y metionina.

Además, otro ejemplo del gen es un gen en el que el aminoácido distinto de la serina es ácido glutámico y el aminoácido distinto de la alanina es leucina.

5 Un gen de acuerdo con la invención es un gen que comprende ADN que codifica una proteína de acuerdo con la presente invención.

(6) En el contexto de la presente invención también se desvela un vector recombinante que contiene el gen de acuerdo con referencia (4) o (5).

Un vector recombinante de acuerdo con la invención es un vector que comprende el gen de acuerdo con la presente invención.

10 (7) Además se desvela un transformante que contiene el vector recombinante de acuerdo con la referencia (6).

Un transformante de acuerdo con la invención es un transformante no humano que comprende el vector recombinante de acuerdo con la presente invención.

15 (8) Un procedimiento de producción de una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa también se desvela en el contexto de la presente invención, en el que la estructura del sitio activo de la α -N-acetilgalactosaminidasa humana de tipo silvestre se varía de modo que un sustrato de α -galactosidasa se puede unir al sitio activo. (9) Además se desvela un procedimiento de producción de una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa incluyendo una etapa de cultivo del transformante de acuerdo con la referencia (7), y una etapa de recogida de la proteína que tiene actividad de α -galactosidasa del producto cultivado resultante.

20 Un procedimiento de producción de una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa de acuerdo con la invención es un procedimiento que comprende una etapa de cultivo del transformante de acuerdo con la invención, y una etapa de recogida de la proteína que tiene actividad de α -galactosidasa del producto cultivado resultante.

(10) Además se desvela una composición farmacéutica que contiene la proteína de acuerdo con una cualquiera de las referencias (1) a (3).

25 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con la invención.

(11) Además se desvela un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry que contiene la composición farmacéutica de acuerdo con la referencia (10) como un principio activo.

Un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry de acuerdo con la invención es un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry que comprende la composición de acuerdo con la invención como un principio activo.

30 (12) Además se desvela una composición farmacéutica que contiene el gen de acuerdo con la referencia (4) o (5).

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica que comprende el gen de acuerdo con la invención.

35 (13) Además se desvela un agente terapéutico génico para la enfermedad de Fabry que contiene la composición farmacéutica de acuerdo con la referencia (12) como un principio activo.

Un agente terapéutico génico para la enfermedad de Fabry de acuerdo con la invención es un agente terapéutico génico para la enfermedad de Fabry que comprende la composición de acuerdo con la invención como un principio activo.

40 (14) Además se desvela un procedimiento para tratar la enfermedad de Fabry, en el que la composición farmacéutica de acuerdo con la referencia (10) o (12) se administra a un paciente de Fabry.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 incluye vistas esquemáticas que muestran las estructuras generales tridimensionales de una subunidad de α -GAL de tipo silvestre y una subunidad de α -NAGA de tipo silvestre.

45 La Fig. 2A incluye vistas esquemáticas que muestran las estructuras del sitio activo de α -GAL de tipo silvestre y el sitio activo de α -NAGA de tipo silvestre. Observar que los aminoácidos (mostrados con un modelo de barras (excepto un sustrato)) mostrados en la figura son del mismo tipo de aminoácidos en el caso en el que la secuencia de aminoácidos del sitio activo de α -GAL de tipo silvestre se compara con α -NAGA de tipo silvestre.

La Fig. 2B incluye vistas esquemáticas que muestran las estructuras del sitio activo de α -GAL de tipo silvestre y el sitio activo de α -NAGA de tipo silvestre. Observar que los aminoácidos (mostrados con un modelo de barras

(excepto un sustrato)) mostrados en la figura son tipos diferentes de aminoácidos en el caso en el que la secuencia de aminoácidos del sitio activo de α -GAL de tipo silvestre se compara con la de α -NAGA de tipo silvestre.

5 La Fig. 2C incluye vistas esquemáticas que muestran aminoácidos que constituyen el sitio activo de α -GAL de tipo silvestre y aminoácidos que constituyen el sitio activo de α -NAGA de tipo silvestre, y sitios de interacción de los aminoácidos con un sustrato.

La Fig. 3 incluye vistas esquemáticas que muestran la comparación entre el número de sitios de N-glicosilación y posiciones de los mismos en la subunidad de α -GAL de tipo silvestre y los de la subunidad de α -NAGA de tipo silvestre.

10 La Fig. 4 incluye vistas esquemáticas en las que los sitios de N-glicosilación (mostrados con un modelo de barras (excepto un sustrato)) en las subunidades de α -GAL de tipo silvestre y α -NAGA de tipo silvestre se muestran en las estructuras tridimensionales de las subunidades.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por comparación de la estabilidad de α -GAL en sangre con la de un mutante de α -NAGA con el tiempo en base a la relación residual de la actividad de α -GAL.

15 La Fig. 6(a) es una vista esquemática que muestra un estado en el que α -NAGA de tipo silvestre se une a un sustrato de α -NAGA, y la Fig. 6(b) es una vista esquemática que muestra un estado en el que α -NAGA (S188E/A191 I), que es un mutante de α -NAGA, se une a un sustrato de α -GAL.

La Fig. 7 incluye vistas esquemáticas que muestran las estructuras del sitio activo de α -NAGA de tipo silvestre y el sitio activo de α -NAGA (S188E/A191 I), que es un mutante de α -NAGA.

20 **Mejores modos para realizar la invención**

La presente invención se describirá ahora con detalle, pero el alcance de la presente invención no se limita con las descripciones que siguen a continuación. Además de los ejemplos que se describen a continuación, se pueden realizar diversas modificaciones a la presente invención sin apartarse del fin de la presente invención.

25 Esta descripción incluye la totalidad de la memoria descriptiva de la Solicitud de Patente Japonesa N° 2005-333660, que reivindica la prioridad de la presente solicitud. Además, todas las publicaciones, por ejemplo, documentos de la técnica anterior, publicaciones de solicitud de patente sin examinar, publicaciones de patente y otros documentos de patentes mencionados en la presente descripción se incorporan en la presente descripción como referencias.

1. Sumario de la presente invención

30 La presente invención proporciona una proteína recombinante que sirve como una nueva enzima altamente funcional excelente que se puede usar para terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry.

35 Para agentes enzimáticos existentes usados en sustitución enzimática para tratar la enfermedad de Fabry, se usa α -galactosidasa humana recombinante producida en una célula derivada de mamíferos, tales como una célula CHO (ovario de hámster Chino) o un fibroblasto humano. Sin embargo, el uso de la α -galactosidasa humana recombinante causa problemas tales como efectos secundarios alérgicos adversos, inestabilidad en la sangre y eficacia de incorporación baja en una célula de un órgano afectado, y de este modo coloca una carga muy grande en pacientes con la terapia real. Por consiguiente, se ha deseado una solución para estos problemas.

40 Con el fin de resolver estos problemas, los presentes inventores estudiaron si una enzima, o no, distinta de la α -galactosidasa (α -GAL) se puede usar como una enzima usada en sustitución enzimática para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. De forma específica, los presentes inventores se centraron en la " α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA)", que es una enzima lisosomal similar a α -GAL (es decir, siendo la localización de α -NAGA en una célula la misma que la de α -GAL), que tiene una especificidad del sustrato diferente de la de α -GAL, pero que tiene una estructura tridimensional muy similar a la de α -GAL como un conjunto.

45 α -GAL se solía denominar α -galactosidasa A. Se pensaba que existía una isozima denominada α -galactosidasa B con propiedades bioquímicas que son muy similares a las de α -GAL. Se supo que la α -galactosidasa B presenta una estabilidad más elevada que la de α -GAL, pero no tenía la capacidad de descomponer la globotriaosilceramida, que se acumula en el organismo con la enfermedad de Fabry. A continuación, se hizo evidente que la α -galactosidasa B es realmente la α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA). Se sabe que la α -NAGA está codificada por un gen que se considera que se deriva del mismo gen predecesor desde un gen que codifica α -GAL. El ADNc del mismo se ha clonado, y se sabe que el gen que codifica una proteína formada por 411 restos de aminoácidos que contiene un péptido de señal formado por 17 restos de aminoácidos. Además, cuando la estructura de la α -NAGA humana se compara con la de la α -GAL humana, la estructura de la α -NAGA humana tiene la homología de un 57,9 % en términos del nivel de la secuencia de bases, y un 52,2 % en términos del nivel de la secuencia de aminoácidos. Además, al igual que en la α -GAL humana, la α -NAGA humana es una enzima que existe en forma de un homodímero.

En base al conocimiento anterior, los presentes inventores construyeron primero modelos estructurales tridimensionales de α -NAGA y α -GAL, y compararon las estructuras. Más específicamente, se construyó un modelo de estructura tridimensional de la α -NAGA humana con referencia a la información de la estructura de α -NAGA de pollo (ID: 1KTC) registrada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>)), y esa estructura se comparó con la estructura tridimensional de la α -GAL humana (ID: 1R47) registrada en PDB. Como resultado, se encontró que la estructura tridimensional de la α -NAGA humana era muy similar a la estructura tridimensional de la α -GAL humana en términos tanto de la estructura entera como del sitio activo. Con respecto al sitio activo, para ser exactos, solamente unos pocos restos de aminoácidos son diferentes entre sí. Sin embargo, entre estos restos de aminoácidos, hay restos de aminoácidos importantes que están presentes en un sitio de unión al sustrato y que influyen en la diferencia entre la especificidad del sustrato de α -GAL y la especificidad del sustrato de α -NAGA. Se encontró que, a este respecto, existe una diferencia significativa en la estructura tridimensional entre el sitio activo de α -GAL y el sitio activo de α -NAGA.

Por lo tanto, α -NAGA es una enzima que se diferencia de α -GAL en la estructura de una parte del sitio de unión al sustrato en el sitio activo pero es muy similar a α -GAL en términos de la estructura y en términos de propiedades con respecto a las otras partes que incluyen el sitio catalítico (véanse las Figs. 1, 2A, y 2B). Por lo tanto, el mecanismo de reacción catalítico de α -NAGA es muy similar al mecanismo de reacción catalítico de α -GAL en términos de, por ejemplo, los tipos de sustrato de reacción usados y productos de reacción producidos.

En consecuencia, tal como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores se centraron en α -NAGA y encontraron que cuando la especificidad del sustrato de α -NAGA se modifica con el fin de que tenga actividad de α -galactosidasa cambiando la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión al sustrato) por manipulación génica de α -NAGA (por ejemplo, cuando, entre restos de aminoácidos relacionados con el reconocimiento del sustrato de α -NAGA, los restos de aminoácidos fundamentales se cambian de restos de aminoácidos de tipo α -NAGA a restos de aminoácidos de tipo α -GAL), se puede crear una nueva enzima altamente funcional excelente para tratar la enfermedad de Fabry.

Las razones por las que los presentes inventores se centraron en α -NAGA incluyen adicionalmente los siguientes puntos (i) a (iii):

(i) α -NAGA es la enzima responsable de la enfermedad de Shindler y la enfermedad de Kanzaki (obsérvese que una enfermedad que se desarrolla debido a anomalías de la misma enzima tal como una enzima que desarrolla la enfermedad de Shindler y que tiene un fenotipo clínico diferente del de la enfermedad de Shindler se denomina enfermedad de Kanzaki), y las deficiencias de α -NAGA son una causa del desarrollo de la enfermedad de Shindler y la enfermedad de Kanzaki. En general, sin embargo, el desarrollo de la enfermedad de Shindler y la enfermedad de Kanzaki es muy raro incluso en pacientes con Fabry. Por consiguiente, casi todos los pacientes con Fabry tienen α -NAGA normalmente. Por lo tanto, se cree que incluso cuando una proteína en la que se modifica solamente la especificidad del sustrato de α -NAGA en la especificidad del sustrato de α -GAL se administra como un agente enzimático usado en sustitución enzimática, la antigenicidad de la misma aparece en raras ocasiones como en el caso en el que se administra α -NAGA de tipo silvestre, y por lo tanto básicamente no existe probabilidad de que se induzca una reacción inmune adversa tal como un efecto secundario alérgico.

(ii) α -NAGA también funciona en forma de un homodímero de forma similar a α -GAL, pero en general, la estabilidad en la forma de dímero de α -NAGA es más elevada que la de α -GAL. El modelo de estructura tridimensional construido por los presentes inventores también apoya esta estabilidad. De forma específica, se confirmó que, en el dímero de la α -NAGA humana, se observaron dos enlaces debidos a interacción electrostática entre Asp45 y Arg350 en dos subunidades, mientras que tales enlaces no se observaron en la α -GAL. Por consiguiente, se cree que, al igual que en α -NAGA, un mutante de α -NAGA también tiene estabilidad elevada en sangre (en plasma), en comparación con α -GAL, y es muy adecuado para terapia de sustitución enzimática. Además, si la proporción de dímeros existentes aumenta debido a la estabilidad mencionada anteriormente, se espera que la eficacia de incorporación en un lisosoma en una célula también aumente en relación al punto (iii) que sigue a continuación. Además, es ventajoso porque, antes de la administración, el efecto se puede mantener en forma de una preparación enzimática durante un largo periodo de tiempo.

(iii) Es necesario que una enzima usada en terapia de sustitución enzimática se pueda incorporar en un lisosoma en una célula de un órgano afectado. En general, el transporte desde una membrana celular a un lisosoma se realiza a través de un receptor M6P independiente del calcio, que reconoce la manosa-6-fosfato (M6P) presente en porciones de cadena de azúcar de la enzima. Por consiguiente, una enzima que tiene un gran número de cadenas de azúcar (cadenas de azúcar de tipo N) a las que se puede unir el resto de M6P es preferente porque se puede conseguir una eficacia de incorporación elevada en un lisosoma. Con respecto al número de las cadenas de azúcar mencionadas anteriormente, se ha hecho evidente que, a partir del análisis de la estructura cristalina por rayos X, en α -GAL, están presentes tres cadenas de azúcar por subunidad (tres posiciones de Asn139, Asn192, y Asn215; seis cadenas de azúcar en el caso en el que se forma dímero). Por el contrario, en α -NAGA, están presentes cinco cadenas de azúcar por subunidad (diez cadenas de azúcar en el caso en el que se forma un dímero) (véanse las Figs. 3 y 4). Entre estas cadenas de azúcar, tres cadenas de azúcar (tres posiciones de Asn124, Asn177, y Asn201) corresponden a las posiciones de las cadenas de azúcar en α -GAL, y otras dos cadenas de azúcar (dos posiciones de Asn359 y Asn385) son específicas para α -NAGA. Por

consiguiente, se cree que α -NAGA se toma de la sangre y se incorpora en un lisosoma en una célula de un órgano afectado con una eficacia más elevada que la que se produce en el caso de α -GAL.

A partir de los puntos de vista mencionados anteriormente, los presentes inventores se centraron en el aminoácido en la posición 188 (serina (Ser)) y el aminoácido en la posición 191 (Ala (alanina)) entre un grupo de restos de aminoácidos que constituyen el sitio de unión al sustrato de α -NAGA. Los presentes inventores prepararon una enzima recombinante (enzima mutante) en la que la serina en la posición 188 (Ser) está sustituida con ácido glutámico (Glu) y la alanina en la posición 191 está sustituida con leucina (Leu) (véanse los Ejemplos 1 y 2). Posteriormente, esta enzima recombinante se expresó usando un fibroblasto derivado de un paciente con Fabry, se recogió, y se analizó. Como resultado, se observó una actividad de α -GAL elevada (véase el Ejemplo 2). Además, la estabilidad de esta enzima recombinante en sangre era significativamente más elevada que la de α -GAL de tipo silvestre (véase el Ejemplo 3 y la Fig. 5). Mediante el uso de tal enzima recombinante que tiene una especificidad del sustrato modificada, se puede proporcionar un agente enzimático usado en sustitución enzimática para el tratamiento de la Enfermedad de Fabry que es superior a los agentes enzimáticos existentes.

Obsérvese que, en la presente descripción, a menos que se indique de otro modo, los términos " α -galactosidasa" y " α -GAL" se refieren a " α -galactosidasa A humana", y los términos " α -N-acetilgalactosaminidasa" y " α -NAGA" se refieren a " α -N-acetilgalactosaminidasa humana". Las expresiones "la posición 188" y "la posición 191" representan posiciones en base a la secuencia de aminoácidos de α -NAGA que se muestra en la secuencia N° 2.

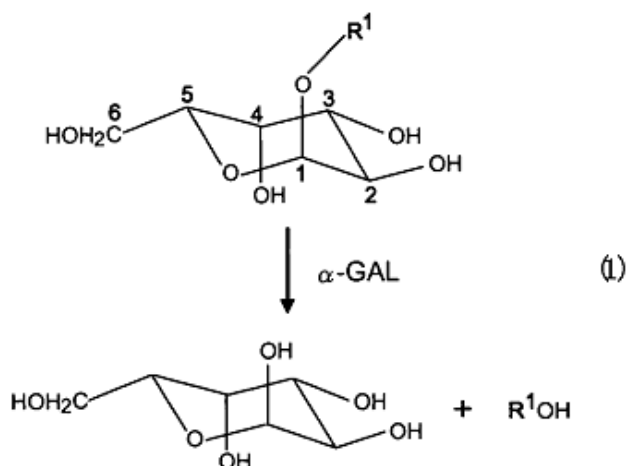
2. Proteína

Una proteína de la presente invención es una enzima mutante de α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA). Más específicamente, la proteína de la presente invención es una proteína que tiene actividad adquirida de α -galactosidasa (α -GAL) mediante el cambio de la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión al sustrato) de α -NAGA de tipo silvestre, y preferentemente, una proteína que tiene la especificidad del sustrato de α -GAL.

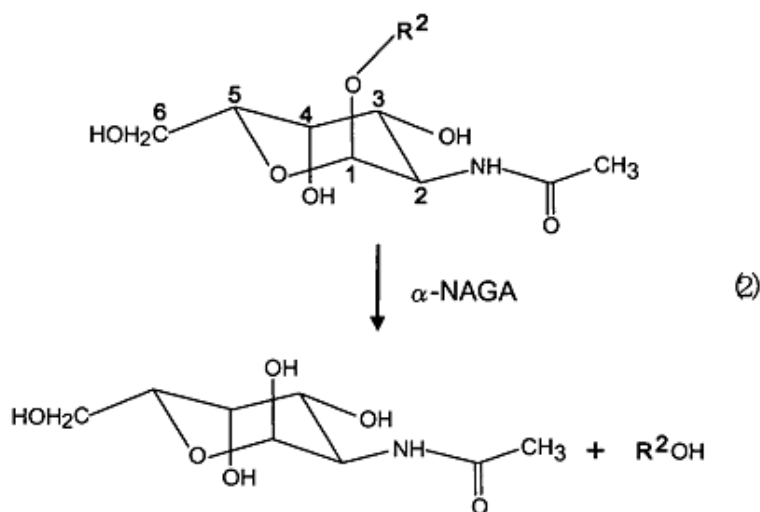
En el presente documento, la expresión "tiene actividad adquirida de α -GAL" se refiere a que, en el sitio de unión al sustrato de α -NAGA, la actividad de unión a un sustrato de α -GAL se convierte en relativamente más elevada que la reactividad de unión a un sustrato de α -NAGA. Por consiguiente, el cambio estructural anterior no se limita a un cambio en la estructura que hace imposible que α -NAGA se una con el sustrato de α -NAGA. Como alternativa, el cambio en la estructura puede ser un cambio en la estructura que hace que la reactividad de unión al sustrato de α -GAL sea significativamente más elevada que la reactividad de unión al sustrato de α -NAGA, que originalmente ha sido de forma relativa significativamente más elevada que la reactividad de unión al sustrato de α -GAL. Además, la expresión "que tiene la especificidad del sustrato de α -GAL" se refiere a que la estructura (en particular, las posiciones y los tipos de restos de aminoácidos que desempeñan un papel importante en la reactividad de unión a un sustrato) del sitio activo de la proteína es la misma que la de α -GAL.

En la presente invención, la expresión "sustrato de α -GAL" se refiere a un compuesto natural tal como un glicolípido, por ejemplo, globotriaosilceramida, que tiene un resto de galactosa unido al extremo no reductor mediante un enlace α , o un compuesto sintético, por ejemplo, 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido. La expresión "sustrato de α -NAGA" se refiere a un compuesto natural tal como un oligosacárido, glicoproteína o glicolípido que tiene un resto de N-acetilgalactosamina unido al extremo no reductor mediante enlace α , o un compuesto sintético, por ejemplo, 4-metilumbeliferil- α -N-acetil-D-galactosaminida.

Aquí, se muestra una reacción catalítica de α -GAL de tipo silvestre mediante la fórmula de reacción (1), y se muestra una reacción catalítica de α -NAGA de tipo silvestre mediante la fórmula de reacción (2).



[En la fórmula (1), cuando el sustrato es un compuesto natural, R^1 representa "un grupo derivado de un complejo de azúcar", y cuando el sustrato es un compuesto sintético, R^1 representa "un grupo 4-metilumbeliferilo".]



[En la fórmula (2), cuando el sustrato es un compuesto natural, R^2 representa "un grupo derivado de un complejo de azúcar", y cuando el sustrato es un compuesto sintético, R^2 representa "un grupo 4-metilumbeliferilo".]

Ejemplos de la proteína que se desvelan el contexto de la presente invención incluyen preferentemente proteínas que están formadas por una secuencia de aminoácidos en la que al menos uno del aminoácido en la posición 188 y el aminoácido en la posición 191 incluidos en la secuencia de aminoácidos de α -NAGA de tipo silvestre está sustituido con otro aminoácido (más preferentemente, una secuencia de aminoácidos en la que tanto el aminoácido en la posición 188 como el aminoácido en la posición 191 están sustituidos con otros aminoácidos) o una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen, o añaden uno o varios aminoácidos excepto el aminoácido en la posición 188 y el aminoácido en la posición 191 incluidos en la secuencia de aminoácidos sustituida mencionada anteriormente, y que tienen actividad de α -GAL. La información sobre la secuencia de aminoácido (secuencia N° 2) de la subunidad de α -NAGA de tipo silvestre (homodímero) y la información sobre la secuencia de bases (secuencia N° 1) que codifican la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente se publican, por ejemplo, como "número de acceso: NM_000262" en GenBank, y se registran como "nombre de entrada: NAGAB_HUMAN", número de acceso: P17050" en Swiss-Prot (disponible en <http://tw.expasy.org/uniprot/>). De forma análoga, la información sobre la secuencia de aminoácidos (secuencia N° 13) de la subunidad de α -GAL de tipo silvestre (homodímero) y la información sobre la secuencia de bases (secuencia N° 12) que codifica la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente se publican, por ejemplo, como "número de acceso: NP_000160" en GenBank, y se registran como "nombre de entrada: AGAL_HUMAN", número de acceso: P06280" en Swiss-Prot (disponible en <http://tw.expasy.org/uniprot/>).

En el presente documento, los ejemplos de la "secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen, o añaden uno o varios aminoácidos" mencionada anteriormente, incluyen preferentemente secuencias de aminoácidos en las que se suprimen, sustituyen, o añaden de uno a diez aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente uno a cinco aminoácidos.

Además, con respecto a "la proteína formada por una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen, o añaden uno o varios aminoácidos", es importante que la proteína pueda presentar de forma estable actividad de α -GAL. Por lo tanto, por ejemplo, todos o algunos de (preferentemente, todos) los aminoácidos en las posiciones 28 a 31, los aminoácidos en las posiciones 77 a 81, los aminoácidos en las posiciones 117 a 127, los aminoácidos en las posiciones 150 a 158, el aminoácido en la posición 192, los aminoácidos en las posiciones 209 a 220, y los aminoácidos en las posiciones 242 a 254 (en particular, los ácidos aspárticos en las posiciones 156 y 217 (Asp: D)), todos los cuales se cree que son importantes para el rendimiento de unión (crecimiento de unión al sustrato) con un resto de α -galactosa en un sustrato de α -GAL y la reactividad catalítica hacia el sustrato; el ácido aspártico en la posición 45 (Asp: D) y la arginina en la posición 350 (Arg: R), ambos de los cuales se creen que son importantes para formar un homodímero; y los aminoácidos en las posiciones 124, 177, 201, 359, y 385 (siendo todos asparagina (Asn: N)), todos los cuales son sitios de unión de cadena de azúcar de tipo N, son preferentemente aminoácidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos, o añadidos) a partir de la secuencia de aminoácidos de α -NAGA de tipo silvestre.

Con respecto al resto de aminoácido en la posición 188, el otro resto de aminoácido alternativo no está limitado en particular siempre y cuando el resto de aminoácido no sea serina (Ser: S). Por ejemplo, son preferentes ácido glutámico (Glu: E) y ácido aspártico (Asp: D), y es más preferente ácido glutámico. De forma análoga, con respecto al resto de aminoácido en la posición 191, el otro resto de aminoácido alternativo no está limitado en particular

siempre y cuando el resto de aminoácido no sea alanina (Ala: A). Por ejemplo, son preferentes leucina (Leu: L), valina (Val: V), isoleucina (Ile: I), fenilalanina (Phe: F), y metionina (Met: M), y leucina es más preferente. De forma particularmente preferente, entre éstos, como los aminoácidos alternativos, el aminoácido en la posición 188 es el ácido glutámico y el aminoácido en la posición 191 es la leucina. Obsérvese que, preferentemente, los aminoácidos después del reemplazo no afectan básicamente a la estructura formada por otros aminoácidos que no están sustituidos. A partir de este punto de vista, en una realización de reemplazo particularmente preferente, el resto de aminoácido en la posición 188 es el ácido glutámico y el resto de aminoácido en la posición 191 es la leucina.

Mediante la sustitución del aminoácido en la posición 188 y el aminoácido en la posición 191, ambos cuales están presentes en el sitio de unión al sustrato, tal como se describe anteriormente, se pueden conseguir los siguientes efectos. De forma específica, tal como se hace a modo de ejemplo en la Fig. 6, con respecto al resto de aminoácido en la posición 188, se puede retirar la interacción con el grupo N-acetilo (en particular, el átomo de oxígeno) en el sustrato de α -NAGA, y además, se puede generar una acción de unión con el grupo hidroxilo en el sustrato de α -GAL. Con respecto al resto de aminoácido en la posición 191, se puede retirar la interacción con el grupo N-acetilo (en particular, el grupo metilo) en el sustrato de α -NAGA, y además, se puede limitar el espacio de unión del sustrato (en particular, el espacio en el que se toma el grupo N-acetilo). Como resultado, la enzima recombinante (proteína recombinante) obtenida después de la sustitución de los aminoácidos tiene una reactividad de unión hacia el sustrato de α -GAL más elevada que la reactividad de unión hacia el sustrato de α -NAGA, y por lo tanto pueden ser una enzima que tiene una actividad de α -GAL significativamente más elevada que la actividad de α -NAGA. Al menos la enzima recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 188 (serina) está sustituido con ácido glutámico y el aminoácido en la posición 191 (alanina) está sustituido con leucina es particularmente preferente desde el punto de vista en el que se pueden conseguir de forma satisfactoria los efectos descritos anteriormente.

Además, una proteína que se desvela en el contexto de la presente invención es una proteína que se describe con (a) o (b):

(a) una proteína que contiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos se describen de (i) al (iii):

(i) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con un aminoácido distinto de la serina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2;

(ii) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 191 está sustituido con un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2; y

(iii) una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con un aminoácido distinto de la serina y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2; o

(b) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos distintos del aminoácido o aminoácidos localizados en el sitio o sitios de sustitución están suprimidos, sustituidos, o añadidos en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se describen de (i) a (iii), y que tiene actividad de α -galactosidasa.

La secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2 es una secuencia de aminoácidos formada por 411 aminoácidos que constituyen α -NAGA de tipo silvestre.

De forma específica, la proteína que se describe en (a) es una proteína formada por una secuencia de aminoácidos que contiene una secuencia de aminoácidos que varía del aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 excluyendo del aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 17, que constituyen el péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre, incluidos en una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido está sustituido tal como se describe en (i) a (iii) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2. Tal como se ha descrito anteriormente, cada uno del resto de aminoácido en la posición 188 y el resto de aminoácido en la posición 191 es uno de los aminoácidos que constituyen el sitio de unión al sustrato.

Aquí, un ejemplo preferente de la secuencia de aminoácidos que contiene una secuencia de aminoácidos que varía desde el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 es una secuencia de aminoácidos en la que un péptido de señal está unido al extremo N de la secuencia de aminoácidos que varía desde el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411. El péptido de señal no está limitado siempre y cuando el péptido de señal pueda permitir que la proteína pase a través de una membrana celular de un órgano afectado. Por ejemplo, es preferente un péptido de señal de una enzima lisosomal tal como α -NAGA de tipo silvestre o α -GAL de tipo silvestre, o un péptido de señal de una secretasa tal como preprotripsina. El péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre o α -GAL de tipo silvestre es más preferente. El péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre es un péptido formado por el aminoácido 1 al aminoácido 17 incluidos en la secuencia de aminoácidos de α -NAGA de tipo silvestre que se

muestra en la secuencia N° 2. El péptido de señal de α -GAL de tipo silvestre es un péptido formado por el aminoácido 1 al aminoácido en la posición 31 incluidos en la secuencia de aminoácidos de α -GAL de tipo silvestre que se muestran en la secuencia N° 13. El péptido de señal de la preprotipsina es un péptido formado por la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 15.

- 5 Al igual que la proteína que se describe en (a), entre las proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos que se describe en (i), (ii), o (iii), es particularmente preferente una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos que se describe en (iii).

Un ejemplo preferente de la proteína que se describe en (a) es una proteína en la que "el aminoácido distinto de la serina" que se describe en (i) y (iii) es ácido glutámico o ácido aspártico. De forma análoga, otro ejemplo preferente de la proteína que se describe en (a) es una proteína en la que "el aminoácido distinto de la alanina" que se describe en (ii) y (iii) es uno seleccionado entre el grupo que consiste en leucina, valina, isoleucina, fenilalanina y metionina.

Además, un ejemplo particularmente preferente de la proteína que se describe en (a) es una proteína en la que "el aminoácido distinto de la serina" que se describe en (i) a (iii) es ácido glutámico y "el aminoácido distinto de la alanina" que se describe en (i) a (iii) es leucina. Un ejemplo preferente de la proteína es una proteína (α -NAGA (S188E/A191 I)) en la que, en la secuencia de aminoácidos de α -NAGA de tipo silvestre (secuencia N° 2), la serina en la posición 188 está sustituida con ácido glutámico y la alanina en la posición 191 está sustituida con leucina (véase la Fig. 7 y la secuencia N° 4). En general, con respecto a la notación alfabética de los aminoácidos, un aminoácido se indica con tres letras (por ejemplo, "Ser") o una letra (por ejemplo, "S"). La letra del alfabeto localizada antes de un número (por ejemplo, "188") que representa la posición de un aminoácido del extremo N representa notación de una letra de un aminoácido antes de la sustitución, y la letra del alfabeto convocada después del número representa una notación de una letra de un aminoácido después de la sustitución. Por consiguiente, la notación "S188E" representa el caso en el que la Ser en la posición 188 está sustituida con Glu.

La proteína que se describe en (b) no está limitada siempre y cuando la proteína contenga una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios (por ejemplo, de aproximadamente uno a diez, y preferentemente, de aproximadamente a cinco) aminoácidos distintos del aminoácido o aminoácidos localizados en el sitio o sitios de sustitución se suprimen, sustituyen, o añaden en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se describen de (i) a (iii) incluidas en la proteína que se describe en (a), y tiene una actividad de α -galactosidasa. En el presente documento, la expresión "el sitio de sustitución" se refiere, entre los 394 restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii), el resto de aminoácidos que corresponde a la posición del aminoácido en la posición 188 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2 (sin embargo, la secuencia de aminoácidos está limitada a la secuencia de aminoácidos que se describe en (i) o (iii)), y el resto de aminoácidos que corresponde a la posición del aminoácido en la posición 191 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2 (sin embargo, la secuencia de aminoácidos está limitada a la secuencia de aminoácidos que se describe en (ii) o (iii)). Más específicamente, el resto de aminoácido anterior se refiere al resto de aminoácido en la posición 171 en la secuencia de aminoácidos que se describe en (i) o (iii), y el último resto de aminoácido se refiere al resto de aminoácido en la posición 174 en la secuencia de aminoácidos que se describe en (ii) o (iii).

Obsérvese que es importante que la proteína que se describe en (b) sea una proteína que pueda presentar actividad de α -GAL de forma estable. Por lo tanto, por ejemplo, se cree que los restos de aminoácidos son importantes para el rendimiento de unión (rendimiento de unión al sustrato) con un resto de α -galactosa en un sustrato de α -GAL y la reactividad catalítica hacia el sustrato son preferentemente restos de aminoácidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos, o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii). Los ejemplos preferentes de los restos de aminoácidos incluyen, entre los restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii), restos de aminoácidos que corresponden a las posiciones de los aminoácidos en las posiciones 28 a 31, los aminoácidos en las posiciones 77 a 81, los aminoácidos en las posiciones 117 a 127, los aminoácidos en las posiciones 150 a 158, el aminoácido en la posición 192, los aminoácidos en las posiciones 209 a 220, y los aminoácidos en las posiciones 242 a 254 (en particular, los ácidos aspárticos en las posiciones 156 y 217 (Asp: D)) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2.

De forma análoga, se cree que los restos de aminoácidos que son importantes para formar un homodímero también son preferentemente restos de aminoácidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos, o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii). Los ejemplos preferentes de los restos de aminoácidos incluyen, entre los restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii), restos de aminoácidos que corresponden a las posiciones del aminoácido en la posición 45 y el aminoácido en la posición 350 (específicamente, el ácido aspártico en la posición 45 (Asp: D) y la arginina en la posición 350 (Arg: R)) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2.

Además, los restos de aminoácidos que son sitios de unión de cadena de azúcar de tipo N también son preferentemente restos de aminoácidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos, o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a (iii). Los ejemplos preferentes de los restos de aminoácidos incluyen, entre los restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos que se describen en (i) a

(iii), restos de aminoácidos que corresponden a las posiciones de los aminoácidos 124, 177, 201, 359, y 385 (siendo todos ellos asparagina (Asn: N)) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2.

En la presente invención, la actividad de α -GAL se puede medir como sigue a continuación. Por ejemplo, se permite que una proteína diana se exprese con una célula derivada de mamíferos, tal como una célula CHO o un fibroblasto humano, y se recoge. A continuación, la proteína (solución enzimática) se mezcla con 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido (un sustrato sintético obtenido a partir de α -D-galactosa y 4-metilumbeliferona (sustrato fluorogénico)), y se permite que la mezcla reaccione en condiciones ácidas. En este caso, se detecta la cantidad de 4-metilumbeliferona liberada por una cantidad individual de la solución enzimática por unidad de tiempo para medir la actividad de α -GAL.

La actividad de α -NAGA también se puede medir como en la actividad de α -GAL. Se permite que una proteína diana se exprese y se recoge. A continuación, la proteína (solución enzimática) se mezcla con 4-metilumbeliferil- α -N-acetil-D-galactosaminida (un sustrato sintético obtenido a partir de α -N-acetil-D-galactosamina y 4-metilumbeliferona (sustrato fluorogénico)), y se permite que la mezcla reaccione en condiciones ácidas. En este caso, se detecta la cantidad de 4-metilumbeliferona que se puede liberar por unidad de tiempo por una cantidad individual de la solución enzimática para medir la actividad de α -NAGA.

En los procedimientos anteriores para medir la actividad de α -GAL y la actividad de α -NAGA, se pueden usar diversos tipos de procedimientos de detección conocidos para detectar el sustrato fluorogénico. Por ejemplo, es preferente un procedimiento de detección que usa un fluorofotómetro o similar. La proteína diana se puede expresar incorporando un gen que codifica la proteína en un vector de expresión conocido o similar, y a continuación introduciendo el vector en una célula. Como los procedimientos de medida, de forma específica, se pueden usar preferentemente a modo de ejemplo los procedimientos que se describen en el Ejemplo 3 y en el Ejemplo 4 que siguen a continuación.

3. Gen recombinante

Ejemplos preferentes de un gen que codifica la proteína que se ha descrito anteriormente, que se desvelan en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, genes que contienen ADN descrito en (a) o (b) que sigue a continuación. Los ADN que se describen en (a) y (b) son preferentemente genes estructurales de la proteína de la presente invención. El gen que contiene cualquiera de estos ADN puede consistir totalmente en el ADN. Como alternativa, el gen puede contener el ADN como una parte del mismo y puede contener adicionalmente otras secuencias de bases conocidas (tales como un promotor de la transcripción, la secuencia SD, la secuencia Kozak, y un terminador) necesarios para la expresión génica. Por lo tanto, el gen no se limita a los mismos.

(a) ADN que contiene una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii);

(i) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en las que las bases "agc" en las posiciones 562 a 564 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1;

(ii) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en las que las bases "gcc" en las posiciones 571 a 573 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1; y

(iii) una secuencia de bases formada por las bases en las posiciones 52 a 1.236 incluidas en una secuencia de bases en las que las bases "agc" en las posiciones 562 a 564 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina y las bases en las posiciones 571 a 573 están sustituidas con bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1; o

(b) ADN que codifica una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa y que se hibrida con ADN formado por una secuencia de bases complementaria con el ADN que contiene una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii) en una condición rigurosa, en el que las bases que corresponden a las bases en los sitios de sustitución que se han descrito anteriormente son idénticas a las bases en los sitios de sustitución.

En la presente invención, el término "codón" se requiere no solamente a la triple unión de bases (tripleto) de una secuencia de ARN después de la transcripción sino también a la triple unión de bases de una secuencia de ADN. Por consiguiente, los codones de una secuencia de ADN se indican usando timina (T) en lugar de uracilo (U).

La secuencia de bases mostrada en la secuencia N° 1 es una secuencia de bases formada por 1.236 bases que codifican α -NAGA de tipo silvestre.

De forma más específica, el ADN que se describe en (a) es ADN formado por una secuencia de bases que contiene una secuencia de bases que varía desde la base en la posición 52 a la base en la posición 1.236 excluyendo la base en la posición 1 a la base en la posición 51, que codifican un péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre, en una

secuencia de bases en la que las bases están sustituidas tal como se describe en (i) a (iii) en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1.

5 Aquí, un ejemplo preferente de la secuencia de bases que contiene una secuencia de bases que varía desde la base en la posición 52 a la base en la posición 1.236 es una secuencia de bases en la que una secuencia de bases (polinucleótido) que codifica un péptido de señal está unida a la posición 5' de la secuencia de bases que varía desde la base en la posición 52 a la base en la posición 1.236. El péptido de señal no está limitado siempre y cuando el péptido de señal pueda permitir que la proteína pase a través de una membrana celular de un órgano afectado. Por ejemplo, es preferente un péptido de señal de una enzima lisosomal tal como α -NAGA de tipo silvestre o α -GAL de tipo silvestre, o un péptido de señal de una secretasa tal como preprotipsina. Un péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre o α -GAL de tipo silvestre es más preferente. Una secuencia de bases que codifica el péptido de señal de α -NAGA de tipo silvestre es una secuencia de bases formada por la base en la posición 1 a la base en la posición 51 en la secuencia de bases de α -NAGA de tipo silvestre mostrada en la secuencia N° 1. Una secuencia de bases que codifica el péptido de señal de α -GAL de tipo silvestre es una secuencia de bases formada por la base en la posición 1 a la base en la posición 93 en la secuencia de bases de α -GAL de tipo silvestre mostrada en la secuencia N° 12. Una secuencia de bases que codifica el péptido de señal de preprotipsina es una secuencia de bases mostrada en la secuencia N° 14.

Como el ADN que se describe en (a), entre los ADN que contienen la secuencia de bases que se describe en (i), (ii) o (iii), es particularmente preferente el ADN que contiene la secuencia de bases que se describe en (iii).

20 Además, como el ADN que se describe en (a), es preferente el ADN en el que "las bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina" descrito en (i) y (iii) son bases que representan un codón de ácido glutámico o ácido aspártico. De forma análoga, como el ADN que se describe en (a), también es preferente el ADN en el que "las bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina" que se describe en (ii) y (iii) son bases que representan un codón de uno seleccionado entre el grupo que consiste en leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, y metionina. En el presente documento, con respecto a las bases que representan un codón de cada uno de los aminoácidos mencionados anteriormente (en los que la base colocada en el extremo izquierdo se define como una base en la posición 5'), las bases que representan un codón de ácido glutámico son "gag" o "gaa" (preferentemente "gag"), y las bases que representan un codón de ácido aspártico son "gat" o "gac". De forma análoga, las bases que representan un codón de leucina son "ctc", "ctt", "cta", o "ctg" (preferentemente "ctc"), las bases que representan un codón de valina son "gtt", "gtc", "gta", o "gtg", las bases que representan un codón de isoleucina son "att", "atc", o "ata", las bases que representan un codón de fenilalanina son "ttt" o "ttc", y las bases que representan un codón de metionina son "atg". Las bases que representan un codón de serina incluyen "agt" además de "agc" mencionado anteriormente. Las bases que representan un codón de alanina incluyen "gct", "gca" y "gcg" además de "gcc" mencionado anteriormente.

35 Además, como el ADN que se describe en (a) mencionado anteriormente, es particularmente preferente el ADN en el que "las bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la serina" que se describe en (i) a (iii) son bases que representan un codón de ácido glutámico, y "las bases que representan un codón de un aminoácido distinto de la alanina" que se describen en (i) a (iii) son bases que representan un codón de leucina. Un ejemplo preferente de tal ADN es el ADN formado por una secuencia de bases (secuencia N° 3) en la que las bases en las posiciones 562 a 564, que son bases que representan un codón de serina, incluida la secuencia de bases de α -NAGA de tipo silvestre (secuencia N° 1) están sustituidas con bases que representan un codón de ácido glutámico ("agc" \rightarrow "gag"), y las bases en las posiciones 571 a 573, que son bases que representan un codón de alanina, incluidas en la secuencia de bases de α -NAGA de tipo silvestre (secuencia N° 1) están sustituidas con bases que representan un codón de leucina ("gcc" \rightarrow "ctc"). En este ejemplo, las bases en las posiciones 562 a 564 después de la sustitución no se limitan a "gag" mencionado anteriormente y pueden ser otras bases siempre y cuando las bases representen un codón de ácido glutámico. De forma análoga, las bases en las posiciones 571 a 573 después de la sustitución no se limitan a "ctc" mencionada anteriormente y pueden ser otras bases siempre y cuando las bases representen un codón de leucina.

50 Tal ADN mutante se puede preparar de acuerdo con un procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio que se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997). De forma específica, tal ADN se puede preparar mediante un procedimiento conocido tal como procedimiento de Kunkel o un procedimiento de muesca bicatenaria (Gapped duplex) usando un kit para introducir una mutación usando un procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio. Los ejemplos preferentes del kit incluyen el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuickChange™ (fabricado por Stratagene), el Sistema de Mutagénesis Dirigida al Sitio GeneTailor™ (fabricado por Invitrogen Corporation) y el Sistema de Mutagénesis Dirigida al Sitio TaKaRa (por ejemplo, Mutan-K o Mutan-Super Express Km: fabricado por Takara Bio Inc.).

60 Como alternativa, como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación, tal ADN se puede preparar realizando una reacción en cadena de polimerasa (PCR) en condiciones apropiadas usando un cebador de PCR que se diseña de modo que se introduce una mutación sin sentido para producir bases que representan un codón de un aminoácido deseado, y usando, como un molde, por ejemplo, ADN que contiene una secuencia de bases que codifica α -NAGA de tipo silvestre. Los ejemplos preferentes de tal cebador de PCR incluyen cebadores de

oligonucleótido sintéticos mostrados en las secuencias N^{os} 8 y 10, que se describen en el Ejemplo 1 que sigue a continuación. Una ADN polimerasa usada para la PCR no está limitada, pero es preferente una ADN polimerasa con precisión elevada. Los ejemplos precedentes de la misma incluyen ADN Polimerasa Pwo (Roche Diagnostics K.K.), ADN polimerasa Pfu (Promega), ADN polimerasa platinum Pfx (Invitrogen Corporation), ADN polimerasa KOD (Toyobo Co., Ltd.) y KOD-plus-polimerasa (Toyobo Co., Ltd.). Las condiciones de reacción para la PCR se pueden determinar apropiadamente de acuerdo con, por ejemplo, la temperatura óptima de la ADN polimerasa usada, y la longitud y el tipo de ADN a sintetizar. Por ejemplo, en condiciones de ciclo preferentes, un ciclo que consiste en "de 5 a 30 segundos de 90 °C a 98 °C (desnaturalización y disociación térmica) → de 5 a 30 segundos de 50 °C a 65 °C (hibridación) → de 30 a 1.200 segundos de 65 °C a 80 °C (síntesis y extensión)" se realiza un total de 20 a 200 veces.

El ADN que se describe en (b) se puede obtener como sigue a continuación. Se realiza un procedimiento de hibridación conocido tal como hibridación de colonias, hibridación de placas o transferencia de Southern usando ADN que contiene una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii) (es decir, el ADN que se describe en (a)), ADN formado por una secuencia de bases complementaria con este ADN, o un fragmento del mismo como una sonda, y el ADN que se describe en (b) se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica. Se puede usar una biblioteca preparada mediante un procedimiento conocido. Como alternativa, se puede usar una biblioteca de ADNc o biblioteca genómica disponible en el mercado. La biblioteca no se limita a las mismas.

Con respecto a un procedimiento detallado del procedimiento de hibridación, véase, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2^a ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) si fuera necesario.

La expresión "condición rigurosa" durante la realización de un procedimiento de hibridación se refiere a una condición durante el lavado después de la hibridación, de forma específica, a una concentración de sal de un tampón en el intervalo de 15 a 330 mM y una temperatura en el intervalo de 25 °C a 65 °C, y preferentemente, una concentración de sal en el intervalo de 15 a 150 mM y una temperatura en el intervalo de 45 °C a 55 °C. Más específicamente, un ejemplo de la condición rigurosa es una concentración de sal de 80 mM y una temperatura de 50 °C. Adicionalmente, además de la concentración de sal, la temperatura y similares, en consideración de otras condiciones tales como la concentración de la sonda, la longitud de la sonda y el tiempo de reacción, las condiciones para obtener el ADN que se describe en (b) se pueden determinar de forma apropiada.

El ADN a hibridar tiene una secuencia de bases que tiene una homología de preferentemente al menos un 40 % o superior, más preferentemente un 60 %, además preferentemente un 90 % o superior, de forma particularmente preferente un 95 % o superior, y lo más preferentemente un 99 % o superior con respecto a la secuencia de bases del ADN que se describe en (a).

Además, en el ADN que se describe en (b), las bases que corresponden a las bases en los sitios de sustitución que se han descrito anteriormente son las mismas que las bases en los sitios de sustitución.

En el presente documento, la expresión "sitios de sustitución" se refiere a sitios de las sustituciones de bases realizados en una cualquiera de las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii) contenidas en el ADN que se describe en (a). De forma específica, la expresión "sitios de sustitución" se refiere a sitios de bases (triplete) que representan un codón después del cambio causado por las sustituciones de bases. Más específicamente, la expresión "sitios de sustitución" se refiere, entre 1.185 bases que constituyen las secuencias de bases que se describen de (i) a (iii), a bases que corresponden a las bases en las posiciones 562 a 564 en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N^o 1 (sin embargo, las secuencias de bases están limitadas a las secuencias de bases que se describen en (i) y (iii)), y bases que corresponden a las bases en las posiciones 571 a 573 en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N^o 1 (sin embargo, las secuencias de bases están limitadas a las secuencias de bases que se describen en (ii) y (iii)). Más específicamente, las bases anteriores se refieren a las bases en las posiciones 511 a 513 en las secuencias de bases que se describen en (i) y (iii) mencionadas anteriormente, y las últimas bases se refieren a las bases en las posiciones 520 a 522 en las secuencias de bases que se describen en (ii) y (iii) mencionados anteriormente.

Además, la expresión "bases que corresponden ..." en la expresión "bases que corresponden a las bases en los sitios de sustitución" se refiere a bases (triplete) que están localizadas de forma que se enfrentan a bases (triplete) complementarias a las bases en los sitios de sustitución en un híbrido preparado por hibridación del ADN que se describe en (b) con una hebra complementaria al ADN que se describe en (a). Por ejemplo, cuando la secuencia de bases del ADN que se describe en (b) no tiene una mutación tal como supresión o adición, en comparación con el ADN que se describe en (a) (es decir, cuando la longitud (el número de bases) del ADN que se describe en (a) es la misma que la longitud (el número de bases) del ADN (b)), las bases en las posiciones 511 a 513 y/o las bases en las posiciones 520 a 522 en la secuencia de bases del ADN que se describe en (b) son las "bases que corresponden ..." mencionadas anteriormente en la expresión "bases que corresponden a las bases en los sitios de sustitución".

Es importante que el ADN que se describe en (b) sea ADN que codifica una proteína que tiene la actividad de α %GAL. Por lo tanto, por ejemplo, las bases que representan un codón de un resto de aminoácido que se cree que es importante para el rendimiento de unión (rendimiento de unión al sustrato) con un resto de α -galactosa en un

5 sustrato de α -GAL y la reactividad catalítica hacia el sustrato son preferentemente bases que no están mutadas (suprimidas, sustituidas, o añadidas) a partir de la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii). Ejemplos preferentes de tales bases de la secuencia de bases que se describen de (i) a (iii) incluyen bases que corresponden a las posiciones de las bases en las posiciones 82 a 93 (4 codones), las bases en las posiciones 229 a 243 (5 codones), las bases en las posiciones 349 con 381 (11 codones), las bases en las posiciones 448 a 474 (9 codones), las bases en las posiciones 574 a 576 (1 codón), las bases en las posiciones 625 a 660 (12 codones), y las bases en las posiciones 724 a 762 (13 codones) en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1 entre la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii). Entre estas bases, son particularmente preferentes las bases que corresponden a las bases en las posiciones 466 a 468 y las bases en las posiciones 649 a 651, que representan codones de restos de aminoácidos de un sitio catalítico.

15 Además, en el ADN que se describe en (b), las bases que representan un codón de un resto de aminoácido que se cree que es importante para formar un homodímero también son preferentemente bases que no están mutadas (suprimidas, sustituidas, o añadidas) a partir de la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii). Ejemplos preferentes de tales bases de la secuencia de bases que se describen de (i) a (iii) incluyen bases que corresponden a las posiciones de las bases en las posiciones 133 a 135 y las bases en las posiciones 1.048 a 1.050 en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1 entre la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii).

20 Además, en el ADN que se describe en (b), las bases que representan un codón de un resto de aminoácido que es un sitio de unión de cadena de azúcar de tipo N también son preferentemente bases que no están mutadas (suprimidas, sustituidas, o añadidas) a partir de la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii). Ejemplos preferentes de tales bases de la secuencia de bases que se describen de (i) a (iii) incluyen bases que corresponden a las posiciones de las bases en las posiciones 370 a 372, las bases en las posiciones 529 a 531, las bases en las posiciones 601 a 603, las bases en las posiciones 1.075 a 1.077, y las bases en las posiciones 1.153 a 1.155 en la secuencia de bases que se muestra en la secuencia N° 1 entre la secuencia de bases que se describe de (i) a (iii).

25 Un ejemplo particularmente preferente del ADN que se describe en (b) es ADN formado por una secuencia de bases que no es completamente la misma que la secuencia de bases del ADN que se describe en (a) pero en el que la secuencia de aminoácidos después de la traducción es completamente la misma que la secuencia de aminoácidos del ADN que se describe en (a) (es decir, ADN obtenido mediante la realización de una mutación silenciosa en el ADN que se describe en (a)).

30 Con respecto a un gen que codifica la proteína de la presente invención, los codones que corresponden a cada uno de los aminoácidos después de la traducción no se ven limitados de forma particular. Por consiguiente, el gen que codifica la proteína de la presente invención puede contener ADN que representa codones que se usan por lo general (preferentemente, codones cuya frecuencia de uso es elevada) en mamíferos, tales como los seres humanos, después de la traducción. Como alternativa, el gen puede contener ADN que representa codones que por lo general se usan (preferentemente, codones cuya frecuencia es elevada), por ejemplo, en un microorganismo, tal como *E. coli* o levadura, o una planta, después de la transcripción.

4. Vector recombinante y transformante

40 Con el fin de expresar la proteína de la presente invención, en primer lugar, es necesario incorporar el gen de la presente invención que se ha descrito anteriormente en un vector de expresión para construir un vector recombinante. En esta etapa, si fuera necesario, un promotor de la transcripción, la secuencia SD (en el caso en el que un huésped es una célula procariótica) y la secuencia Kozak (en el caso en el que un huésped es una célula eucariota) se puede unir cadena arriba del gen a incorporar en el vector de expresión con antelación. Un terminador se puede unir cadena abajo del mismo con antelación. Además, un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de adición poli-A, un marcador selectivo, y similares también se pueden unir con antelación. Los elementos mencionados anteriormente, tales como un promotor de la transición, necesarios para la expresión de un gen pueden estar contenidos originalmente en el gen. En el caso de que estos elementos estén contenidos originalmente en el vector de expresión, se pueden usar los elementos contenidos en el vector de expresión. Por lo tanto, la forma de abuso de estos elementos no está limitada en particular.

50 Como un procedimiento para incorporar el gen en un vector de expresión, se pueden usar diversos tipos de procedimientos que usan una técnica de recombinación génica conocida, por ejemplo, un procedimiento que usa una enzima de restricción, o un procedimiento que usa una topoisomerasa. El vector de expresión no está limitado siempre y cuando el vector de expresión pueda mantener un gen que codifica una proteína de la presente invención. Ejemplos del vector de expresión vector incluyen ADN plásmido, ADN bacteriófago, ADN de retrotransposón, un vector de retrovirus, un ADN de cromosoma artificial. Se puede seleccionar y usar de forma apropiada un vector que se puede combinar adecuadamente con una célula huésped usada.

55 Posteriormente, el vector recombinante construido se introduce en un huésped para obtener un transformante y el transformante se cultiva. Por lo tanto, la proteína de la presente invención se puede expresar. El término "transformante" usado en la presente invención se refiere a un producto en el que un gen extraño se introduce en un huésped. Por ejemplo, el transformante incluye un producto en el que un gen extraño se introduce mediante la introducción de ADN plásmido o similar en un huésped (transformación) y un producto en el que un gen extraño se

introduce por infección de un huésped con un virus o un fago (transducción).

El huésped no está limitando siempre y cuando el huésped pueda expresar una proteína de la presente invención después de que el vector recombinante se introduzca dentro de la misma, y se puede seleccionar apropiadamente. Ejemplos del mismo incluyen huéspedes conocidos tales como células animales, por ejemplo, una célula humana y una célula de ratón, células vegetales, bacterias, levadura y células vegetales.

5

Cuando se usa una célula animal como un huésped, por ejemplo, un fibroblasto humano, se usa una célula CHO, una célula COS-7 de mono, Vero, una célula L de ratón, una GH3 de rata, una célula FL humana, o similar. Como alternativa, también se pueden usar células de insecto tal como una célula Sf9 o una célula Sf21.

Cuando se usa una bacteria como un huésped, por ejemplo, se usa *E. coli* o *Bacillus subtilis*.

10 Cuando se usa levadura como un huésped, por ejemplo, se usa *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*.

Cuando se usa una célula vegetal como un huésped, por ejemplo, se usará una célula BY-2 de tabaco.

15 El procedimiento para obtener un transformante no está limitado y se puede seleccionar de forma apropiada en consideración de la combinación de los tipos de huésped y vector de expresión usados. Los ejemplos preferentes del procedimiento incluyen un procedimiento de electroporación, un procedimiento de lipofección, un procedimiento de choque térmico, un procedimiento de polietilenglicol (PEG), un procedimiento de fosfato cálcico, un procedimiento de dietilaminoetil dextrano (DEAE-dextrano) y un procedimiento de infección de un virus tal como un virus de ADN o un virus de ARN.

20 En el transformante resultante, el tipo de codón de un gen contenido en el vector recombinante no está limitado. El tipo de codón puede ser idéntico o diferente del tipo de codón de un huésped que se usa en realidad.

5. Procedimiento de producción de proteína

25 Una proteína de la presente invención se puede producir cambiando la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión al sustrato) de α -NAGA de tipo silvestre de modo que un sustrato de α -GAL se puede unir al mismo. Si el sustrato de α -GAL se puede unir al sitio activo, el sustrato se puede hidrolizar mediante una catálisis debido al sitio catalítico de α -NAGA de tipo silvestre.

30 Tal cambio en la estructura se realiza como sigue a continuación. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, en la secuencia de aminoácidos que constituye el sitio activo (sitio de unión al sustrato) de α -NAGA de tipo silvestre, (i) la serina en la posición 188 está sustituida con otro aminoácido tal como ácido glutámico o ácido aspártico, (ii) la alanina en la posición 191 está sustituida con otro aminoácido tal como leucina, valina, isoleucina, fenilalanina o metionina, o (iii) tanto la serina en la posición 188 como la alanina en la posición 191 están sustituidas tal como se describe en (i) y (ii) mencionados anteriormente mediante una técnica de recombinación génica. El cambio en la estructura se puede conseguir cambiando la estructura tridimensional de las cadenas laterales de los aminoácidos antes y después de la sustitución. En consecuencia, la especificidad del sustrato de α -NAGA de tipo silvestre se puede cambiar. En particular, el cambio en la estructura mencionado anteriormente se realiza preferentemente por sustitución de la serina en la posición 188 con ácido glutámico y mediante la sustitución de la alanina en la posición 35 191 con leucina. Por lo tanto, la especificidad del sustrato de α -GAL se puede transmitir a α -NAGA. En el cambio en la estructura mencionado anteriormente, una sustitución de aminoácido que causa un cambio en la estructura tridimensional significativo es la sustitución de la alanina en la posición 191, por ejemplo, con leucina. Más específicamente, la cadena lateral del aminoácido en la posición 191 se cambia a partir de "-CH₃", que es la cadena lateral de alanina, hasta una cadena lateral voluminosa, tal como "-CH₂-CH(CH₃)-CH₃", que es la cadena lateral de la leucina. Como resultado, el espacio del sitio activo en el que se incorpora el grupo N-acetilo en un sustrato de α -NAGA se limita, disminuyendo de ese modo el rendimiento de unión de la proteína con el sustrato. En su lugar, el rendimiento de unión con un sustrato de α -GAL aumenta en consecuencia.

45 La proteína de la presente invención se puede producir de forma específica mediante un procedimiento que incluye una etapa de cultivo del transformante que se ha descrito anteriormente y una etapa de recogida de una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa del producto cultivado resultante. En el presente documento, la expresión "producto cultivado" se refiere a todos de un sobrenadante de cultivo, células cultivadas, bacterias cultivadas, células alteradas y bacterias alteradas. El cultivo del transformante se puede realizar de acuerdo con un procedimiento normal usado para cultivo de un huésped. La proteína diana se acumula en el producto cultivado.

50 Como un medio usado para el cultivo, se puede usar un medio natural o un medio sintético conocidos siempre y cuando el medio contenga, por ejemplo, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas, todas las cuales las puede usar el huésped, y el transformante se puede cultivar de forma eficaz.

55 Con el fin de evitar el desprendimiento de un vector recombinante contenido en el transformante y el desprendimiento de un gen que codifica una proteína diana, el cultivo se puede realizar en un estado en el que se aplica una presión selectiva. De forma específica, en el caso de un marcador selectivo es un gen de resistencia a

fármacos, se puede añadir un fármaco correspondiente al medio. En el caso en el que un marcador selectivo es un gen complementario auxotrófico, un factor nutricional correspondiente se puede retirar del medio. Por ejemplo, en el caso en el que se cultiva un fibroblasto humano transducido con un vector que contiene el gen resistente a G418, se puede añadir G418 (sulfato de G418) durante el cultivo, si fuera necesario.

- 5 En el caso en el que, por ejemplo, se cultiva un transformante transformado con un vector de expresión en el que se usa un promotor que se puede inducir como un promotor, se puede añadir al medio un inductor apropiado (por ejemplo, isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)), si fuera necesario.

10 Las condiciones de cultivo del transformante no están limitadas en particular siempre y cuando la productividad de la proteína diana y el crecimiento del huésped no se vean interrumpidos. En general, el cultivo se realiza a una temperatura en el intervalo de 10 °C a 40 °C, y preferentemente en el intervalo de 20 °C a 37 °C de 5 a 100 horas. El pH se puede ajustar usando un ácido inorgánico u orgánico, una solución alcalina, o similares. Ejemplos del procedimiento de cultivo incluyen cultivo sólido, cultivo estático, cultivo con agitación, y cultivo con agitación y aireación.

15 Cuando la proteína diana se produce en bacterias o en células, la proteína diana se puede recoger por alteración de las bacterias a las células. Como un procedimiento de alteración de las bacterias o las células, se puede usar, por ejemplo, un tratamiento a alta presión usando una prensa Francesa o un homogeneizador, un tratamiento ultrasónico, un tratamiento de molienda usando perlas de vidrio o similares, un tratamiento enzimático usando lisozima, celulasa, pectinasa, o similares, un tratamiento de congelación-descongelación, un tratamiento con una solución y hipotónica, o un tratamiento de inducción de la bacteriolisis usando un fago. Después de la alteración, el resto de alteración (que contiene una fracción insoluble en un extracto celular) de las bacterias en las células se puede retirar, si fuera necesario. Ejemplos del procedimiento para retirar el resto incluyen separación con centrifuga
20 infiltración. Además, la eficacia de la retirada del resto se puede aumentar usando, por ejemplo, un floculante o una ayuda de filtro, si fuera necesario. El sobrenadante obtenido después de la retirada del resto es una fracción soluble en el extracto celular, y se puede usar como una solución de proteína en bruto.

25 Cuando la proteína diana se produce en bacterias o en células, como alternativa, las bacterias o las células se puede recuperar, por ejemplo, mediante separación con centrifuga o separación con membrana, y de este modo, la proteína se puede usar sin alteración de las bacterias o las células.

30 Por el contrario, cuando la proteína diana se produce fuera de bacterias o fuera de células, la solución de cultivo se usa sin tratamiento adicional, o las bacterias las células se retiran, por ejemplo, mediante separación con centrifuga o filtración. Posteriormente, la proteína diana se recoge del producto cultivado, por ejemplo, por extracción mediante precipitación con sulfato de amonio, si fuera necesario. Además, de acuerdo con las necesidades, la proteína diana se puede aislar y purificar por diálisis y cromatografía (tal como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía por afinidad).

35 El rendimiento de la producción de una proteína obtenida por cultivo de un transformante o similar se puede determinar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en términos de las unidades por solución de cultivo, las unidades por peso en húmedo o peso seco de bacterias, las unidades por proteína en una solución enzimática en bruto o similares.

40 Además del sistema de síntesis de proteínas que usa un transformante que se ha descrito anteriormente, se puede producir una proteína diana usando un sistema de síntesis de proteínas de libre de células en el que no se usan células vivas.

El sistema de síntesis de proteínas libre de células es un sistema en el que se sintetiza una proteína diana en un recipiente artificial tal como un tubo de ensayo usando un extracto celular. Un sistema de síntesis de proteínas libres de células que también se puede usar incluye un sistema de transcripción libre de células en el que el ARN se sintetiza usando ADN como un molde.

45 En este caso, el extracto celular usado tiene su origen preferentemente en la célula huésped que se ha descrito anteriormente. Ejemplos del extracto celular que se puede usar incluyen extractos que tiene su origen en células eucariotas y extractos que tiene su origen en células procariotas. Más específicamente, los ejemplos del extracto celular incluyen extractos de una célula CHO, un reticulocito de conejo, una célula L de ratón, una célula HeLa, germen de trigo, levadura en gemación o *E. coli*. El extracto celular se puede concentrar o diluir para su uso. Como
50 alternativa, el extracto celular se puede usar sin tratamiento adicional. Por lo tanto, el procedimiento de uso del extractor celular no está limitado.

El extracto celular se puede obtener, por ejemplo, por ultrafiltración, diálisis y precipitación en polietilenglicol (PEG).

55 Como alternativa, tal síntesis de proteínas libres de células se puede realizar usando kit disponible en el mercado. Ejemplos del kit incluyen un kit reactivo PROTEIOS™ (Toyobo Co., Ltd.), Sistema TNT™ (Promega), un dispositivo para síntesis PG-Mate™ (Toyobo Co., Ltd.) y RTS (Roche Diagnostics K.K.).

La proteína diana producida o síntesis de proteínas libres de células se puede purificar mediante la selección de medios de forma apropiada tales como cromatografía, como se ha descrito anteriormente.

6. Composición farmacéutica

(i) Composición farmacéutica usada como agente enzimático usado en sustitución enzimática o similares

5 Como se ha descrito anteriormente, la proteína de la presente invención puede conseguir diversos efectos
 10 excelentes con respecto al tratamiento de la enfermedad de Fabry, y por lo tanto se puede usar como un principio
 activo de un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry. Es decir, la presente invención proporciona un agente
 terapéutico para la enfermedad de Fabry que contiene una composición farmacéutica que contiene la proteína de la
 presente invención que se ha descrito anteriormente. Un ejemplo específico preferente de este agente terapéutico
 es un agente enzimático que se puede usar para terapia de sustitución enzimática.

15 La proteína de la presente invención, que funciona como un principio activo en la composición farmacéutica, se
 puede usar en forma de una sal, un hidrato, o similar, si fuera necesario. Además, la proteína de la presente
 invención se puede usar en un estado en el que se realiza una modificación química apropiada en consideración de
 la estabilidad del almacenamiento (en particular, mantenimiento de actividad) como un agente terapéutico. Por lo
 tanto, la forma de la proteína de la presente invención no está limitada.

20 La composición farmacéutica puede contener componentes distintos de la proteína de la presente invención.
 Ejemplos de los otros componentes incluyen diversos componentes farmacéuticos (tales como diversos tipos de
 vehículos farmacéuticamente aceptables) que son necesarios de acuerdo con el uso (la forma de uso) de la
 composición farmacéutica. Los otros componentes se pueden contener de forma apropiada siempre y cuando los
 efectos conseguidos por la proteína de la presente invención y similares no se vean alterados.

25 En el caso en el que la composición farmacéutica se usa como un agente enzimático usado en inducción enzimática,
 la relación de mezcla de la proteína de la presente invención, y los tipos y relaciones de mezcla de otros
 componentes usados se puede determinar de forma apropiada de acuerdo con un procedimiento de preparación de
 un agente enzimático conocido usado en sustitución enzimática (en particular, un agente enzimático usado en
 terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry).

30 El procedimiento para administrar la composición farmacéutica no está limitado. Cuando la composición
 farmacéutica es un agente enzimático usado en sustitución enzimática, por lo general se usa administración
 parenteral tal como goteo intravenoso. En la preparación farmacéutica que se puede usar en diversos
 procedimientos de administración tales como administración parenteral, por ejemplo, se puede seleccionar y usar de
 forma apropiada un excipiente, una carga, un expansor, un aglutinante, un humectante, un agente disgregante, un
 lubricante, un tensioactivo, un dispersante, un tampón, un conservante, un solubilizante, un antiséptico, un agente
 saborizante, un agente balsámico, un agente estabilizante, y un agente de isotonicidad, todos los cuales se usan por
 lo general en la producción de medicamentos, y por lo tanto, la composición farmacéutica se puede preparar
 mediante un procedimiento existente.

35 La forma de la composición farmacéutica no está limitada. Cuando la composición farmacéutica es un agente
 enzimático usado en sustitución enzimática, por lo general se usa una inyección intravenosa (incluyendo infusión por
 goteo). Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede proporcionar en la forma de, por ejemplo, una ampolla
 de una sola dosis o un envase de múltiples dosis.

40 En general, la dosificación de la composición farmacéutica se puede determinar de forma apropiada en un amplio
 intervalo en consideración no solamente de la relación de mezcla del principio activo en la preparación farmacéutica
 sino también la edad y peso corporal del sujeto (paciente) al que se va a administrar la composición farmacéutica, el
 tipo de enfermedad, la patología, la vía de administración, el número de administraciones, el plazo de administración
 y similares. En particular, en el caso en el que el agente terapéutico de la presente invención es un agente
 45 enzimático usado en sustitución enzimática, el número de veces de administración es preferentemente
 de aproximadamente uno cada dos a cuatro semanas. En tal caso, la cantidad de agente enzimático administrado cada
 vez se determina de modo que, por ejemplo, se puede administrar preferentemente de aproximadamente 0,1 a
 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg, y además preferentemente de
 aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg de la proteína o similares (encima recombinante) de la presente invención, que es
 un principio activo, con respecto al peso corporal de un paciente.

50 En la presente invención, la proteína (encima recombinante) de la presente invención, que funciona como un
 principio activo, tiene una estabilidad excelente en sangre y una eficacia de incorporación elevada en una célula de
 un órgano afectado. Por lo tanto, incluso cuando la proteína se usa en una cantidad más pequeña que la que se usa
 en composiciones farmacéuticas conocidas, se puede conseguir el efecto de la sustitución enzimática que es el
 mismo o más fuerte que el conseguido con las composiciones farmacéuticas conocidas. Además, los efectos
 55 secundarios adversos alérgicos de la proteína de la presente invención son insignificantes. Por consiguiente, las
 cargas físicas, mentales, y económicas en pacientes se pueden reducir notablemente.

(ii) Composición farmacéutica usada como agente terapéutico génico

Como se ha descrito anteriormente, el gen de la presente invención codifica una proteína de la presente invención que puede conseguir diversos efectos excelentes con respecto al tratamiento de la enfermedad de Fabry, y por lo tanto se puede usar como un principio activo de un agente terapéutico (agente terapéutico génico) de la enfermedad de Fabry. Es decir, la presente invención proporciona un agente terapéutico génico para la enfermedad de Fabry que contiene, como un principio activo, una composición farmacéutica que contiene el gen de la presente invención que se ha descrito anteriormente.

En el caso en el que la composición farmacéutica se usa como un agente terapéutico génico, se usa un procedimiento de administración directamente por inyección o un procedimiento de administración de un vector en el que se incorpora un ácido nucleico. Ejemplos del vector incluyen un vector de adenovirus, un vector de virus adeno-asociado, un vector de del virus del herpes, un vector de virus vaccinia, un vector de retrovirus y un vector de lentivirus. Mediante el uso de estos vectores de virus, el agente terapéutico génico se puede administrar con eficacia elevada. También se puede usar un kit de transferencia génica disponible en el mercado (por ejemplo, nombre del producto: AdenoExpress, fabricado por Clontech).

Además, en el caso en el que la composición farmacéutica se usa como un agente terapéutico génico, la composición se puede introducir en un retículo endoplasmático fosfolipídico tal como liposoma, y se puede administrar el retículo endoplasmático. De forma específica, un retículo endoplasmático en el que se mantiene un gen de la presente invención se introduce en una célula predeterminada mediante un procedimiento de lipofección. La célula resultante se administra a continuación, por ejemplo, en una vena o una arteria. Como alternativa, tal célula se puede administrar por vía local en un órgano afectado por la enfermedad de Fabry. Por ejemplo, en el caso en el que la composición farmacéutica se administra a un adulto, la dosis es preferentemente de aproximadamente 0,1 µg/kg a 1.000 mg/kg, y más preferentemente, de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg al día con respecto al peso corporal del paciente.

7. Procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Fabry

La presente invención incluye un procedimiento para tratar la enfermedad de Fabry que incluye la administración de la composición farmacéutica a un paciente con Fabry. La presente invención también incluye el uso de la composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Fabry, y el uso de la composición farmacéutica o la proteína de la presente invención para producir medicamentos para tratar la enfermedad de Fabry.

La composición farmacéutica usada en el procedimiento de tratamiento de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene una proteína de la presente invención ("sección 6 (i)" mencionada anteriormente), una composición farmacéutica que contiene un gen de la presente invención ("sección 6 (ii)" mencionada anteriormente), o una combinación de estas composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica no está limitada a las mismas, y se puede seleccionar de forma apropiada en consideración de la patología del paciente, la presencia o ausencia de efectos secundarios adversos, el efecto de administración, y similares. Aquí, cada una de las composiciones farmacéuticas a administrar a un paciente con Fabry se puede administrar en forma de uso del agente enzimático usado en sustitución enzimática o el agente terapéutico génico que se ha descrito anteriormente.

En particular, cuando las composiciones farmacéuticas se usan en combinación tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, la proporción de la cantidad de administración, el número de veces de administración, y el plazo de administración de cada una de las composiciones farmacéuticas se puede determinar de forma apropiada de acuerdo con las condiciones de cada paciente. Por ejemplo, un procedimiento de administración preferente y una cantidad de administración preferente de cada una de las composiciones farmacéuticas y similares son como se han descrito anteriormente.

La presente invención se describirá a continuación de forma más específica usando Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

<Selección de sitios de mutación a introducir en α-N-acetilgalactosaminidasa (α-NAGA)>

Con el fin de diseñar una nueva enzima en la que la especificidad del sustrato de α-NAGA humana se modifica en una especificidad de sustrato similar a la de la α-GAL humana, se determinaron sitios (posiciones de un aminoácido) de mutación a introducir en α-NAGA humana por comparación y estudio usando modelos estructurales tridimensionales de proteínas. El procedimiento y resultados de la determinación se describen a continuación de forma específica.

1. Datos usados

Se usaron los datos de la secuencia de aminoácidos de α-NAGA humana y α-GAL humana que se registran en Swiss-Prot como se describe a continuación. Se usaron dos datos estructurales tridimensionales de la proteína de

α -NAGA de pollo y α -GAL humana que se registran en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) como se describe a continuación.

(1) Datos de la secuencia de aminoácidos
Base de datos usada: Swiss-Prot (<http://tw.expasy.org/uniprot/>)

	nombre de entrada	número de acceso
α -NAGA Humana	NAGAB_HUMAN	P17050
α -GAL Humana	AGAL_HUMAN	P06280

5

(2) Datos estructurales tridimensionales de proteína

Base de datos usada: Banco de Datos de Proteínas (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

	ID de PDB
α -NAGA de Pollo	1KTC (véase `1 a continuación)
α -GAL Humana	1R47 (véase `2 a continuación)

1: Garman SC y col., Structure (Camb), 2002, 10 (3): 425-34.

2: Garman SC y col., J. Mol. Biol., 2004, 19; 337 (2): 319-35.

10 2. Construcción de modelo de estructura tridimensional de α -NAGA humana

La construcción de un modelo de estructura tridimensional de α -NAGA humana se realizó en base a la estructura tridimensional de α -NAGA de pollo usando un procedimiento de modelado de homología, que es un procedimiento existente (véase Sutcliffe MJ y col., Prot. Eng., 1987, 1, 377-84; y Sutcliffe MJ y col., Prot. Eng., 1987, 1, 385-92). La estructura tridimensional de α -NAGA derivada de pollo (el complejo con un sustrato) registrada en PDB se usó como una estructura tridimensional de molde. El grado de emparejamiento (identidad) de aminoácidos entre α -NAGA humana y α -NAGA de pollo es de un 75 %, que satisface la condición (identidad \geq 30 %) para construir un modelo de estructura tridimensional mediante el procedimiento de modelado de homología. La construcción de un modelo de estructura tridimensional mediante el procedimiento de modelado de homología se realizó usando MODELLER, que es un software existente (que se puede usar accediendo a MODELLER en la Web de CBSU (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/modeller.aspx>)). Además, se construyó un modelo de un complejo con un sustrato de α -NAGA humana ajustando un sustrato unido a α -NAGA de pollo en el modelo de estructura tridimensional construido de α -NAGA humana de acuerdo con la posición del sustrato unido a α -NAGA de pollo.

25 3. Comparación de estructuras tridimensionales que contribuyen a la especificidad del sustrato de α -GAL humana y la de α -NAGA humana

La estructura tridimensional de α -NAGA humana es similar a la de α -GAL humana, y los dominios catalíticos tanto de α -NAGA humana como de α -GAL humana tienen una estructura de barril ($\beta\alpha$)₈. Los restos de aminoácidos (restos catalíticos) necesarios para una acción catalítica existente en el sitio activo (incluyendo un sitio catalítico y un sitio de unión al sustrato) se localizan en el lado C-terminal de cada hebra de la estructura de barril ($\beta\alpha$)₈. En las Figs. 1 y 2, se muestran las estructuras tridimensionales de α -NAGA humana y α -GAL humana mediante un modelo de bandas, y los restos de aminoácidos del sitio catalítico y el sitio de unión al sustrato en cada una de las estructuras se muestran con un modelo de barras. Con el fin de comparar las relaciones posicionales entre un sustrato y los restos del sitio catalítico y el sitio de unión al sustrato en términos de estructura tridimensional, la estructura tridimensional de α -NAGA se superpuso en la estructura tridimensional de α -GAL con el procedimiento de superposición desarrollado por Kabsch (véase Kabsch W. y col., Acta Crystallogr; 1976: A32, 827-828; y Kabsch W. y col., Acta Crystallogr; 1978: A34, 922-923). Posteriormente, en el modelo de α -NAGA humana, se seleccionaron restos de aminoácidos relacionados con la unión del sustrato por extracción de restos de aminoácidos adyacentes al sustrato. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La columna derecha de la Tabla 1 muestra 14 restos de aminoácidos seleccionados de α -NAGA humana, y la columna izquierda de la Tabla 1 muestra aminoácidos en α -GAL humana que corresponden posicionalmente a los 14 restos de aminoácidos.

40

Tabla 1

α -GAL Humana	α -NAGA Humana
Trp47	Trp33
Asp92	Asp78
Asp93	Asp79
Tyr134	Tyr119
Cys142	Cys127
Lys168	Lys154
Asp170 (*)	Asp156 (*)
Cys172	Cys158
<u>Glu203</u>	<u>Ser188</u>
<u>Leu206</u>	<u>Ala191</u>
Tyr207	Tyr192
Arg227	Arg213
Asp231 (*)	Asp217 (*)
Asp266	Asp252

(*) resto catalítico

Estos restos de aminoácidos se compararon entre sí superponiendo la estructura tridimensional de α -NAGA humana con la de α -GAL humana para detectar restos que son idénticos entre sí y restos que son diferentes entre sí. Por lo tanto, se eliminaron los puntos comunes y los puntos de diferencia en las secuencias de aminoácidos de α -GAL humana y α -NAGA humana.

4. Puntos en común entre α -GAL humana y α -NAGA humana

Como resultado, se encontró que entre los 14 restos extraídos, 12 restos que incluyen Asp156 y Asp217, que son el sitio catalítico de α -NAGA humana, son idénticos entre α -NAGA y α -GAL. Los átomos en estos restos de aminoácidos en las estructuras tridimensionales superpuestas también se superponen de forma satisfactoria entre sí, y por lo tanto, se confirmó que las posiciones en las estructuras tridimensionales también son muy similares entre sí. La Fig. 2A muestra posiciones de los restos de aminoácidos en las estructuras tridimensionales, siendo los restos de aminoácidos comunes a α -NAGA y α -GAL. La Fig. 2C muestra la interacción entre cada uno de los restos de aminoácidos y un sustrato. Se cree que todos estos restos están relacionados con el sustrato mediante un enlace de hidrógeno o un enlace hidrófobo. Obsérvese que, en la Fig. 2C, los aminoácidos que no están subrayados son aminoácidos comunes a α -NAGA y α -GAL, y los aminoácidos subrayados son aminoácidos diferentes entre α -NAGA y α -GAL.

5. Puntos de diferencia entre α -GAL humana y α -NAGA humana

Hay dos restos que son diferentes entre α -GAL humana y α -NAGA humana (véase la Fig. 2C). En α -GAL, los restos de aminoácidos que corresponden a Ser188 y Ala191 de α -NAGA eran Glu203 y Leu206, respectivamente. La Fig. 2B muestra posiciones de los restos de aminoácidos que son diferentes entre α -NAGA y α -GAL en la estructura tridimensional.

Tal como se muestra en la Fig. 2C, en α -GAL, un "grupo -OH (un grupo hidroxilo)" está unido al átomo de carbono en la posición 2 del azúcar (anillos de seis miembros) en el sustrato de α -GAL, y en α -NAGA, un "grupo -NH-C(CH₃)=O (un grupo N-acetilo)" está unido al átomo de carbono en la posición 2 del azúcar (anillos de seis miembros) en el sustrato de α -NAGA.

Se supone que, en α -NAGA, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de Ser188 está unido al átomo de oxígeno del grupo N-acetilo en el sustrato por un enlace de hidrógeno, y el grupo metilo de la cadena lateral de Ala191 está unido al grupo metilo del grupo N-acetilo en el sustrato hidrófobo. En base a estas suposiciones, se cree que Ser188 y Ala191 de α -NAGA son restos importantes para el reconocimiento del grupo N-acetilo en el sustrato.

Por el contrario, se ha informado que, en α -GAL humana, Glu203 y Leu206, que son diferentes a los restos correspondientes de α -NAGA, son importantes para reconocer un sustrato de α -GAL (Garman SC y col., J. Mol. Biol., 2004, 19; 337 (2): 319-35). Además, se ha aclarado que, a partir de análisis de estructura cristalina por rayos X, el grupo carboxilo de la cadena lateral de Glu203 de α -GAL forma un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo del sustrato. Además, Leu206 de α -GAL es un resto que tiene una cadena lateral voluminosa y ocupa una parte del espacio del sitio de unión al sustrato de α -GAL. Por otro lado, el grupo hidroxilo (en la posición 2) en el sustrato de α -GAL es un grupo funcional que no es voluminoso. Es evidente que el grupo hidroxilo es más pequeño, por ejemplo, que el grupo N-acetilo en el sustrato de α -NAGA. Por consiguiente, se cree que, en la unión entre α -GAL y el sustrato, el tamaño del espacio del sitio de unión al sustrato de α -GAL es adecuado para el tamaño del grupo

hidroxilo en el sustrato. En consecuencia, se pensó que, en α -GAL, dos restos de Glu203 y Leu206 contribuyen en gran medida a la especificidad del sustrato.

6. Verificación de la especificidad del sustrato mediante modelos de estructura tridimensional

5 Además, con el fin de verificar la interacción de α -NAGA con un sustrato y la interacción de α -GAL con un sustrato, se construyeron modelos en los que los sustratos se intercambiaron entre sí, es decir, (i) un modelo complejo que combina el sustrato de α -GAL con α -NAGA, y (ii) un modelo complejo que combina el sustrato de α -NAGA con α -GAL, para examinar la influencia de los dos restos que son diferentes entre α -NAGA y α -GAL en los sustratos.

10 De acuerdo con los resultados, en el modelo complejo en el que el sustrato de α -GAL se ajustó en el modelo de estructura de α -NAGA, la cadena lateral de Ser188 de α -NAGA no interactuaba con el grupo hidroxilo en la posición 2 del sustrato de α -GAL. Además, se formó un espacio de eliminación entre Ala191 y el sustrato de α -GAL, y por lo tanto, no se observó interacción con el grupo hidroxilo. Por otro lado, en el modelo complejo en el que el sustrato de α -NAGA se ajustó en la estructura de α -GAL, se confirmó que el grupo N-acetilo en la posición 2 del sustrato de α -NAGA se une frente a Glu203 y Leu206 de α -GAL. En consecuencia, se predijo que la unión del sustrato estaba bloqueada por la presencia de estos dos restos.

15 Estos resultados predichos eran compatibles con los resultados experimentales que se han descrito anteriormente. Por lo tanto, se mantiene que Ser188 y Ala191 of α -NAGA y Glu203 y Leu206 de α -GAL son importantes para la especificidad del sustrato de α -NAGA y α -GAL, respectivamente.

7. Sustitución de resto de aminoácido para la modificación de especificidad del sustrato de α -NAGA humana a especificidad del sustrato similar a la de α -GAL humana

20 Tal como se ha descrito anteriormente, entre α -GAL humana y α -NAGA humana, las secuencias de aminoácidos son completamente idénticas incluyendo el sitio catalítico excepto para los dos restos que reconocen el grupo funcional unido al átomo de carbono en la posición 2 del azúcar (anillo de seis miembros) en cada uno de los sustratos. Esto indica que es posible mantener la actividad catalítica tal como es antes de la sustitución y cambiar solamente la especificidad del sustrato de α -NAGA específico a α -GAL específico o viceversa por sustitución de estos dos restos que contribuyen en gran medida a la especificidad del sustrato. Con el fin de cambiar la especificidad del sustrato de α -NAGA humana y expresar la actividad de α -GAL por α -NAGA, es importante una sustitución de aminoácidos en estas dos posiciones. Mediante la sustitución de Ser188 de α -NAGA humana con Glu, el reconocimiento mediante un enlace de hidrógeno con el grupo N-acetilo del sustrato de α -NAGA se puede retirar, y se puede introducir una interacción mediante un enlace de hidrógeno a un grupo hidroxilo del sustrato de α -GAL. Además, por sustitución de Ala191 de α -NAGA humana con Leu, el espacio en el que se va a incorporar un grupo N-acetilo en la unión de un sustrato de α -NAGA está ocupado con la cadena lateral voluminosa de Leu, y por lo tanto, la unión del sustrato se bloquea por este impedimento estérico. Se predijo que, en α -NAGA, se podría retirar el reconocimiento original de un sustrato de α -NAGA y se podría proporcionar una especificidad elevada con un sustrato de α -GAL mediante los efectos mencionados anteriormente.

35 8. Evaluación del modelo de sustitución de aminoácidos de α -NAGA humana

40 En el caso en el que Ser188 de α -NAGA se sustituye con Glu y Ala191 de la misma se sustituye con Leu, con el fin de confirmar el efecto de la estructura tridimensional periférica, se construyó un modelo de α -NAGA (S188E/A191 I de α -NAGA) mutante, y la estructura tridimensional del modelo de α -NAGA mutante se comparó con la de α -NAGA de tipo silvestre. Como resultado, se confirmó que las sustituciones anteriores no afectaban a la estructura tridimensional formada por restos de aminoácidos periféricos. Por consiguiente, se supuso que en la α -NAGA mutante en la que estas mutaciones se introdujeron en α -NAGA humana puede existir sin problemas en términos de la estructura tridimensional.

45 Además, se construyó un modelo complejo en el que un sustrato de α -GAL se ajustó en la estructura de la α -NAGA mutante. Como resultado, se confirmó que la cadena lateral de Glu188 de la α -NAGA mutante existe dentro de una distancia en la que la cadena lateral de Glu188 puede formar un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo en la posición 2 del sustrato (véase la Fig. 6(b)). Además, en un modelo complejo en el que un sustrato de α -NAGA se ajusta en la estructura de la α -NAGA mutante, se supuso que el grupo N-acetilo en la posición 2 del sustrato causa un impedimento estérico con la cadena lateral de Leu191, y por lo tanto, el modelo complejo tiene una estructura a la que no se puede unir el sustrato.

50 De acuerdo con los resultados anteriores, se esperaba que la α -NAGA mutante perdiera la especificidad hacia el sustrato original de α -NAGA adquiriera una especificidad elevada hacia el sustrato de α -GAL (es decir, la α -NAGA mutante pierde básicamente la actividad de α -NAGA y adquiere la actividad de α -GAL).

La estructura de la α -NAGA mutante construida (S188E/A191 I de α -NAGA) se muestra en la Fig. 7.

9. Otros candidatos de sustitución de aminoácidos de α -NAGA

5 La modificación que se ha descrito anteriormente de la especificidad del sustrato se consigue con dos acciones, es decir, una inhibición de la unión debida a un impedimento estérico a un sustrato de α -NAGA y la formación de un enlace de hidrógeno con un sustrato de α -GAL. Además, con respecto a las sustituciones de aminoácidos que se han descrito anteriormente, se estudió la presencia o ausencia de la posibilidad de sustitución a otros aminoácidos.

En primer lugar, para la acción de la inhibición de unión mencionada anteriormente, se realizó una sustitución con Leu, que es el mismo aminoácido que en la α -GAL, como un primer candidato. Además, como una sustitución que consiguió la misma acción, también era posible una sustitución con Val, Ile, Phe, o Met, que es un resto de aminoácido hidrófobo.

10 Además, para la acción de la formación de un enlace de hidrógeno mencionada anteriormente, se realizó una sustitución con Glu, que es el mismo aminoácido que en la α -GAL, como un primer candidato. Además, como una sustitución que consiguió la misma acción, también era posible una sustitución con Asp, que también tiene un grupo carboxilo como Glu.

15 10. Secuencia de aminoácidos de α -NAGA humana de tipo silvestre y secuencia de aminoácidos de α -NAGA modificada

La secuencia de aminoácidos de α -NAGA humana de tipo silvestre se muestra en la "secuencia N° 2" y la secuencia de aminoácidos de la α -NAGA mutante (S188E/A191 I de α -NAGA) se muestra en la "secuencia N° 4".

Ejemplo 2

1. Preparación de vector de retrovirus de α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA)

20 Un clon de ADNc de α -NAGA (N-acetilgalactosaminidasa de *Homo sapiens*, alfa, ARN-m, Acceso en Gene Bank: BC000095, IMAGE: 3504221) se adquirió en Open Biosystems. La secuencia de codificación de α -NAGA se amplificó por PCR con una composición de mezcla de reacción y en una condición de reacción y se describe a continuación, usando el ADNc de α -NAGA adquirido como un molde con cebadores que se describen a continuación y KOD-plus-polimerasa (Toyobo Co., Ltd.).

25 Cebador 5' de NAGA:

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (secuencia N° 5)

Cebador 3' de NAGA:

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3' (secuencia N° 6)

<Composición de la mezcla de reacción>

30	Molde (10 ng/ μ l)	1 μ l
	Tampón 10 x	10 μ l
	dNTP 2,5 mM:	10 μ l
	MgSO ₄ 25 mM:	4 μ l
	KOD-plus-polimerasa:	1 μ l
35	Cebador 5' de NAGA (10 μ M):	1 μ l
	Cebador NAGA-3' (10 μ M):	1 μ l
	Aguá esterilizada	68 μ l
	<u>Total:</u>	<u>100 μl</u>

<Condición de reacción>

40 La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. A continuación, un ciclo que consiste en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y extensión: 68 °C (90 segundos)" se realizó un total de 35 veces y la mezcla de reacción se enfrió a continuación 4 °C.

El fragmento de ADN de α -NAGA preparado se purificó por electroforesis en gel de agarosa.

45 Un fragmento de ADN de α -NAGA cuyos extremos se fosforilaron con polinucleótido quinasa T4 (NEB) se ligó con un vector pCX4Neo de retrovirus preparado por escisión con una enzima de restricción Hpa I (extremo Romo) (NEB) y a continuación se desfosforiló usando Fosfatasa Alcalina, de Intestino de Ternero (NEB) (Tsuyoshi Akagi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100, 13567-13572 (2003)). pCX4Neo de α -NAGA obtenido por la reacción de ligación se transformó en células competentes para DH5 α (Invitrogen Corporation) y se sembró en una placa de LB que contiene ampicilina. A continuación se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina.

50

ES 2 547 726 T3

Cada una de las colonias resistentes resultantes se suspendió en un medio de LB. Se realizó una PCR en las colonias con una composición de mezcla de reacción y en una condición de reacción que se describe a continuación, usando la suspensión de bacterias como un molde con los cebadores que siguen a continuación y una Mezcla Maestra para PCR (fabricada por Promega).

5 Cebador NAGA-5':

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (secuencia N° 5)

Cebador pCX4-3'

5'-AAACCGTTGCTAGCTTAAGTT-3' (secuencia N° 7)

<Composición de la mezcla de reacción>

10	Molde (1 colonia/10 µl):	1 µl
	Mezcla Maestra para PCR:	10 µl
	Cebador NAGA-5' (10 µM):	0,5 µl
	Cebador pCX4-3' (10 µM):	0,5 µl
	<u>Agua esterilizada:</u>	<u>8 µl</u>
15	Total:	20 µl

<Condición de reacción>

La mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante dos minutos. A continuación, un ciclo que consiste en "desnaturalización y disociación térmica: 95 °C (30 segundos) → hibridación: 55 °C (30 segundos) → síntesis y extensión: 72 °C (90 segundos)" se realizó un total de 40 veces, y la mezcla de reacción se enfrió a continuación 4 °C.

Se seleccionó un clon en el que se incorporó el ADN de α-NAGA en la dirección directa a partir del producto amplificado resultante. Más específicamente, se seleccionó un molde de *E. coli* en el que se obtuvo un fragmento amplificado de 1,4 kb como un clon en el que se incorporó el ADN de α-NAGA en la dirección directa. El clon de *E. Coli* seleccionado de pCX4Neo de α-NAGA se cultivó para obtener una gran cantidad, es decir, 1 mg o más (1 mg/ml), de ADN plásmido de pCX4Neo de α-NAGA.

2. Preparación de mutante de α-NAGA

Con respecto a S188E/A191I de α-NAGA, que es un mutante de α-NAGA, en primer lugar, se preparó S188E de α-NAGA, y a continuación se preparó S188E/A191I de α-NAGA usando S188E de α-NAGA. Se preparó S188E/A191I de α-NAGA con referencia al manual de instrucciones del Sistema GeneTailor de Mutagénesis Dirigida al Sitio (Invitrogen Corporation), si fuera necesario.

En primer lugar, se metiló pCX4Neo de α-NAGA (100 ng) con ADN Metilasa (4 U). Se preparó S188E de α-NAGA por amplificación del ADN con una composición de mezcla de reacción y en una condición de reacción que se describe a continuación, usando el pCX4Neo de α-NAGA metilado como un molde con un Cebador S188E-GT-5' de NAGA (una porción en la que se introdujo una mutación sin sentido de S188E que se presenta subrayada) que se diseñó de modo que se introdujo la mutación sin sentido (S188E) en la que la serina en la posición 188 (S) se sustituyó con ácido glutámico (E), un Cebador S188E-GT-3' de NAGA, y KOD-plus-polimerasa. Cebador S188E-GT-5' de NAGA:

5'-CCCATCGCCTTCTCCTGCGAGTGGCCAGCCTATGA-3' (secuencia N° 8)

Cebador S188E-GT-3' de NAGA:

40 5'-GCAGGAGAAGGCGATGGGGCGGCCTGTG-3' (secuencia N° 9)

<Composición de la mezcla de reacción>

45	Molde (6 ng/ µl):	1 µl
	Tampón 10 x:	5 µl
	dNTP 2,5 mM:	5 µl
	MgSO ₄ 25 mM:	2 µl
	KOD-plus-polimerasa:	1 µl
	Cebador S188E-GT-5' de NAGA (10 µM):	1 µl
	Cebador S188E-GT-3' de NAGA (10 µM):	1 µl
	<u>Agua esterilizada:</u>	<u>34 µl</u>
50	Total:	50 µl

<Condición de reacción>

La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. A continuación, un ciclo que consiste en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y extensión: 68 °C (8 minutos)" se realizó un total de 35 veces, y la mezcla de reacción se enfrió a continuación 4 °C.

5 El fragmento de ADN amplificado (S188E pCX4Neo de α -NAGA) se transformó en células competentes para DH5a-T1 (Invitrogen Corporation) que tiene endonucleasa de McrBC que escinde el ADN metilado. Dado que pCX4Neo de α -NAGA, que se usó como un molde, se había metilado, pCX4Neo de α -NAGA se escindió mediante endonucleasa de McrBC y no pudo formar colonias. Por otro lado, dado que un plásmido que tiene una mutación S188E no se había metilado, el plásmido no se escindió y pudo formar colonias. Las varias colonias formadas a continuación se cultivaron, y el ADN de plásmido se extrajo a continuación y se purificó. La introducción de la mutación S188E se confirmó mediante un procedimiento conocido para determinar una secuencia de bases usando un secuenciador.

10 A continuación, se preparó un mutante de S188E/A191 I de α -NAGA por amplificación mediante PCR con una composición de mezcla de reacción y en una condición de reacción que se describe a continuación, usando el S188E pCX4Neo de α -NAGA purificado como un molde con un Cebador A191 I-GT-5' de NAGA (una porción en la que se introdujo una mutación sin sentido de A191 I que se presenta subrayada) que se diseñó de modo que se introdujo la mutación sin sentido (A191 I) en la que la alanina en la posición 191 (A) se sustituyó con leucina (L), un Cebador A191 I-GT-3' de NAGA, y KOD-plus-polimerasa.

Cebador A191 I-GT-5' de NAGA:

5'-TTCTCCTGCGAGTGGCCACTCTATGAAGCGGCCT-3' (secuencia N° 10)

20 Cebador A191 I-GT-3' de NAGA:

5'-TGGCCACTCGCAGGAGAAGGCGATGGGG-3' (secuencia N° 11)

<Composición de la mezcla de reacción>

25	Molde (6 ng/ μ l):	1 μ l
	Tampón 10 x:	5 μ l
	dNTP 2,5 mM:	5 μ l
	MgSO ₄ 25 mM:	2 μ l
	KOD-plus-polimerasa:	1 μ l
	Cebador A191 I-GT-5' de NAGA (10 μ M):	1 μ l
	Cebador A191 I-GT-3' de NAGA (10 μ M):	1 μ l
30	<u>Agua esterilizada:</u>	<u>34 μl</u>
	Total:	50 μ l

<Condición de reacción>

35 La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. A continuación, un ciclo que consiste en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y extensión: 68 °C (8 minutos)" se realizó un total de 35 veces, y la mezcla de reacción se enfrió a continuación 4 °C.

El fragmento de ADN amplificado (pCX4Neo S188E/A191 I de α -NAGA) se transformó en células competentes para DH5a-T1. A continuación, el ADN plásmido se extrajo y se purificó. La introducción de la mutación de A191 I además de la mutación de S188E se confirmó mediante un procedimiento conocido para determinar usando una secuencia de bases usando un secuenciador.

40 3. Preparación de retrovirus recombinantes que expresan α -GAL, α -NAGA, y S188E/A191 I de α -NAGA

Se adquirieron células de empaquetamiento de retrovirus (N° de Lote de células Phoenix Ampho: HEK293 Riñón Embrionario Humano Transformado con F-14727) en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Coligan, J. E. y col., Curr. Protocols Immunol., Supl. 31, 10.28.1-10.28.17 (1999)). Las células Phoenix Ampho se cultivaron en un Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM) (Alta glucosa) + solución de cultivo de suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS) a 37 °C y a una concentración de CO₂ de un 5 %.

50 Con el fin de preparar retrovirus recombinantes, se transfectó vector de retrovirus α -GAL pCX4Neo-, α -NAGA pCX4Neo-, o S188E/A191 I pCX4Neo de α -NAGA en las células Phoenix Ampho. En esa transfección, se añadieron 2 ml de solución de cultivo OPTI-MEM (Invitrogen Corporation) que contenía 1 μ g de vector de retrovirus, 1 μ g de pCLAMP (RK Naviaux y col., J. Virol., 70, 5701-5705 (1996)), y 18 μ l de Dofect-GT1 (reactivo de transfección; Dojindo Laboratories) a las células Phoenix Ampho (5 x 10⁵/placa de 60 mm), y la mezcla se incubó a 37 °C durante cuatro horas. Posteriormente, el medio de cultivo se cambió a un medio de cultivo normal, y la mezcla resultante se cultivó durante 48 horas. Después del cultivo, el sobrenadante se recogió y se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos. Los retrovirus recombinantes contenidos en el sobrenadante se distribuyeron y se almacenaron a -80 °C.

4. Establecimiento de cepa celular que expresa de forma estable fibroblastos derivados de paciente con Fabry (F377) que expresa α -GAL-, α -NAGA-, o S188E/A191 I de α -NAGA

Cada uno de los retrovirus recombinantes que expresan α -GAL, α -NAGA, y S188E/A191 I de α -NAGA preparados en la sección 3 mencionada anteriormente se infectaron en fibroblastos humanos (células F377) derivados de un paciente con Fabry para establecer células de expresión de forma estable. Específicamente, el establecimiento se consiguió mediante la realización de las siguientes etapas (i) a (v):

(i) Se sembraron 1×10^5 células F377 en una placa de 60 mm y se cultivaron a 37 °C durante una noche.

(ii) Se añadió Polybrene (Sigma H-9266, Bromuro de Hexadimetrina) al medio de cultivo de modo que la concentración final de Polybrene era de 2 μ g/ml, y el cultivo se realizó a 37 °C durante 30 minutos.

(iii) Se retiró el medio de cultivo. Posteriormente, se añadió 1 ml de una solución de virus y se adsorbió a 37 °C durante 60 minutos.

(iv) Se retiró la solución de virus. Posteriormente, se añadieron 5 ml de un medio de cultivo y el cultivo se realizó durante una noche.

(v) El cultivo se realizó con un medio selectivo en el que se añadió G418 (250 μ g/ml) a un medio de cultivo. Por lo tanto, se establecieron células F377 resistentes a G418. El medio selectivo se cambió una vez cada tres días durante 14 días o más. Se confirmó si la célula establecida expresaba o no la proteína diana por la actividad enzimática y un procedimiento de transferencia de Western (sección 5 a continuación).

5. Confirmación de expresión de proteína diana mediante procedimiento de transferencia de Western

Con el fin de examinar si las células F377 que expresan α -NAGA o S188E/A191 I de α -NAGA o no que se establecían usando retrovirus expresaban la proteína diana, se realizó transferencia de Western. Se preparó un anticuerpo policlonal anti- α -NAGA obtenido con un procedimiento conocido de preparación de un anticuerpo como un anticuerpo usado en esta transferencia de Western.

Se prepararon muestras para la transferencia de Western como sigue a continuación. Las células F377 que expresan α -NAGA o S188E/A191 I de α -NAGA cultivadas en una placa de 60 mm se recuperaron temporalmente, y se volvieron a suspender en un tampón de lisis de Triton-X (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, y Triton-X al 1 %). La suspensión se sometió a continuación a un tratamiento ultrasónico, y se centrifugó a 12.000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se recuperó y se usó como una muestra. Se realizó SDS-PAGE como sigue a continuación. Se midió la concentración de la proteína de la muestra. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente de 2 x tampón de muestra de SDS (Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 30 % y azul de bromofenol al 0,2 % (BPB)) a la muestra que contenía 5 μ g de la proteína. La mezcla se hirvió durante cinco minutos y la muestra resultante se aplicó a continuación a un gel de un 4 % a un 20 % (PAG mini: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Se realizó electroforesis a una corriente constante de 30 mA durante dos horas.

Después de la electroforesis, con el fin de transferir la proteína a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Immobilon-P, MILLIPORE), el gel se sumergió en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM a pH 8,3, glicano 192 mM y metanol al 20 %) durante 20 minutos y se colocó en una membrana que PVDF equilibrada con el tampón de transferencia. La transferencia se realizó a continuación usando una unidad de transferencia semiseca TE 70 de Hoefer (Amersham Biosciences) a una corriente constante de 60 mA durante una hora.

Después de la finalización de la transferencia, la membrana se bloqueó con un tampón de bloqueo (leche desnatada al 5 % en Solución Salina Tamponada con Tris (TBS) (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 y NaCl 100 mM)) durante 30 minutos. A continuación se añadió a la misma un anticuerpo policlonal anti-NAGA (anticuerpo primario) diluido 500 veces con el tampón de bloqueo, y se realizó incubación a 4 °C durante una noche.

La membrana obtenida después de la incubación con el anticuerpo primario se lavó con TBS durante cinco minutos. Este lavado se realizó tres veces. A continuación se añadió a la misma un anticuerpo marcado con HRP de IgG anti-conejo (anticuerpo secundario; Amersham Biosciences) diluido 5.000 veces con el tampón de bloqueo, y se realizó una incubación a temperatura ambiente durante una hora.

La membrana obtenida después de la incubación con el anticuerpo secundario se lavó con TBS durante cinco minutos. Este lavado se realizó tres veces. Se añadió reactivo de coloración de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Nacalai Tesque, Inc.) a la misma, y la reacción se realizó a temperatura ambiente durante dos minutos. Posteriormente, la membrana se reveló poniéndola en contacto con ECL Hyperfilm™ en una habitación oscura durante un minuto.

De acuerdo con los resultados, se confirmó que las células F377 que expresan α -NAGA establecidas y células F377 que expresan S188E/A191 I de α -NAGA expresaban α -NAGA de tipo silvestre con un peso molecular de aproximadamente 45 kD y un α -NAGA mutante (S188E/A191 I de α -NAGA), respectivamente.

Ejemplo 3

<Transición de actividad enzimática de mutante de α -NAGA >

El hecho de que el α -NAGA mutante (S188E/A191 I de α -NAGA) había adquirido la especificidad del sustrato de α -GAL se confirmó con el siguiente procedimiento.

5 En primer lugar, se introdujo un gen de α -NAGA de tipo silvestre o un gen de S188E/A191 I de α -NAGA en fibroblastos (F377) derivados de un paciente con Fabry, y se midieron la actividad de α -GAL y la actividad de α -NAGA. Se usaron células F377 como un control negativo de la actividad de α -GAL, y se usaron fibroblastos (F652) derivados de un paciente con enfermedad de Kanzaki (deficiencia de α -NAGA) como un control negativo de la actividad de α -NAGA. Además, se usaron fibroblastos (F592) derivados de un sujeto normal como un control positivo de la actividad endógena de α -GAL y la actividad de α -NAGA.

10 Las células cultivadas en una placa de 60 mm se recuperaron y se volvieron a suspender en agua Milli-Q. La suspensión se sometió a continuación a un tratamiento ultrasónico para preparar un homogenado celular. Este homogenado se usó como una muestra de una solución enzimática. La actividad enzimática se determinó usando un sustrato sintético formado por un derivado de 4-metilumbeliferona (4-MU), que es un sustrato fluorogénico, midiendo la cantidad de 4-MU liberado por 1 ml de la solución enzimática por hora como una intensidad de la fluorescencia. De forma más específica, se usó 4-MU- α -D-galactósido (4-MU- α -GAL; Calbiochem, CA) como el sustrato sintético de α -GAL. Se usó 4-MU- α -N-acetil-D-galactosaminida (4-MU- α -NAGA; Moscerdam Substrates, Rotterdam) como el sustrato sintético de α -NAGA. En la medida de la actividad de α -GAL, como un inhibidor de α -NAGA, que reacciona con 4-MU- α -GAL al mismo tiempo, se añadió N-acetil-D-galactosamina (Sigma, MO) a la solución de sustrato con antelación de modo que la concentración final de la misma era 117 mM.

15 Se añadió un tampón de McIlvain (ácido cítrico/ácido fosfórico, pH 4,6, 60 μ l) que contenía 4-MU- α -GAL 5 mM o un tampón de McIlvain (ácido cítrico/ácido fosfórico, pH 4,7, 40 μ l) que contenía 4-MU- α -NAGA 1 mM a una solución enzimática (10 μ l) y se mezcló, y se realizó una reacción a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de un tampón de Glicina 0,2 M (pH 10,7, 700 μ l). Con el fin de detectar la cantidad de 4-MU liberado, se midió la cantidad de 4-MU a una longitud de onda de excitación de 365 nm y a una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm usando un espectrofluorofotómetro. La actividad específica α -GAL o α -NAGA se determinó dividiendo entre la concentración de proteína (mg/ml) de la solución enzimática. La actividad específica se definió como una actividad enzimática en células.

25 De acuerdo con los resultados de la medida de la actividad enzimática, S188E/A191 I de α -NAGA, que se había sometido a una doble mutación de S188E/A191 I, presentaba actividad de α -GAL elevada. Este resultado mostraba que S188E/A191 I de α -NAGA adquiría la especificidad del sustrato de α -GAL.

30 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Transición de actividad enzimática de mutante de α -NAGA

	transfección	mutación	Actividad de α -GAL	Actividad de α -NAGA
F592 Control normal	-	-	112	252
F652 Enfermedad de Kanzaki	-	-	40	0
F377 Enfermedad de Fabry	-	-	2	233
	α -NAGA	tipo silvestre	13	1295
	α -NAGA	S188E/A191L	552	105

(nmol/h/mg de proteína)

Ejemplo 4

<Estabilidad de mutante de α -NAGA en sangre (en plasma)>

La estabilidad del mutante de α -NAGA en sangre (en plasma) se confirmó con un procedimiento que sigue a continuación.

40 En primer lugar, se preparó una solución enzimática de S188E/A191 I de α -NAGA como en el Ejemplo 3. Además, como un control, se preparó otra solución enzimática de la misma forma que la solución enzimática anterior usando células preparadas por introducción de un gen de α -GAL de tipo silvestre en F377. Se añadió plasma (50 μ l) de un sujeto normal a cada una de las soluciones esquemáticas (50 μ l) y se mezcló. A continuación comenzó una reacción a 37 °C, y se tomaron muestras de 10 μ l de la mezcla de reacción a intervalos para medir la actividad de α -GAL. La actividad enzimática se midió como en el Ejemplo 3. La actividad de α -GAL de una muestra de la que se tomó una

muestra en el tiempo de mezcla de la solución enzimática con plasma se definió como el patrón (100 %), y se representó una disminución de la actividad enzimática con el tiempo como un porcentaje.

De acuerdo con los resultados, S188E/A191I de α -NAGA presentaba una capacidad de mantenimiento de la actividad de α -GAL con el tiempo en sangre (en plasma) excelente, en comparación con α -GAL de tipo silvestre. Este resultado mostraba que S188E/A191I de α -NAGA tenía una estabilidad elevada en sangre.

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Además, se muestra representaciones de los resultados en la Fig. 5.

Tabla 3

Ensayos de estabilidad de mutante de α -NAGA en sangre

Tiempo de incubación (h)	Actividad relativa de α -GAL (%)	
	α -GAL (tipo silvestre)	α -NAGA (S188E/A191L)
0	100	100
0,25	23	75
0,5	7	60
1	2	42
2	0	21
3	0	13

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa y que es ventajosa porque no se muestra efecto secundario adverso alérgico, la estabilidad en sangre es elevada, y la proteína se puede incorporar fácilmente en una célula de un órgano afectado. Esta proteína es muy útil como nueva enzima altamente funcional excelente para la terapia para la enfermedad de Fabry.

Además, la presente invención proporciona un gen que puede codificar la proteína mencionada anteriormente, un vector recombinante que contiene el gen, un transformante o transductor que contiene el vector recombinante, y un procedimiento de producción de la proteína. Además, se puede proporcionar un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry que contiene la proteína.

TEXTO LIBRE DE LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia N° 3: ADN recombinante
 Secuencia N° 4: proteína recombinante
 Secuencia N° 5: ADN sintético
 Secuencia N° 6: ADN sintético
 Secuencia N° 7: ADN sintético
 Secuencia N° 8: ADN sintético
 Secuencia N° 9: ADN sintético
 Secuencia N° 10: ADN sintético
 Secuencia N° 11: ADN sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research Seiichi, Aikawa Fumiko, Aikawa

<120> Una enzima nueva y altamente funcional obtenida por conversión de una especificidad de sustrato de una enzima

<130> P05-0213

<150> JP 2005-333660

<151> 18-11-2005

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1236

<212> ADN

5

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(1236)

<400> 1

atg ctg ctg aag aca gtg ctc ttg ctg gga cat gtg gcc cag gtg ctg 48
 Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
 1 5 10 15

atg ctg gac aat ggg ctc ctg cag aca cca ccc atg ggc tgg ctg gcc 96
 Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
 20 25 30

tgg gaa cgc ttc cgc tgc aac att aac tgt gat gag gac cca aag aac 144
 Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
 35 40 45

tgc ata agt gaa cag ctc ttc atg gag atg gct gac cgg atg gca cag 192
 Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
 50 55 60

gat gga tgg cgg gac atg ggc tac aca tac cta aac att gat gac tgc 240
 Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
 65 70 75 80

10

tgg atc ggc ggt cgc gat gcc agt ggc cgc ctg atg cca gat ccc aag 288

Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
 85 90 95
 cgc ttc cct cat ggc att cct ttc ctg gct gac tac gtt cac tcc ctg 336
 Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
 100 105 110
 ggc ctg aag ttg ggt atc tac gcg gac atg ggc aac ttc acc tgc atg 384
 Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
 115 120 125
 ggt tac cca ggc acc aca ctg gac aag gtg gtc cag gat gct cag acc 432
 Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
 130 135 140
 ttc gcc gag tgg aag gta gac atg ctc aag ctg gat ggc tgc ttc tcc 480
 Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
 145 150 155 160
 acc ccc gag gag cgg gcc cag ggg tac ccc aag atg gct gct gcc ctg 528
 Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
 165 170 175
 aat gcc aca ggc cgc ccc atc gcc ttc tcc tgc agc tgg cca gcc tat 576
 Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr
 180 185 190
 gaa ggc ggc ctc ccc cca agg gtg aac tac agt ctg ctg gcg gac atc 624
 Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
 195 200 205
 tgc aac ctc tgg cgt aac tat gat gac atc cag gac tcc tgg tgg agc 672
 Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
 210 215 220
 gtg ctc tcc atc ctg aat tgg ttc gtg gag cac cag gac ata ctg cag 720
 Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
 225 230 235 240
 cca gtg gcc ggc cct ggg cac tgg aat gac cct gac atg ctg ctc att 768
 Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
 245 250 255
 ggg aac ttt ggt ctc agc tta gag caa tcc cgg gcc cag atg gcc ctg 816
 Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu
 260 265 270
 tgg acg gtg ctg gca gcc ccc ctc itg atg tcc aca gac ctg cgt acc 864
 Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr
 275 280 285

atc tcc gcc cag aac atg gac att ctg cag aat cca ctc atg atc aaa 912
 Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile Lys
 290 295 300

atc aac cag gat ccc tta ggc atc cag gga cgc agg att cac aag gaa 960
 Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu
 305 310 315 320

aaa tct ctc atc gaa gtg tac atg cgg cct ctg tcc aac aag gct agc 1008
 Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
 325 330 335

gcc tta gtc ttc ttc agc tgc agg acc gat atg cct tat cgc tac cac 1056
 Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
 340 345 350

tcc tcc ctt ggc cag ctg aac ttc acc ggg tct gtg ata tat gag gcc 1104
 Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
 355 360 365

cag gac gtc tac tca ggt gac atc atc agt ggc ctc cga gat gaa acc 1152
 Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
 370 375 380

aac ttc aca gtg atc atc aac cct tca ggg gta gtg atg tgg tac ctg 1200
 Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
 385 390 395 400

tat ccc atc aag aac ctg gag atg tcc cag cag tga 1236
 Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
 405 410

<210> 2
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
 1 5 10 15

Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
 20 25 30

Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn

35	40	45
Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln		
50	55	60
Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys		
65	70	75
Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys		
85	90	95
Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu		
100	105	110
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met		
115	120	125
Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr		
130	135	140
Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser		
145	150	155
Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu		
165	170	175
Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr		
180	185	190
Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile		
195	200	205
Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser		
210	215	220
Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln		
225	230	235
		240

Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
245 250 255

Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu
260 265 270

Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr
275 280 285

Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile Lys
290 295 300

Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
325 330 335

Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
340 345 350

Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
355 360 365

Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
370 375 380

Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
385 390 395 400

Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
405 410

<210> 3

<211> 1236

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> ADN recombinante

<220>

<221> CDS

<222> (l)..(1236)

5

<400> 3

atg ctg ctg aag aca gtg ctc ttg ctg gga cat gtg gcc cag gtg ctg 48
 Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
 1 5 10 15

atg ctg gac aat ggg ctc ctg cag aca cca ccc atg ggc tgg ctg gcc 96
 Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
 20 25 30

tgg gaa cgc ttc cgc tgc aac att aac tgt gat gag gac cca aag aac 144
 Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
 35 40 45

tgc ata agt gaa cag ctc ttc atg gag atg gct gac cgg atg gca cag 192
 Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
 50 55 60

gat gga tgg cgg gac atg ggc tac aca tac cta aac att gat gac tgc 240
 Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
 65 70 75 80

tgg atc ggc ggt cgc gat gcc agt ggc cgc ctg atg cca gat ccc aag 288
 Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
 85 90 95

cgc ttc cct cat ggc att cct ttc ctg gct gac tac gtt cac tcc ctg 336
 Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
 100 105 110

ggc ctg aag ttg ggt atc tac gcg gac atg ggc aac ttc acc tgc atg 384
 Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
 115 120 125

ggt tac cca ggc acc aca ctg gac aag gtg gtc cag gat gct cag acc 432
 Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
 130 135 140

ttc gcc gag tgg aag gta gac atg ctc aag ctg gat ggc tgc ttc tcc 480
 Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
 145 150 155 160

acc ccc gag gag cgg gcc cag ggg tac ccc aag atg gct gct gcc ctg 528

Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
 165 170 175
 aat gcc aca ggc cgc ccc atc gcc ttc tcc tgc gag tgg cca ctc tat 576
 Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
 180 185 190
 gaa ggc ggc ctc ccc cca agg gtg aac tac agt ctg ctg gcg gac atc 624
 Glu Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
 195 200 205
 tgc aac ctc tgg cgt aac tat gat gac atc cag gac tcc tgg tgg agc 672
 Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
 210 215 220
 gtg ctc tcc atc ctg aat tgg ttc gtg gag cac cag gac ata ctg cag 720
 Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
 225 230 235 240
 cca gtg gcc ggc cct ggg cac tgg aat gac cct gac atg ctg ctc att 768
 Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
 245 250 255
 ggg aac ttt ggt ctc agc tta gag caa tcc egg gcc cag atg gcc ctg 816
 Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu
 260 265 270
 tgg acg gtg ctg gca gcc ccc ctc ttg atg tcc aca gac ctg cgt acc 864
 Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr
 275 280 285
 atc tcc gcc cag aac atg gac att ctg cag aat cca ctc atg atc aaa 912
 Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile Lys
 290 295 300
 atc aac cag gat ccc tta ggc atc cag gga cgc agg att cac aag gaa 960
 Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu
 305 310 315 320
 aaa tet ctc atc gaa gtg tac atg egg cct ctg tcc aac aag gct agc 1008
 Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
 325 330 335
 gcc tta gtc ttc ttc agc tgc agg acc gat atg cct tat cgc tac cac 1056
 Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
 340 345 350
 tcc tcc ctt ggc cag ctg aac ttc acc ggg tet gtg ata tat gag gcc 1104
 Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
 355 360 365

cag gac gtc tac tca ggt gac atc atc agt ggc ctc cga gat gaa acc 1152
 Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
 370 375 380

aac ttc aca gtg atc atc aac cct tca ggg gta gtg atg tgg tac ctg 1200
 Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
 385 390 395 400

tat ccc atc aag aac ctg gag atg tcc cag cag tga 1236
 Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
 405 410

<210> 4

<211> 411

<212> PRT

5

<213> Artificial

<220>

<223> proteína recombinante

<400> 4

Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
 1 5 10 15

Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
 20 25 30

Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
 35 40 45

Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
 50 55 60

Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
 65 70 75 80

Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
 85 90 95

Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
 100 105 110

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
 115 120 125

Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
 130 135 140

Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
 165 170 175

Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
 180 185 190

Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
 195 200 205

Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
 210 215 220

Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
 225 230 235 240

Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
 245 250 255

Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu
 260 265 270

Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr
 275 280 285

Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile Lys
 290 295 300

Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
 340 345 350

Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
 355 360 365

Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
 370 375 380

Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
 385 390 395 400

Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
 405 410

5 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN sintético

<400> 5
 gatgctgctg aagacagtgc tctt 24

10 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN sintético

<400> 6
 tcactgctgg gacatctcca ggft 24

<210> 7
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN sintético

 5 <400> 7
 aaaccgtgc tagcttaagt t 21

 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN sintético

 <400> 8
 cccatgcct tctcctgcga gtggccagcc tatga 35

 15 <210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> ADN sintético

 <400> 9
 gcaggagaag gcgatggggc ggctgtg 28

 <210> 10
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN sintético

 <400> 10
 30 ttctcctgcg agtggccact ctatgaaggc ggct 35

 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> ADN sintético

 <400> 11
 tggccactcg caggagaagg cgatgggg 28

<210> 12
 <211> 1290
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1290)
 <400> 12

atg cag ctg agg aac cca gaa cta cat ctg ggc tgc gcg ctt gcg ctt 48
 Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15

cgc ttc ctg gcc ctc gtt tcc tgg gac atc cct ggg gct aga gca ctg 96
 Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
 20 25 30

gac aat gga ttg gca agg acg cct acc atg ggc tgg ctg cac tgg gag 144
 Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
 35 40 45

cgc ttc atg tgc aac ctt gac tgc cag gaa gag cca gat tcc tgc atc 192
 Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
 50 55 60

agt gag aag ctc ttc atg gag atg gca gag ctc atg gtc tca gaa ggc 240
 Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
 65 70 75 80

tgg aag gat gca ggt tat gag tac ctc tgc att gat gac tgt tgg atg 288
 Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
 85 90 95

gct ccc caa aga gat tca gaa ggc aga ctt cag gca gac cct cag cgc 336
 Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
 100 105 110

10

ES 2 547 726 T3

ttt cct cat ggg att cgc cag cta gct aat tat gtt cac agc aaa gga 384
 Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
 115 120 125

ctg aag cta ggg att tat gca gat gtt gga aat aaa acc tgc gca ggc 432
 Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
 130 135 140

ttc cct ggg agt ttt gga tac tac gac att gat gcc cag acc ttt gct 480
 Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160

gac tgg gga gta gat ctg cta aaa ttt gat ggt tgt tac tgt gac agt 528
 Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175

ttg gaa aat ttg gca gat ggt tat aag cac atg tcc ttg gcc ctg aat 576
 Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190

agg act ggc aga agc att gtg tac tcc tgt gag tgg cct ctt tat atg 624
 Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205

tgg ccc ttt caa aag ccc aat tat aca gaa atc cga cag tac tgc aat 672
 Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
 210 215 220

cac tgg cga aat ttt gct gac att gat gat tcc tgg aaa agt ata aag 720
 His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
 225 230 235 240

agt atc ttg gac tgg aca tct ttt aac cag gag aga att gtt gat gtt 768
 Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
 245 250 255

gct gga cca ggg ggt tgg aat gac cca gat atg tta gtg att ggc aac 816
 Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
 260 265 270

ttt ggc ctc agc tgg aat cag caa gta act cag atg gcc ctc tgg gct 864
 Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
 275 280 285

atc atg gct gct cct tta ttc atg tct aat gac ctc cga cac atc agc 912
 Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
 290 295 300

cct caa gcc aaa gct ctc ctt cag gat aag gac gta att gcc atc aat 960

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn 1008
 305 310 315 320
 cag gac ccc ttg ggc aag caa ggg tac cag ctt aga cag gga gac aac 1008
 Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
 325 330 335
 ttt gaa gtg tgg gaa cga cct ctc tca ggc tta gcc tgg gct gta gct 1056
 Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
 340 345 350
 atg ata aac cgg cag gag att ggt gga cct cgc tct tat acc atc gca 1104
 Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
 355 360 365
 gtt gct tcc ctg ggt aaa gga gtg gcc tgt aat cct gcc tgc ttc atc 1152
 Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
 370 375 380
 aca cag ctc ctc cct gtg aaa agg aag cta ggg ttc tat gaa tgg act 1200
 Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 tca agg tta aga agt cac ata aat ccc aca ggc act gtt ttg ctt cag 1248
 Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
 405 410 415
 cta gaa aat aca atg cag atg tca tta aaa gac tta ctt taa 1290
 Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 420 425

<210> 13
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

5

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
 20 25 30
 Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
 35 40 45

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
 50 55 60

Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
 65 70 75 80

Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
 85 90 95

Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
 100 105 110

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
 115 120 125

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
 130 135 140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
 210 215 220

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
 225 230 235 240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val

245

250

255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
260 265 270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
275 280 285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
290 295 300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305 310 315 320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
325 330 335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
340 345 350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
355 360 365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys-Phe Ile
370 375 380

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
405 410 415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
420 425

<210> 14

<211> 45

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<400> 14

5 atg tct gca ctt ctg atc cta gct ctt gtt gga gct gca gtt gct 45
 Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 15

 Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

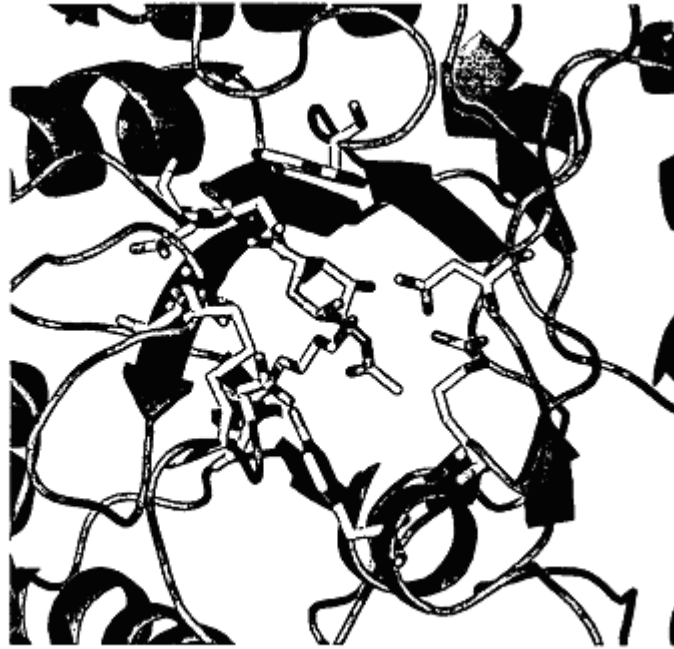
REIVINDICACIONES

1. Una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa descrita en (a) o (b):
 - 5 (a) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos formada por el aminoácido en la posición 18 al aminoácido en la posición 411 incluidos en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la secuencia N° 2 en la cual el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico o ácido aspártico y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con leucina, valina, isoleucina, fenilalanina o metionina; o
 - 10 (b) una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos descrita en (a), en la cual de uno a diez aminoácidos distintos de los aminoácidos localizados en los sitios de sustitución están sustituidos, en la que los aminoácidos en las posiciones 28 a 31, los aminoácidos en las posiciones 77 a 81, los aminoácidos en las posiciones 117 a 127, los aminoácidos en las posiciones 150 a 158, el aminoácido en la posición 192, los aminoácidos en las posiciones 209 a 220, los aminoácidos en las posiciones 242 a 254 y los aminoácidos en las posiciones 45, 124, 177, 201, 350, 359 y 385 no están mutados.
2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el aminoácido en la posición 188 está sustituido con ácido glutámico y el aminoácido en la posición 191 está sustituido con leucina.
- 15 3. Un gen que comprende ADN que codifica la proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un vector recombinante que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Un transformante no humano que comprende el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un procedimiento de producción de una proteína que tiene actividad de α -galactosidasa, que comprende una etapa de cultivo del transformante de acuerdo con la reivindicación 5 y una etapa de recogida de la proteína que tiene actividad de α -galactosidasa del producto cultivado resultante.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Un agente terapéutico para la enfermedad de Fabry que, como un principio activo, comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 7.
- 25 9. Una composición farmacéutica que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 3.
10. Un agente terapéutico génico para la enfermedad de Fabry que, como un principio activo, comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Uso de la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o el gen de acuerdo con la reivindicación 3 para la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.
- 30 12. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.
13. El gen de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

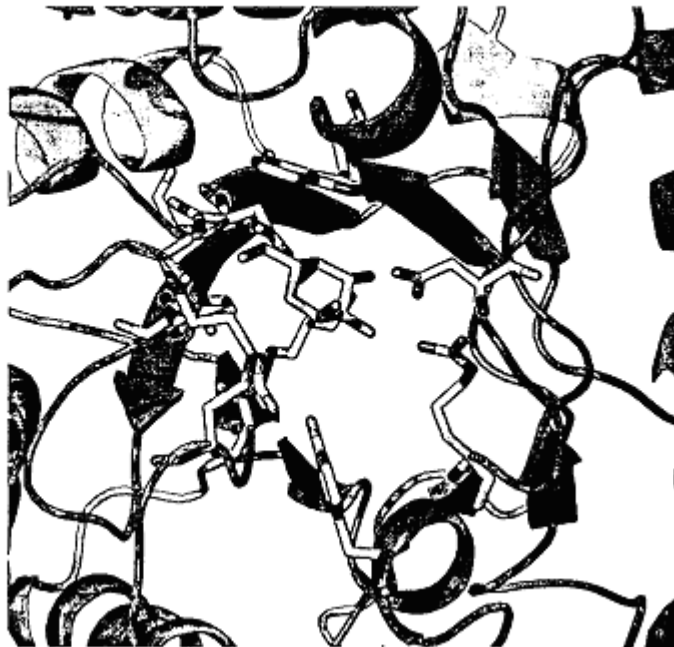
FIG. 1



FIG. 2A



α -NAGA de ts
(COMPLEJO CON SUSTRATO)



α -GAL de ts
(COMPLEJO CON SUSTRATO)

FIG. 2B

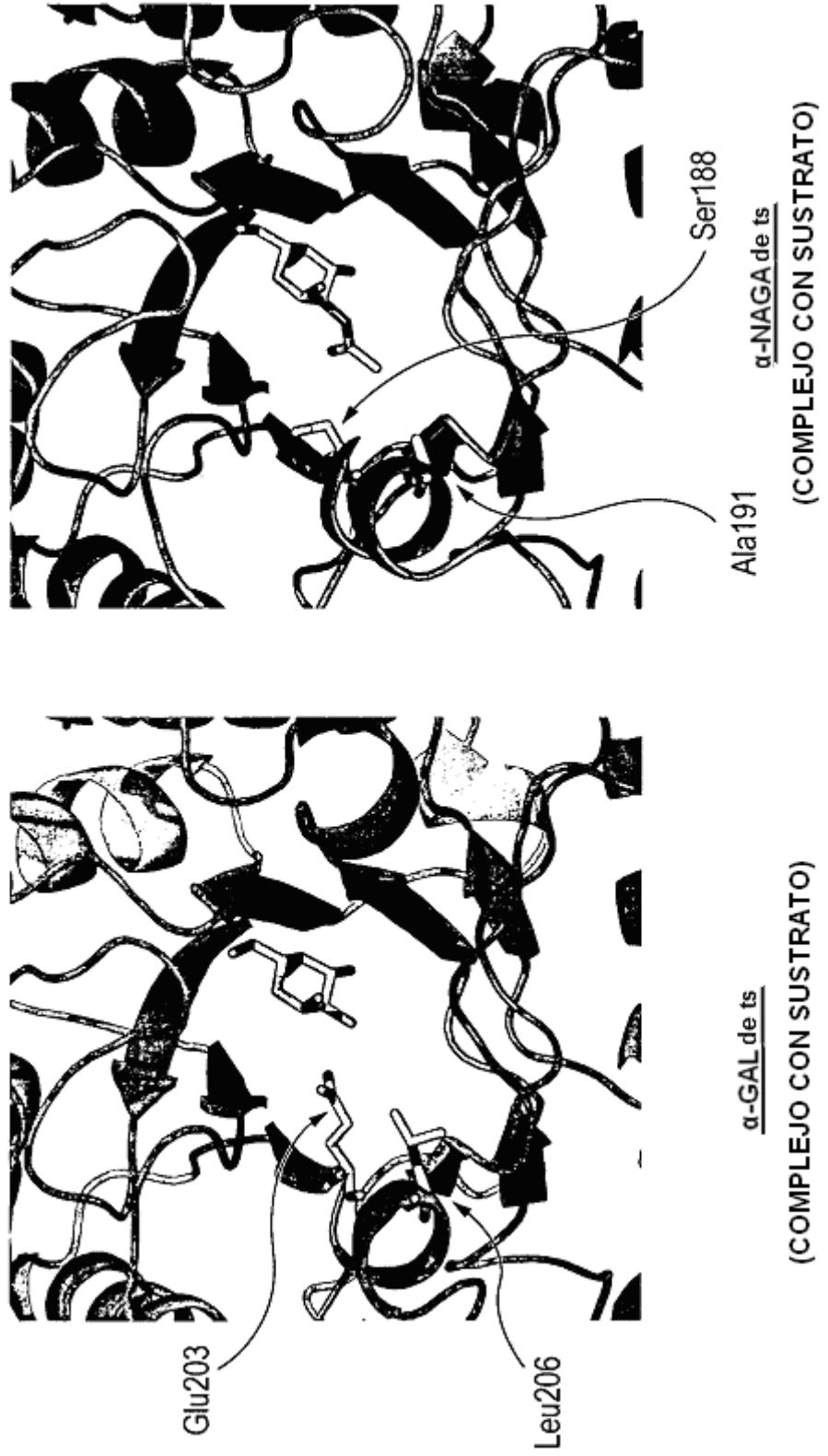


FIG. 2C

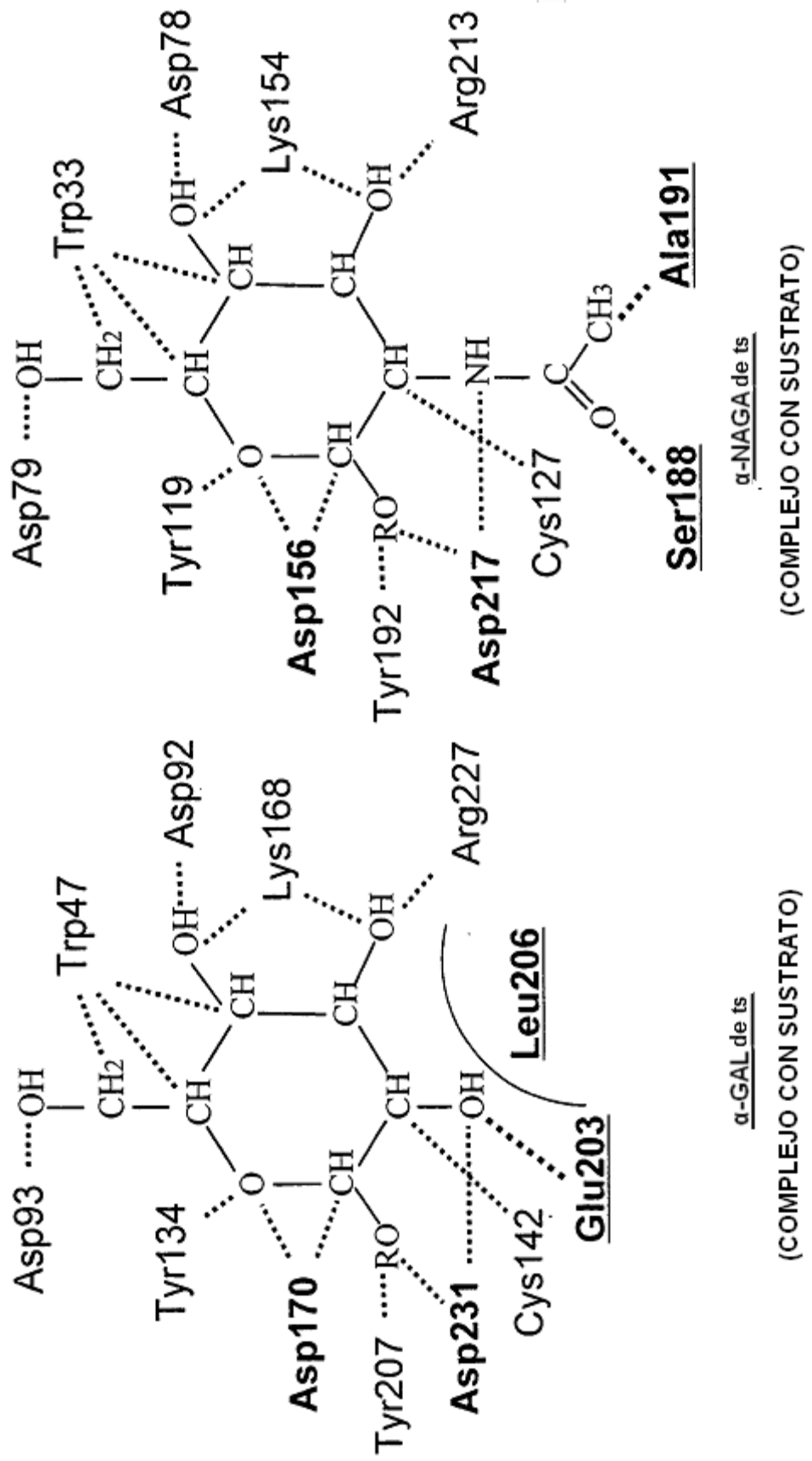


FIG. 3

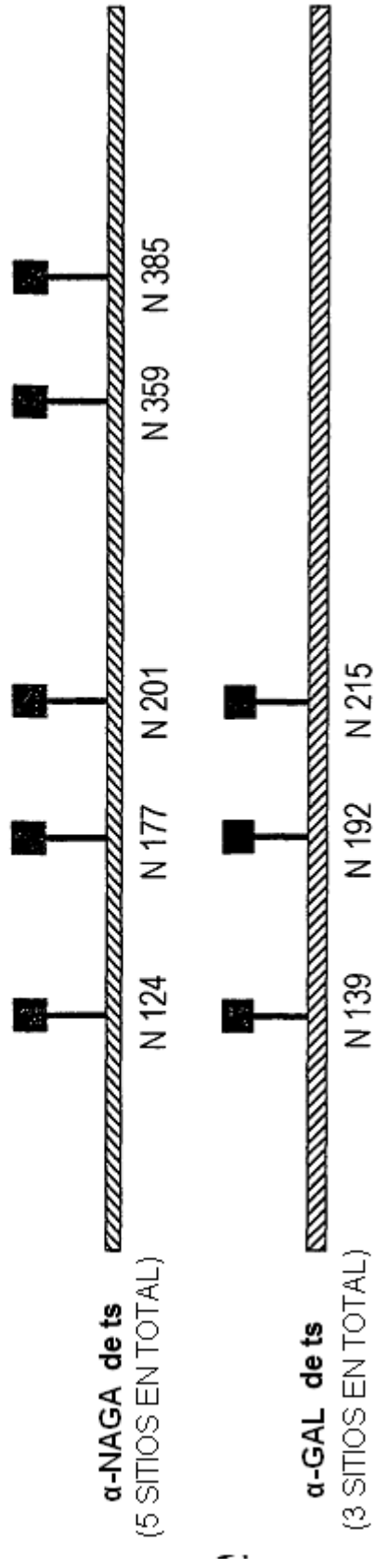


FIG. 4



FIG. 5

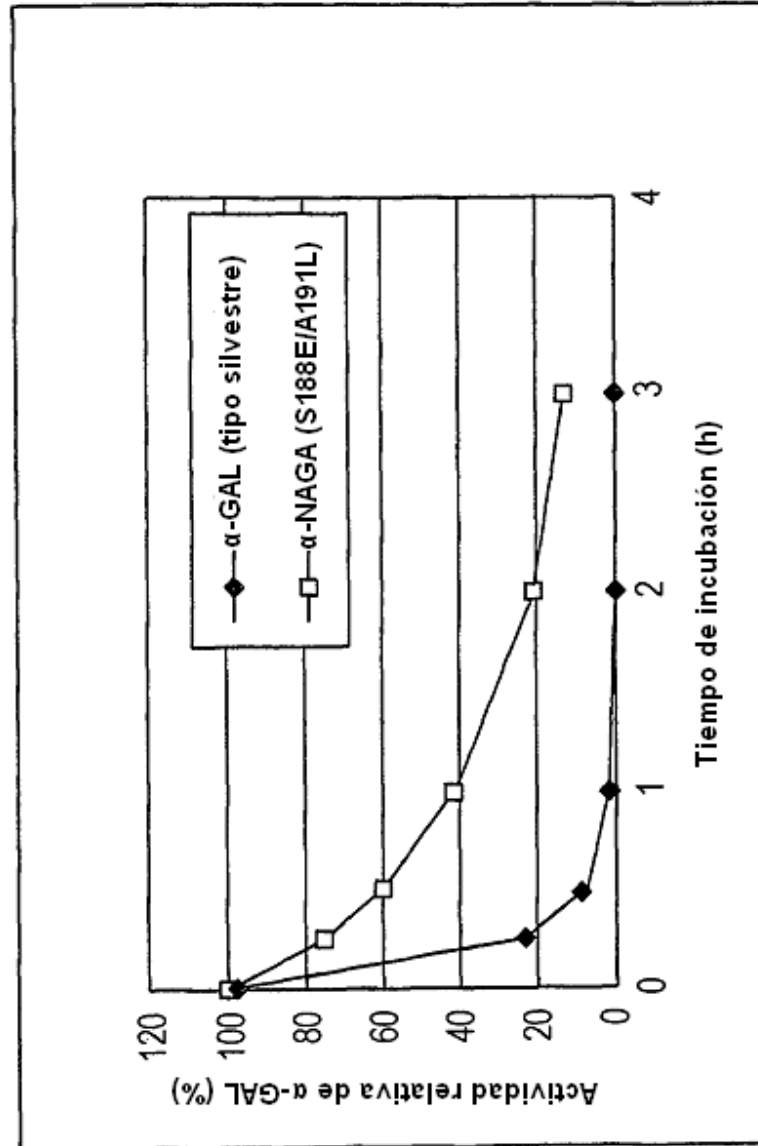


FIG. 6

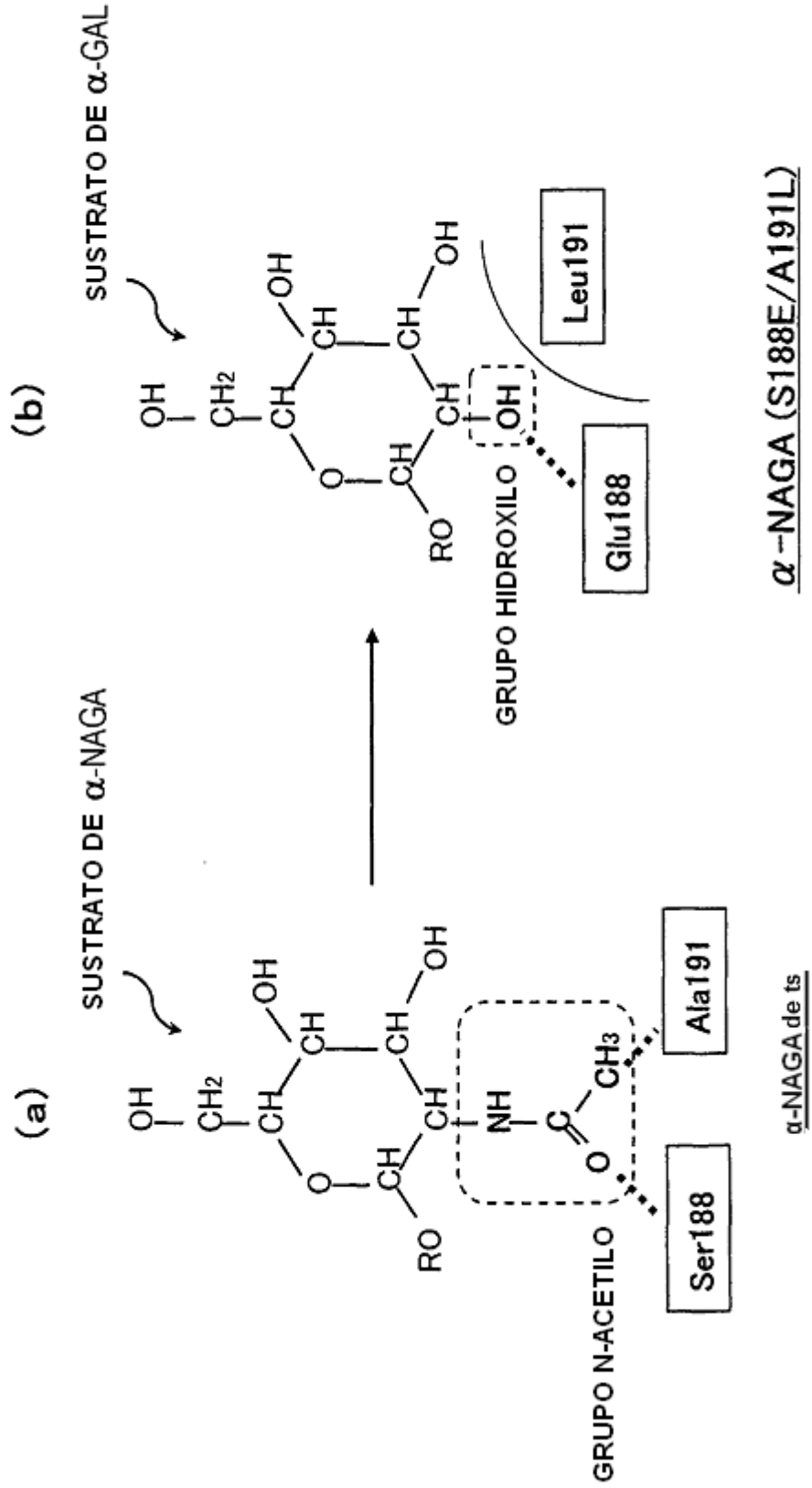


FIG. 7



α -NAGA (S188E/A191L)
(COMPLEJO CON SUSTRATO)



α -NAGA de ts
(COMPLEJO CON SUSTRATO)