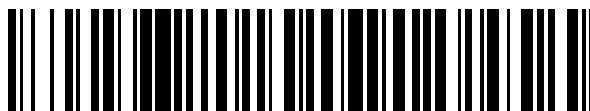


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 121**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 9/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2008 E 08753111 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2166093**

54 Título: **Composición farmacéutica para terapia de reemplazo enzimático**

30 Prioridad:

**18.05.2007 JP 2007133536**

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

**23.10.2015**

73 Titular/es:

**TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF  
MEDICAL SCIENCE (50.0%)  
1-6, Kamikitazawa 2-chome Setagaya-ku  
Tokyo 156-0057, JP y  
ALTIF LABORATORIES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAKURABA, HITOSHI;  
TAJIMA, YOUICHI;  
KAWASHIMA, IKUO;  
AIKAWA, SEIICHI y  
AIKAWA, FUMIKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 549 121 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

Composición farmacéutica para terapia de reemplazo enzimático

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva enzima altamente funcional con una especificidad de sustrato alterada, específicamente una proteína recombinante que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa. La enzima puede usarse en una composición farmacéutica para terapia de reemplazo enzimático, específicamente para tratar enfermedad de Fabry.

10

**Antecedentes de la técnica**

Para la deficiencia enzimática hereditaria, para la que no se conocen hasta la fecha tratamientos radicales, se ha desarrollado gradualmente terapia de reemplazo enzimático en la que se produce una enzima por ingeniería genética y después se administra al vaso sanguíneo por goteo intravenoso o similar. Como ejemplo, la deficiencia enzimática hereditaria, cuya frecuencia es relativamente alta y que se designa como una enfermedad específica (enfermedad intratable), la enfermedad de Fabry (deficiencia de  $\alpha$ -galactosidasa hereditaria, también denominada enfermedad lisosómica, que es una de las enfermedades genéticas) es muy conocida (véase Kenneth J. Dean *et al.*, Fabry Disease, "Practical Enzymology of the Sphingolipidoses", U.S.A., Aln R. Liss, Inc., 1997, p. 173-216).

15

20

25

La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico de glucolípidos que se desarrolla de la siguiente manera: como resultado de una disminución de la actividad o deficiencia de una enzima denominada " $\alpha$ -galactosidasa", presente en el lisosoma, uno de los orgánulos intracelulares humanos, un glucolípidos denominado globotriaosilceramida (GL-3; también denominado trihexósido de ceramida (THC)), que es un sustrato *in vivo* de la enzima, no se degrada y por lo tanto se acumula en el organismo (por ejemplo, en los vasos sanguíneos, piel, córnea, nervios, riñones y en el corazón).

30

35

40

45

Dado que un gen que codifica la  $\alpha$ -galactosidasa se encuentra en el cromosoma X, esta enfermedad tiene una herencia asociada al cromosoma X. Por lo tanto, en esta enfermedad, se presenta una característica clínica definida principalmente en hombres hemicigotos. Se cree que la "enfermedad de Fabry clásica", que sigue una evolución clínica típica, se desarrolla en aproximadamente uno de cada 40.000 niños. Síntomas tales como dolor en la mano y en el pie, hipohidrosis, angioqueratoma y opacidad de la córnea, aparecen durante la infancia y la adolescencia; estos síntomas progresan y después provocan daño orgánico sistémico tal como insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca y trastorno cerebrovascular en la edad adulta o posteriormente, lo que se convierte en una causa de muerte. También existe la "enfermedad de Fabry variante", que no sigue dicha evolución clínica típica, tal como la "enfermedad de Fabry clásica" y que se desarrolla tarde y sigue una evolución relativamente moderada. En pacientes con este tipo de enfermedad, se observa una actividad  $\alpha$ -galactosidasa remanente, aunque es baja. Como una enfermedad de Fabry variante, por ejemplo, se conoce la "enfermedad de Fabry cardíaca", que provoca la acumulación de glucolípidos anteriormente mencionada principalmente en el corazón. En consecuencia, se produce hipertrofia cardíaca, y se provocan trastornos tales como insuficiencia cardíaca y arritmia. Por otro lado, en mujeres pacientes heterocigotas con enfermedad de Fabry, se observan diversos tipos de características clínicas de acuerdo con las características del cromosoma X. Específicamente, los casos varían de casos graves, que son similares a los de hombres hemicigotos, a casos en los que no se observan sustancialmente ningún síntoma. Sin embargo, de acuerdo con investigaciones recientes, se ha puesto de manifiesto que la mayoría de las mujeres pacientes heterocigotas con enfermedad de Fabry desarrollan algún tipo de síntoma con la edad. Existe el punto de vista de que estas mujeres no deberían considerarse "portadoras" sino "pacientes".

50

Recientemente, también se ha establecido la terapia de reemplazo enzimático para enfermedad de Fabry, y se ha usado ampliamente una  $\alpha$ -galactosidasa humana recombinante producida en una célula derivada de mamíferos como un elemento activo de un agente terapéutico de enfermedad de Fabry en la terapia anterior (véase Eng CM *et al.*, Am J Hum Genet, 68: 711-722 (2001); Eng CM *et al.*, N Engl J Med, 345: 9-16 (2001); y Schiffmann R *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97: 365-370 (2000)).

55

60

También se ha propuesto un método en el que puede usarse una  $\alpha$ -galactosidasa humana recombinante producida con una célula no animal (por ejemplo, de levadura) como un hospedador para el tratamiento de la enfermedad de Fabry (terapia de reemplazo enzimático) (véase la Publicación de Solicitud de Patente No Examinada Japonesa nº 2002-369692), un método terapéutico génico en el que una enzima se reemplaza introduciendo un gen que codifica la  $\alpha$ -galactosidasa humana en una célula de un tejido afectado para expresar el gen (véase Publicación de Solicitud de Patente No Examinada Japonesa (Traducción de la Solicitud de PCT) Nº 2002-522509), y similares.

**Divulgación de la invención**

65

Sin embargo, dado que con frecuencia se administra un agente enzimático existente, usado para el reemplazo enzimático para el tratamiento de enfermedad de Fabry, a pacientes que no tienen la enzima ( $\alpha$ -galactosidasa humana) desde el principio, la enzima contenida en el agente terapéutico se reconoce como una sustancia extraña

en muchos pacientes a los que se administra el agente enzimático, y se produce un anticuerpo, dando como resultado un problema de efectos secundarios adversos a una alta frecuencia, principalmente, reacciones alérgicas. Dicho problema se produce de forma similar en el caso en el que la enzima se reemplaza usando un procedimiento terapéutico génico.

5 Además, dicho agente enzimático usado para el reemplazo enzimático se administra en los vasos sanguíneos, pero la  $\alpha$ -galactosidasa es en sí misma inestable en la sangre. En consecuencia, en la terapia actual, el agente enzimático debe administrarse frecuentemente (una vez cada dos semanas), y puede ser necesario aumentar la dosificación por cada administración. Además, la  $\alpha$ -galactosidasa humana ( $\alpha$ -GAL) tiene un número relativamente  
10 pequeño de cadenas de azúcares (cadenas de azúcares de tipo N) con los que puede unirse un resto de manosa-6-fosfato (M6P) para la captación por una célula (más específicamente, por un lisosoma en una célula) de un órgano afectado. Por lo tanto, la captación de  $\alpha$ -GAL por una célula a través de la sangre es difícil. En particular, las  
15 eficacias de captación en el riñón o corazón, órganos afectados predominantemente por la enfermedad de Fabry, son bajas, y por lo tanto el efecto terapéutico para nefropatía o cardiopatía apenas es suficiente. Por consiguiente, para permitir que una célula diana capte una determinada cantidad de enzima después de la terapia, se requiere una gran cantidad de enzima. En consecuencia, para el reemplazo enzimático, es necesario administrar un agente enzimático más frecuentemente y en mayor cantidad. Dicha terapia supone una gran carga física, mental y económica para los pacientes y, por lo tanto, afecta de forma adversa a la "calidad de vida (CDV)".

20 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Fabry, que usa una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -GAL, que no muestra efectos secundarios alérgicos, que es altamente estable en sangre (en plasma) y que puede captar fácilmente una célula de un órgano afectado. También es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva enzima altamente funcional con una especificidad de sustrato alterada, como la proteína anteriormente mencionada que tiene actividad  $\alpha$ -GAL.

25 Los presentes inventores realizaron estudios intensivos para resolver los problemas anteriores. Como resultado, los presentes inventores se centraron en una " $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA)", una proteína que tiene una especificidad de sustrato diferente de la de  $\alpha$ -GAL pero que tiene una estructura general muy similar a la de  $\alpha$ -GAL. Los presentes inventores han pensado que el problema anterior puede resolverse si se usa una nueva enzima  
30 altamente funcional (un mutante de  $\alpha$ -NAGA), obtenida alterando la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA mediante la alteración de la estructura del sitio activo de  $\alpha$ -NAGA para adquirir actividad  $\alpha$ -GAL, como un elemento activo de una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Fabry que puede usarse para terapia de reemplazo enzimático.

35 Sin embargo, en la técnica, se conocen generalmente los siguientes hechos.

1) Cuando una parte de los aminoácidos de una proteína se sustituye por un aminoácido diferente, es posible que se altere el estado de la acción mutua (enlace de hidrógeno, enlace hidrófobo, etc.) entre dicho aminoácido y los aminoácidos que flanquean a dicho aminoácido. Cuando se altera el estado de la acción mutua, la estructura tridimensional de la proteína que tiene aminoácidos parcialmente sustituidos, puede cambiar lo que puede  
40 afectar a la función primaria de la proteína (específicamente, una actividad enzimática en el caso de una enzima).

2) La alteración de la estructura anteriormente mencionada debido a la sustitución parcial de los aminoácidos de la proteína, puede conducir a la alteración de la estructura superficial de la proteína. Cuando se administra una  
45 proteína con una estructura superficial alterada a un organismo vivo, el organismo vivo reconocerá que la proteína es diferente de la proteína original (es decir, ajena al organismo), provocando de este modo una respuesta inmunitaria. Cuando la proteína se usa como un agente farmacéutico para la administración a un organismo vivo, dicha respuesta inmunitaria no solamente deteriora la función de la proteína sino que también puede inducir anafilaxis, lo que podría ser un problema grave con peligro para la vida.

50 Por lo tanto, es preciso diseñar una proteína, que se administre a un organismo vivo, como un agente farmacéutico de modo que no solamente se conserve su función (actividad) sino que tampoco provoque respuesta inmunitaria después de la administración.

55 Por las razones anteriores, incluso cuando en el sitio activo de  $\alpha$ -NAGA, que se asemeja a  $\alpha$ -GAL, un aminoácido se sustituye por un aminoácido similar a uno en el sitio activo de  $\alpha$ -GAL, la preparación de una proteína (mutante de  $\alpha$ -NAGA) que tiene la actividad  $\alpha$ -GAL y la estructura de  $\alpha$ -NAGA no siempre está garantizada, dependiendo de la posición y del tipo del aminoácido sustituido.

60 Para resolver este problema, los presentes inventores identificaron una secuencia de aminoácidos de un mutante de  $\alpha$ -NAGA como un agente candidato para tratar la enfermedad de Fabry realizando una simulación a través de un análisis estructural por modelización de homología para examinar el aspecto específico de la sustitución de aminoácidos que permite la conservación de la estructura superficial de  $\alpha$ -NAGA y la adquisición de la actividad  $\alpha$ -GAL al mismo tiempo. Basándose en esto, los presentes inventores expresaron de hecho este mutante de  $\alpha$ -NAGA  
65 para confirmar que tenía una actividad de degradación del sustrato de  $\alpha$ -GAL. Además, este mutante de  $\alpha$ -NAGA se

administró a ratones de modelo de enfermedad de Fabry para confirmar que la actividad  $\alpha$ -GAL se distribuía de hecho en el tejido afectado.

5 A partir de estos estudios, se descubrió, por primera vez, que este mutante de  $\alpha$ -NAGA, era eficaz como un agente farmacéutico para tratar la enfermedad de Fabry.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una proteína que ha adquirido actividad  $\alpha$ -galactosidasa alterando la estructura del sitio activo de la  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa humana de tipo silvestre.

10 Una composición farmacéutica puede incluir la proteína anteriormente mencionada que tiene la especificidad de sustrato de la  $\alpha$ -galactosidasa.

Por consiguiente, la invención proporciona

15 (1) Una proteína de (a) o (b) a continuación:

(a) una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 donde el aminoácido 202 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6 se sustituye por ácido glutámico o ácido aspártico mientras que el aminoácido 205 se sustituye por leucina, valina o isoleucina;

20 (b) una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa que comprende una secuencia de aminoácido en la que de uno a diez aminoácidos distintos del aminoácido (o de los aminoácidos) 202 y 205 sustituidos, se suprimen, se sustituyen o se añaden en la secuencia de aminoácidos de (a) anterior, donde los aminoácidos 42 a 45, 59, 91 a 95, 131 a 141, 164 a 172, 206, 223 a 234, 256 a 268 y 364 en la secuencia de aminoácidos en (a) no están mutados.

Los ejemplos de las proteínas de la invención incluyen las proteínas anteriores en las que el aminoácido 202 es ácido glutámico mientras que el aminoácido 205 es leucina.

30 (2) Un gen que se selecciona de (a) y (b) a continuación:

(a) Un gen que codifica la proteína de acuerdo con (1) anterior.

35 (b) Un gen que codifica una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa que comprende ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 donde los nucleótidos 604-606 de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 5 se sustituyen por nucleótidos de un codón de ácido glutámico o ácido aspártico, donde los nucleótidos 613-615 se sustituyen por nucleótidos de un codón de leucina, valina o isoleucina y donde los nucleótidos 124 a 135, 175 a 177, 271 a 285, 391 a 423, 490 a 516, 616 a 618, 667 a 702, 766 a 804 y 1.090 a 1.092 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 no están mutados.

40 Los ejemplos del gen de la invención incluyen los genes anteriores, donde los nucleótidos sustituidos 604-606 del gen de (2)(b) anterior son nucleótidos de un codón de ácido glutámico mientras que los nucleótidos sustituidos 613-615 del gen de (2)(b) son nucleótidos de un codón de leucina.

(3) Un vector recombinante que comprende el gen de acuerdo con (2) anterior.

(4) Un transformante que comprende un vector recombinante de acuerdo con (3) anterior.

45 (5) Un método para producir una proteína, que comprende las etapas de: cultivar el transformante de acuerdo con (4) anterior; y recoger una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa del producto cultivado resultante.

### Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 proporciona vistas esquemáticas que muestran las estructuras tridimensionales de subunidades completas de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre.

La Figura 2A proporciona vistas esquemáticas que muestran las estructuras de los sitios activos de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre. Obsérvese que los aminoácidos (como un modelo de barras (excepto los sustratos)) mostrados en la figura, indican las posiciones de los restos de aminoácidos que son comunes entre  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA en la estructura, entre los restos de aminoácidos cercanos a los sustratos de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre.

55 La Figura 2B proporciona vistas esquemáticas que muestran las estructuras de los sitios activos de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre. Obsérvese que los aminoácidos (como un modelo de barras (excepto los sustratos)) mostrados en la figura, indican las posiciones de los restos de aminoácidos que son diferentes entre  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA en la estructura, entre los restos de aminoácidos cercanos a los sustratos de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre.

60 La Figura 2C proporciona diagramas que muestran los sitios de interacción entre los aminoácidos que constituyen el sitio activo de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre o de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre y el sustrato de los mismos.

La Figura 3 es una vista esquemática que compara los números y las posiciones de los sitios de N-glicosilación entre las subunidades de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre.

La Figura 4 proporciona vistas esquemáticas en las que los sitios de N-glicosilación (como un modelo de barras (excepto los sustratos)) se muestran en las estructuras de las subunidades de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre y de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, respectivamente.

La Figura 5(a) es una vista esquemática que muestra la unión de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre con su sustrato, mientras que la Figura 5(b) es una vista esquemática que muestra la unión de un mutante de  $\alpha$ -NAGA, es decir,  $\alpha$ -NAGA (S188E/A191L), con un sustrato de  $\alpha$ -GAL.

La Figura 6 proporciona vistas esquemáticas que muestran las estructuras de los sitios activos de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre y de un mutante de  $\alpha$ -NAGA, es decir,  $\alpha$ -NAGA (S188E/A191L), respectivamente.

La Figura 7 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción, que muestra los efectos de las adiciones de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL, de un mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, sobre la cantidad de THC acumulado en fibroblastos procedentes de pacientes con enfermedad de Fabry.

La Figura 8 es una vista que muestra imágenes de tinción de CBB de un reactivo en etapas respectivas durante la purificación de un mutante de  $\alpha$ -NAGA, es decir  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L).

La Figura 9 es una vista que muestra los resultados de un análisis de THC, es decir, un sustrato de  $\alpha$ -GAL, en el hígado, riñón y corazón.

La Figura 10 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción de tejidos de riñón.

La Figura 11 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción de tejidos de corazón.

La Figura 12 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción de tejidos de hígado.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento se describirá la presente invención en detalle. El alcance de la presente invención no debería limitarse a las descripciones posteriores, mientras que, además de los ejemplos descritos posteriormente, pueden realizarse diversas modificaciones de la invención.

La presente descripción incluye la totalidad de la descripción de la Solicitud de Patente Japonesa nº 2007-133536, que reivindica la prioridad de la presente solicitud.

#### 1. Descripción general de la invención

##### (1) Definición de términos

En el presente documento, a no ser que se indique de otro modo, los términos se definen de la siguiente manera.

Las expresiones " $\alpha$ -galactosidasa" y " $\alpha$ -GAL" se refieren ambas a " $\alpha$ -galactosidasa A humana".

Las expresiones " $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa" y " $\alpha$ -NAGA" se refieren ambas a " $\alpha$ -galactosidasa B humana", es decir, " $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa humana".

La abreviatura "ts" significa tipo silvestre.

La abreviatura "M6P" significa "manosa-6-fosfato".

La expresión "actividad  $\alpha$ -GAL" se refiere a la actividad descrita posteriormente de hidrolizar el sustrato de  $\alpha$ -GAL (véase la fórmula de reacción (1) posterior), que no se limita a la actividad de la proteína de  $\alpha$ -GAL ( $\alpha$ -GAL de tipo silvestre).

La expresión "actividad  $\alpha$ -NAGA" se refiere a la actividad descrita posteriormente de hidrolizar el sustrato de  $\alpha$ -NAGA (véase la fórmula de reacción (2) posterior), que no se limita a la actividad de la proteína de  $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre).

La expresión "actividad  $\alpha$ -GAL adquirida" significa que la reactividad de unión con sustrato de  $\alpha$ -GAL se hace relativamente mayor que la del sustrato de  $\alpha$ -NAGA en el sitio de unión a sustrato.

La expresión "tener especificidad de sustrato de  $\alpha$ -GAL" significa que la estructura de un sitio activo (particularmente, en la posición y el tipo de un resto de aminoácido que desempeña un papel importante para la reactividad de unión con el sustrato) es la misma que la de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre.

Las expresiones "aminoácido 188" y "aminoácido 191" se refiere a las posiciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre (una posición contada desde el resto de aminoácido en el extremo N terminal (como aminoácido 1) hacia el extremo C terminal de esta secuencia de aminoácidos).

La expresión “mutante de  $\alpha$ -NAGA” se refiere básicamente a cualquier mutante de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, sin limitarse a un mutante particular (mutante de aminoácido). En el presente documento, una proteína mutante que tiene serina en el aminoácido 188 sustituida por ácido glutámico, y alanina en el aminoácido 191 sustituida por leucina en la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre (y por lo tanto denominada “ $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)”) puede denominarse (definirse) como un mutante de  $\alpha$ -NAGA.

La expresión “ $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL” se refiere en general a una proteína que tiene el resto peptídico señal de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre (un resto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-17 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2) reemplazado con el resto peptídico señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre (un resto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-31 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 10). En este caso, aunque el resto del péptido señal se retira, generalmente después de la secreción extracelular, tras la expresión intracelular de la proteína, de acuerdo con la presente invención, la proteína después de la secreción extracelular también puede denominarse por conveniencia “ $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL”.

Las expresiones “mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL” y “ $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL” se refieren, en general, a una proteína que tiene el resto peptídico señal de un mutante de  $\alpha$ -NAGA (por ejemplo, un resto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-17 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2; reemplazado con el resto peptídico señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre (un resto peptídico que consiste en los aminoácidos 1-31 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 10). En este caso, aunque el resto peptídico señal se retira, en general, después de la secreción extracelular tras la expresión intracelular de la proteína, de acuerdo con la presente invención, la proteína después de la secreción extracelular también puede denominarse por conveniencia “mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL” y “ $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL”.

(2) Descripción del listado de secuencias

En la Tabla A indicada a continuación se muestran proteínas enzimáticas de las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID N°: 1-10 en la presente descripción. En la Tabla A, la expresión “cuerpo principal” se refiere a una parte que se convierte en la proteína madura sin el resto peptídico señal. El símbolo “+” representa la unión entre el péptido señal indicado y el cuerpo principal.

Tabla A

SEC ID N°	Proteína
SEC ID N°: 1 (secuencia de nucleótidos) SEC ID N°: 2 (secuencia de aminoácidos)	$\alpha$ -NAGA ts (péptido señal de $\alpha$ -NAGA ts + cuerpo principal de $\alpha$ -NAGA ts)
SEC ID N°: 3 (secuencia de nucleótidos) SEC ID N°: 4 (secuencia de aminoácidos)	Mutante de $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)) (péptido señal de $\alpha$ -NAGA ts + cuerpo principal de mutante de $\alpha$ -NAGA)
SEC ID N°: 5 (secuencia de nucleótidos) SEC ID N°: 6 (secuencia de aminoácidos)	Péptido señal de $\alpha$ -GAL ts + cuerpo principal de $\alpha$ -NAGA ts
SEC ID N°: 7 (secuencia de nucleótidos) SEC ID N°: 8 (secuencia de aminoácidos)	Péptido señal de $\alpha$ -GAL ts + cuerpo principal de mutante de $\alpha$ -NAGA
SEC ID N°: 9 (secuencia de nucleótidos) SEC ID N°: 10 (secuencia de aminoácidos)	$\alpha$ -GAL ts (péptido señal de $\alpha$ -GAL ts + cuerpo principal de $\alpha$ -GAL ts)

## (3) Sumario de la invención

La presente invención proporciona una proteína recombinante que actúa como una excelente enzima altamente funcional novedosa, que puede usarse como un elemento activo de una composición farmacéutica para tratar enfermedad de Fabry que puede usarse eficazmente para terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Fabry y que puede ejercer un efecto terapéutico excelente.

Para un agente existente usado para reemplazo de enzimas para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, se usa la  $\alpha$ -GAL humana recombinante producida en una célula procedente de un mamífero, tal como una célula CHO o un fibroblasto humano. Sin embargo, el uso de esta  $\alpha$ -GAL humana provoca problemas tales como efectos secundarios alérgicos, inestabilidad en la sangre, y una baja eficacia de captación por una célula de un órgano afectado, y por lo tanto supone una gran carga en pacientes en la terapia real. Por consiguiente, se desea una solución a estos problemas.

Para resolver estos problemas, los presentes inventores estudiaron si una enzima distinta de  $\alpha$ -GAL podía usarse o no como una enzima usada para reemplazo enzimático para tratar la enfermedad de Fabry. Específicamente, los presentes inventores se centraron en la " $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA), que es una enzima lisosómica similar a la  $\alpha$ -GAL (lo que significa que la localización de la  $\alpha$ -NAGA en una célula es la misma que la de la  $\alpha$ -GAL), y cuya estructura global es muy similar a la de la  $\alpha$ -GAL pero con diferente especificidad de sustrato.

La  $\alpha$ -GAL se solía denominar  $\alpha$ -galactosidasa A. Se creía que existía una isozima denominada  $\alpha$ -galactosidasa B que tenía propiedades bioquímicas muy similares a las de la  $\alpha$ -GAL. Se ha sabido que la  $\alpha$ -galactosidasa B tenía mayor estabilidad que la de la  $\alpha$ -GAL, pero no tenía la capacidad de degradar la globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida (THC)), que se acumula en el organismo debido a la enfermedad de Fabry. Más adelante, resultó evidente que la  $\alpha$ -galactosidasa B era de hecho la  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA). La  $\alpha$ -NAGA está codificada por un gen que se considera que se origina a partir del mismo gen ancestral que el de un gen que codificaba la  $\alpha$ -GAL. El ADNc de  $\alpha$ -NAGA se ha clonado, y se sabe que el gen codifica una proteína compuesta de un total de 411 restos de aminoácidos que contienen un péptido señal compuesto de 17 restos de aminoácidos. Además, cuando la estructura de la  $\alpha$ -NAGA humana se compara con la de la  $\alpha$ -GAL humana, la homología de las mismas es del 57,9% al nivel de la secuencia de nucleótidos, y del 52,2% al nivel de la secuencia de aminoácidos. Además, al igual que la  $\alpha$ -GAL humana, la  $\alpha$ -NAGA humana es una enzima que existe en forma de un homodímero.

Basándose en el conocimiento anterior, los presentes inventores han construido en primer lugar modelos estructurales tridimensionales de  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL para compararlos. Más específicamente, se construyó un modelo estructural tridimensional de  $\alpha$ -NAGA humana con referencia a la información estructural de  $\alpha$ -NAGA de pollo (ID: 1KTC) registrada en el Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas) (PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>)), y esta estructura se comparó con la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -GAL humana (ID: 1R47) registrada en el PDB. Como resultado, se ha descubierto que la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -NAGA humana era muy similar a la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -GAL humana con respecto a la estructura completa y al sitio activo. Con respecto al sitio activo, para ser exactos, solamente algunos restos de aminoácidos son diferentes entre sí. Sin embargo, entre estos restos de aminoácidos, hay restos de aminoácidos importantes presentes en el sitio de unión a sustrato, que afecta en la diferencia entre las especificidades de sustrato de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA. A este respecto, se ha descubierto que hay una diferencia significativa en las estructuras tridimensionales entre los sitios activos de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA.

Por lo tanto,  $\alpha$ -NAGA es una enzima que difiere de  $\alpha$ -GAL en una parte de la estructura del sitio de unión a sustrato en el sitio activo pero es muy similar a  $\alpha$ -GAL con respecto a la estructura y propiedades en relación con las otras partes incluyendo el sitio catalítico (véanse las Figuras 1, 2A y 2B). Por lo tanto, el mecanismo de reacción catalítico de  $\alpha$ -NAGA es muy similar al mecanismo de reacción catalítico de  $\alpha$ -GAL con respecto a, por ejemplo, los tipos de sustrato de reacción y producto de reacción.

Por lo tanto, los presentes inventores se han centrado en  $\alpha$ -NAGA como se ha descrito anteriormente y han descubierto que cuando la especificidad de un sustrato de  $\alpha$ -NAGA se modifica para tener actividad  $\alpha$ -galactosidasa alterando la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión al sustrato) por manipulación génica de  $\alpha$ -NAGA (por ejemplo, sustituyendo los restos de aminoácidos de tipo  $\alpha$ -NAGA que desempeñan el papel clave entre los restos de aminoácidos relacionados con el reconocimiento de sustratos de  $\alpha$ -NAGA por los restos de aminoácidos de tipo  $\alpha$ -GAL), puede crearse una excelente enzima altamente funcional novedosa que puede usarse para tratar la enfermedad de Fabry.

Las razones por las que los presentes inventores se han centrado en  $\alpha$ -NAGA incluyen además los siguientes puntos (i) a (iii):

- (i)  $\alpha$ -NAGA es la enzima responsable de la enfermedad de Schindler y de la enfermedad de Kanzaki (obsérvese que una enfermedad que se desarrolla debido a anomalía de la misma enzima como una enzima que desarrolla enfermedad de Schindler y que tiene un fenotipo clínico diferente del de la enfermedad de Schindler, se

denomina enfermedad de Kanzaki), y la deficiencia de  $\alpha$ -NAGA es una causa del desarrollo de la enfermedad de Schindler y de la enfermedad de Kanzaki. En general, sin embargo, el desarrollo de la enfermedad de Schindler o de la enfermedad de Kanzaki, es muy poco común incluso en pacientes con enfermedad de Fabry. En consecuencia, puede decirse que casi todos los pacientes con enfermedad de Fabry tienen  $\alpha$ -NAGA normalmente. Por lo tanto, se cree que incluso cuando una proteína en la que solamente se modifica la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA en la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -GAL se administra como en un agente enzimático para reemplazo enzimático, la antigenicidad de la misma pocas veces aparece como si se administrara  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, y por lo tanto sustancialmente no existe ninguna probabilidad de que se induzca una reacción inmunitaria adversa tal como un efecto secundario alérgico.

(ii)  $\alpha$ -NAGA actúa en forma de un homodímero como  $\alpha$ -GAL pero en general,  $\alpha$ -NAGA es más estable que  $\alpha$ -GAL tras la formación de homodímeros. El modelo de estructura tridimensional construido por los presentes inventores también sostiene esta estabilidad. Específicamente, se ha confirmado que, tras la formación del dímero de la  $\alpha$ -NAGA humana, se observaron dos enlaces mediante interacción electrostática entre Asp45 y Arg350 en las dos subunidades, mientras que dichos enlaces no se observaron en  $\alpha$ -GAL. En consecuencia, se cree que, al igual que  $\alpha$ -NAGA, un mutante de  $\alpha$ -NAGA, también tiene mayor estabilidad en sangre (en plasma), en comparación con  $\alpha$ -GAL, y es muy adecuado para terapia de reemplazo enzimático. Además, si la proporción de dímero aumenta debido a la estabilidad anterior, se espera que la eficacia de captación por un lisosoma en una célula también se mejore en relación con el punto (iii) posterior. Además, es ventajoso que el efecto pueda mantenerse como una preparación enzimática durante un periodo de tiempo prolongado antes de la administración.

(iii) Es necesario que una enzima usada para terapia de reemplazo enzimático pueda captarse por un lisosoma en una célula de un órgano afectado. En general, el transporte de una membrana celular a un lisosoma se realiza mediante un receptor de M6P independiente de calcio, que reconoce la manosa-6-fosfato (M6P) presente en las partes de la cadena de azúcar de la enzima. En consecuencia, es preferible una enzima que tenga un mayor número de cadenas de azúcares (cadenas de azúcares de tipo N) que permitan la unión con el resto de M6P porque es mayor una eficacia de captación de un lisosoma. Con respecto al número de cadenas de azúcar anteriores, ha resultado evidente, mediante un análisis de estructura cristalina por rayos X, que están presentes tres cadenas de azúcares por subunidad (en tres posiciones, Asn139, Asn192 y Asn215; seis cadenas de azúcares en caso de que se forme un dímero) en  $\alpha$ -GAL. Por el contrario, en  $\alpha$ -NAGA, están presentes cinco cadenas de azúcares por subunidad (diez cadenas de azúcares en caso de que se forme un dímero) (véanse las Figuras 3 y 4). Entre estas cadenas de azúcares, tres cadenas de azúcares (en tres posiciones, Asn124, Asn177 y Asn201) corresponden a las posiciones de las cadenas de azúcares en  $\alpha$ -GAL, y otras dos cadenas de azúcares (en dos posiciones, Asn359 y Asn385) son específicas de  $\alpha$ -NAGA. En consecuencia, se cree que una eficacia de captación de  $\alpha$ -NAGA en sangre por un lisosoma en una célula de un órgano afectado es mayor que en el caso de  $\alpha$ -GAL.

A partir de los puntos de vista anteriores, los presentes inventores se han centrado en el aminoácido 188 (serina (Ser)) y el aminoácido 191 (Ala (alanina)) entre un grupo de restos de aminoácidos que constituye el sitio de unión al sustrato de  $\alpha$ -NAGA. Los presentes inventores han intentado preparar una enzima recombinante (enzima mutante) en la que la serina 188 (Ser) se sustituyó por ácido glutámico (Glu) y la alanina 191 se sustituyó por leucina (Leu). Posteriormente, esta enzima recombinante se expresó usando fibroblastos procedentes de un paciente con enfermedad de Fabry, se recogió y se analizó. Como resultado, se observó alta actividad  $\alpha$ -Gal. Además, la estabilidad de esta enzima recombinante en sangre fue significativamente mayor que la de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre. Usando dicha enzima recombinante con especificidad de sustrato alterada, puede proporcionarse una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Fabry que puede usarse eficazmente para reemplazo enzimático para tratar la enfermedad de Fabry que es superior a las composiciones farmacéuticas existentes.

## 2. Proteína

Una proteína de la presente invención es una proteína que puede usarse como un elemento activo de una composición farmacéutica descrita posteriormente de la invención para tratar la enfermedad de Fabry, especialmente una enzima mutante de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA).

Más específicamente, las proteínas descritas en el presente documento son proteínas de (1a) o (1b) posteriores, preferentemente una proteína de (1c) posterior.

(1a) una proteína que ha adquirido actividad  $\alpha$ -galactosidasa ( $\alpha$ -GAL) alterando la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión a un sustrato) o  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, preferentemente una proteína que tiene la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -GAL.

(1b) una proteína de (1a) anterior con un péptido señal. En este caso, el tipo de péptido señal no está particularmente limitado, y puede ser un péptido señal derivado de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre u otra proteína.

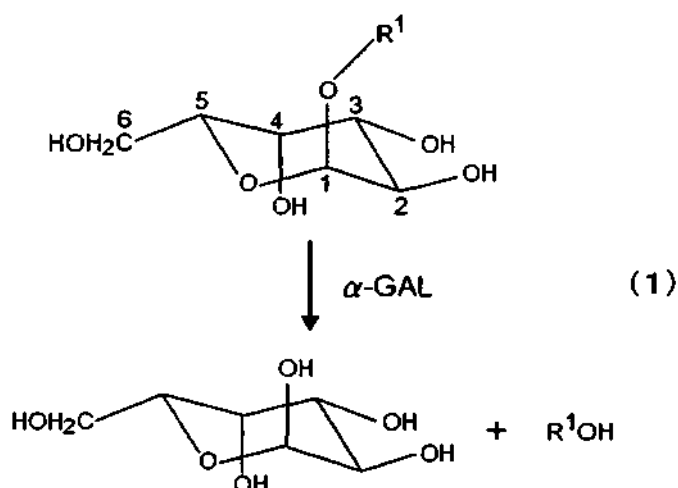
(1c) una proteína de (1b) anterior, en la que el péptido señal deriva de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre.



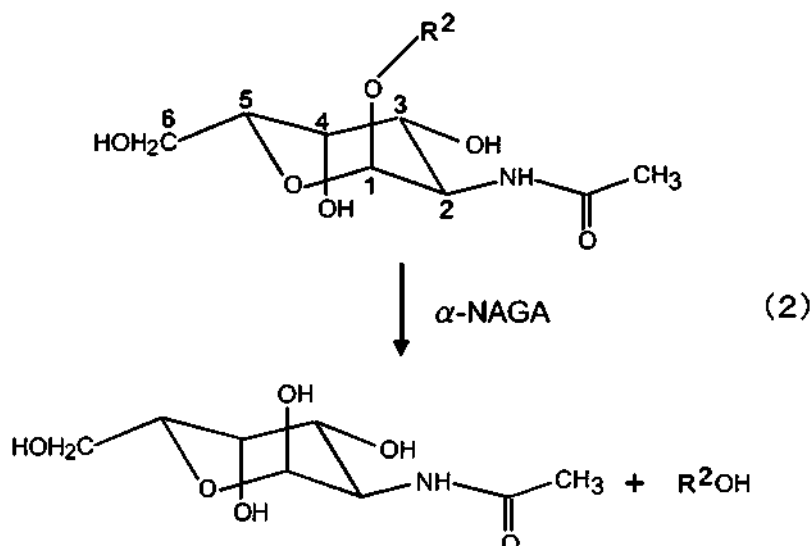
En el presente documento, la frase "actividad  $\alpha$ -GAL adquirida" significa, como ya se ha mencionado anteriormente, que la reactividad de unión con un sustrato de  $\alpha$ -GAL se hace relativamente mayor que la reactividad de unión con un sustrato de  $\alpha$ -NAGA en el sitio de unión al sustrato de  $\alpha$ -NAGA. En consecuencia, la alteración estructural anterior no se limita a una alteración estructural que hace la unión entre  $\alpha$ -NAGA y el sustrato de la misma completamente imposible. Por lo tanto, la alteración estructural puede ser una que haga que la reactividad de unión al sustrato de  $\alpha$ -GAL sea significativamente mayor que la reactividad de unión al sustrato de  $\alpha$ -NAGA, que ha sido originalmente relativamente mayor de un modo significativo, que la reactividad de unión al sustrato de  $\alpha$ -GAL. Además, la expresión "que tiene la especificidad del sustrato de  $\alpha$ -GAL", como ya se ha mencionado anteriormente, significa que la estructura del sitio activo (en particular, las posiciones y los tipos de restos de aminoácidos que desempeñan un papel importante en la reactividad de unión a un sustrato) es la misma que la de  $\alpha$ -GAL.

En la presente invención, la expresión "sustrato de  $\alpha$ -GAL" se refiere a un compuesto natural tal como un glucolípido, por ejemplo, globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida (THC)), que tiene un resto de galactosa unido al extremo no reductor mediante enlace  $\alpha$ , o un compuesto sintético, por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactósido. La expresión "sustrato de  $\alpha$ -NAGA" se refiere a un compuesto natural, tal como un oligosacárido, una glucoproteína o un glucolípido, que tiene un resto de N-acetilgalactosamina unido al extremo no reductor mediante enlace  $\alpha$ , o un compuesto sintético, por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -N-acetil-D-galactosaminida.

En este caso, una reacción catalítica de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre se representa por la fórmula de reacción (1) indicada a continuación, y una reacción catalítica de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre se representa por la fórmula de reacción (2) a continuación.



[En la fórmula de reacción (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 de 4-metilumbeliferilo"].



[En la fórmula de reacción (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”].

Se ha publicado información sobre la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la subunidad de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre (homodímero) y se ha publicado información sobre la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) que codifica la secuencia de aminoácidos anterior, por ejemplo, como “número de referencia: NM\_000262” de GenBank, y se ha registrado en “número de entrada: NAGAB\_HUMAN”, número de referenciar: P17050” con Swiss-Prot (disponible en <http://tw.expasy.org/uniprot/>). De forma similar, se ha publicado información sobre la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 10) de la subunidad de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre (homodímero) e información sobre la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 9) que codifica la secuencia de aminoácidos anterior, por ejemplo, como “número de referencia: NP\_000160” de GenBank, y registrada en “nombre de entrada” AGAL\_HUMAN”, número de referencia: P06280” con Swiss-Prot (disponible en <http://tw.expasy.org/uniprot/>).

Una proteína de la invención es una proteína de (a) o (b) a continuación.

(a) una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, donde el aminoácido 202 se sustituye por ácido glutámico o ácido aspártico y el aminoácido 205 se sustituye por leucina, valina o isoleucina en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6; o

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que de uno a diez aminoácidos distintos de los aminoácidos sustituidos 202 y 205 se suprimen, sustituyen o añaden a las secuencias de aminoácidos descritas en (a) anterior, y donde los aminoácidos 42 a 45, 59, 91 a 95, 131 a 141, 164 a 172, 206, 223 a 234, 256 a 268 y 364 en la secuencias de aminoácidos en (a) no están mutados y que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa.

La secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6 es una secuencia de aminoácidos (con un total de 425 aminoácidos) en la que los aminoácidos 1-17, correspondientes al resto peptídico señal, se alteran por el resto peptídico señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre en una secuencia de aminoácidos compuesta de 411 aminoácidos que constituyen  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, que es una proteína denominada de fusión. En este caso, el resto peptídico señal de la  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, como se ha descrito ya anteriormente, es un resto peptídico de los aminoácidos 1-31 entre la secuencia de aminoácidos que constituye la  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre representada por SEC ID N°: 10.

En la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína de (a) anterior, los restos de aminoácidos 188 y 191 son cada uno de los aminoácidos que constituyen los sitios de unión al sustrato.

Un ejemplo particularmente preferible de la proteína descrita en (a) incluye una proteína en la que “el aminoácido 202” es ácido glutámico mientras que “el aminoácido 205” es leucina. Un ejemplo preferible de dicha proteína incluye una proteína ( $\alpha$ -NAGA(S202E/A205L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL) que tiene la serina 202 sustituida por ácido glutámico y la alanina 205 sustituida por leucina en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6.

La proteína descrita en (b) no está limitada siempre que incluya una secuencia de aminoácidos en la que 1-10, y preferentemente aproximadamente 1-5 aminoácidos distintos del aminoácido o los aminoácidos localizados en el sitio o los sitios sustituidos se suprimen, sustituyen o añaden en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en (a) incluidas en la proteína descrita en (a) anterior, y tiene actividad  $\alpha$ -GAL. En el presente documento, la expresión “el sitio sustituido” se refiere al resto de aminoácido 202 (siempre que la secuencia de aminoácidos esté limitada a la secuencia de aminoácidos descrita en (a) y el resto de aminoácido 205 (siempre que la secuencia de aminoácidos esté limitada a la secuencia de aminoácidos descrita en (a)) entre los 425 restos de aminoácidos que constituyen la secuencias de aminoácidos descritas en (i) a (iii) anteriores.

Obsérvese que es importante que la proteína descrita en (b) anterior sea una proteína que pueda mostrar de forma estable actividad  $\alpha$ -GAL. Por lo tanto, por ejemplo, los restos de aminoácidos que se cree que son importantes para rendimiento de unión (rendimiento de unión a sustrato) con un resto de  $\alpha$ -galactosa de un sustrato de  $\alpha$ -GAL y la reactividad catalítica al sustrato son preferentemente restos de aminoácidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos descritas en (i) a (iii). En particular, dichos restos de aminoácidos incluyen restos de aminoácidos 42-45, 91-95, 131-141, 164-172, 206, 223-234 y 256-268 (en particular, los ácidos aspárticos 170 y 231 (Asp: D) en el sitio catalítico) entre los 425 restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos descritas en (a) anterior.

De forma similar, los restos de aminoácidos que se cree que son importantes para formar un homodímero también están preferentemente no mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos descritas en (a) anterior. Los ejemplos preferibles de dichos restos de aminoácidos incluyen los restos de aminoácidos 59 y 364 (específicamente, el ácido aspártico 59 (Asp: D) y la arginina 364 (Arg: R)) entre los 425 restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos descritas en (a) anterior.

Además, los restos de aminoácidos que son sitios de unión a cadena de azúcar tipo N también están preferentemente no mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de aminoácidos

descritas en (a) anterior. Los ejemplos preferibles de dichos restos de aminoácidos incluyen los restos de aminoácidos 138, 191, 215, 373 y 399 (todos los cuales son asparagina (Asn: N)) entre los 425 restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos descritas en (a) anterior.

5 Con respecto a las proteínas anteriormente descritas de la presente invención, la actividad  $\alpha$ -GAL puede medirse de la siguiente manera. Por ejemplo, se expresa una proteína diana en una célula derivada de un mamífero, tal como una célula CHO o un fibroblasto humano, y se recoge del mismo. La proteína (solución enzimática) se mezcla después con 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactósido (un sustrato sintético obtenido de  $\alpha$ -D-galactosa y 4-metilumbeliferona (sustrato fluorogénico)), y se permite que la mezcla reaccione en una condición ácida. La cantidad de 4-metilumbeliferona liberada se detecta como una cantidad unitaria de la solución enzimática por unidad de tiempo para medir la actividad  $\alpha$ -GAL.

15 La actividad  $\alpha$ -NAGA también puede medirse de la siguiente manera. Se expresa una oportunidad diana y se recoge de una manera similar a la medida para la actividad  $\alpha$ -GAL anterior. La proteína (solución enzimática) se mezcla después con 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -N-acetil-D-galactosaminida (un sustrato sintético obtenido de  $\alpha$ -N-acetil-D-galactosamina y 4-metilumbeliferona (sustrato fluorogénico)), y se permite que la mezcla reaccione en una condición ácida. La cantidad de 4-metilumbeliferona que puede liberarse se detecta como una cantidad unitaria de la solución enzimática por unidad de tiempo para medir la actividad  $\alpha$ -NAGA.

20 En los métodos anteriores para medir la actividad  $\alpha$ -GAL y actividad  $\alpha$ -NAGA, pueden emplearse diversos tipos de métodos de detección conocidos para detectar el sustrato fluorogénico. Por ejemplo, es preferible un método de detección que use un fluorofotómetro o similares. La proteína diana puede expresarse incorporando un gen que codifique la proteína en un vector de expresión conocido o similares, y después introduciendo el vector en una célula.

### 25 3. Gen recombinante

Un gen de la invención codifica la proteína de la invención anteriormente descrita.

30 En la presente invención, el término "codón" se refiere no solamente al enlace de triple base (tripleto) de una secuencia de ARN después de la transcripción sino también al enlace de triple base de una secuencia de ADN. En consecuencia, los codones en el caso de una secuencia de ADN se indican usando timina (T) en lugar de uracilo (U).

35 En el presente documento, con respecto a nucleótidos que representan un codón de cada uno de los aminoácidos anteriores (donde el nucleótido en el extremo izquierdo se define como el nucleótido en el lado 5'), los nucleótidos que representan un codón de ácido glutámico son "gag" o "gaa" (preferentemente "gag"), y los nucleótidos que representan un codón de ácido aspártico son "gat" o "gac". De forma similar, los nucleótidos que representan un codón de leucina son "ctc", "ctt", "cta" o "ctg" (preferentemente "ctc"), los nucleótidos que representan un codón de valina son "ggt", "ggt", "gta" o "gtg", los nucleótidos que representan un codón de isoleucina son "att", "atc" o "ata", los nucleótidos que representan un codón de fenilalanina son "ttt" o "ttc", y los nucleótidos que representan un codón de metionina son "atg". Los nucleótidos que representan un codón de serina incluyen "agt" además de "agc" mencionado anteriormente, y los nucleótidos que representan un codón de alanina incluyen "gct", "gca" y "gcg" además de "gcc" mencionado anteriormente.

45 Dicho ADN mutante puede prepararse de acuerdo con un método de mutagénesis dirigida descrito en, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997). Específicamente, dicho ADN puede prepararse por un método conocido tal como un método de Kunkel o un método de doble cadena con huecos usado un kit para introducir una mutación que utilice el método de mutagénesis dirigida. Los ejemplos preferibles del kit incluyen el Kit de Mutagénesis Dirigida QuickChange™ (fabricado por Stratagene), el Sistema de Mutagénesis Dirigida GeneTailor™ (fabricado por Invitrogen Corporation), y el Sistema de Mutagénesis Dirigida TaKaRa (por ejemplo, Mutan-K o Mutan-Super Express Km: fabricado por Takara Bio Inc.).

55 Como alternativa, como se describe en los Ejemplos posteriores, dicho ADN puede prepararse realizando PCR en condiciones apropiadas usando cebadores de PCR diseñados de modo que se introduzca una mutación de sentido erróneo para proporcionar nucleótidos que representen un codón de un aminoácido deseado, y usando, como un molde, por ejemplo, ADN que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre. Una ADN polimerasa usada para la PCR no está limitada, pero es preferible un ADN polimerasa con alta precisión. Los ejemplos preferibles de la misma incluyen ADN polimerasa Pwo (Polimerasa Roche Diagnostics K.K.), ADN polimerasa Pfu (Promega), ADN polimerasa Pfx platinum (Invitrogen Corporation), ADN polimerasa KOD (Toyobo Co., Ltd.) y polimerasa KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.). Las condiciones de reacción para la PCR pueden determinarse de forma apropiada de acuerdo con, por ejemplo, la temperatura óptima de la ADN polimerasa usada, y la longitud y el tipo de ADN para sintetizar. Por ejemplo, las condiciones preferibles incluyen un total de 20 a 200 ciclos de "5 a 30 segundos de 90 °C a 98 °C (desnaturalización y disociación térmicas) → 5 a 30 segundos de 50 °C a 65 °C

(hibridación) → 30 a 1.200 segundos de 65 °C a 80 °C (síntesis y elongación)".

Puede obtenerse ADN de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica por un método de hibridación conocido tal como hibridación de colonias, hibridación en placa o transferencia de Southern, ADN compuesto de una secuencia de nucleótidos complementaria de este ADN, o un fragmento de la misma como una sonda. Puede prepararse una biblioteca por un método conocido, o puede usarse una biblioteca de ADNc o biblioteca genómica disponible en el mercado. La biblioteca no está limitada a las mismas.

Con respecto a un procedimiento detallado del método de hibridación, refiérase a, por ejemplo, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) según sea necesario.

La expresión "condiciones rigurosas" usadas para realizar un método de hibridación se refiere a condiciones durante el lavado después de hibridación, y específicamente, una concentración salina 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 salina 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 las condiciones rigurosas incluye 80 mM a 50 °C. Además de la concentración salina, la temperatura y similares, al considerar otras condiciones tales como la concentración de sonda, la longitud de la sonda y el tiempo de reacción también pueden considerarse para determinar de forma apropiada las condiciones para obtener ADN.

El ADN para hibridar es una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de preferentemente al menos 40% o más, más preferentemente 60% o más, aún más preferentemente 90% o más, particularmente preferentemente 95% o más, y más preferentemente 99% o más en relación con la secuencia de nucleótidos del ADN de interés.

Además, los nucleótidos pueden ser los mismos que los nucleótidos en el sitio sustituido anteriormente en la posición correspondiente.

En el presente documento, la expresión "sitio sustituido" se refiere a un sitio de la sustitución de nucleótidos realizada en las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Específicamente, la expresión se refiere a un sitio de nucleótidos (triplete) que representa un codón de sustitución provocado por la sustitución de nucleótidos.

Además, los "nucleótidos" en la expresión "nucleótidos correspondientes a los nucleótidos en el sitio sustituido" se refieren a nucleótidos (triplete) que se sitúan opuestos a nucleótidos (tripletes) complementarios de los nucleótidos en el sitio sustituido en un híbrido preparado hibridando el ADN con una cadena complementaria del ADN descrito en el presente documento.

Un gen de la invención puede ser un gen que codifique la proteína de la invención como se ha descrito anteriormente.

Los ejemplos preferibles de un gen de la invención también incluyen genes que incluyen ADN descrito en (2a) posterior que codifican una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa. Aunque los ADN descritos en (2a) son preferentemente genes estructurales de la proteína de la presente invención, el gen que incluye este ADN no se limita a los mismos y puede consistir en el ADN solamente o puede contener el ADN junto con otras secuencias de nucleótidos conocidas requeridas para la expresión génica (tales como un promotor transcripcional, secuencia de SD, secuencia de Kozak y un terminador).

(2a) El ADN que contiene las secuencias de nucleótidos de SEC ID N°: 5 donde los nucleótidos 604-606, "agc", de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 5 se sustituyen por nucleótidos que representan un codón de ácido glutámico o ácido aspártico, y los nucleótidos 613-615, "gcc", se sustituyen por nucleótidos que representan un codón de leucina, valina o isoleucina y donde los nucleótidos 124 a 135, 175 a 177, 271 a 285, 391 a 423, 490 a 516, 616 a 618, 667 a 702, 766 a 804 y 1.090 a 1.092 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 no están mutados.

También se describe en el presente documento (2b) ADN que codifica una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa y que hibrida con ADN compuesto de una secuencia de nucleótidos complementaria de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos descrita en (2a) anterior en condiciones rigurosas, donde los nucleótidos son iguales que los nucleótidos en el sitio sustituido anterior en la posición correspondiente.

La secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 5 es una secuencia de nucleótidos que tiene los nucleótidos 1-51 que codifican un resto de péptido señal de una secuencia de nucleótidos compuesta de 1.236 nucleótidos que codifican  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre alterada por una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, concretamente, una secuencia de nucleótidos que codifica una llamada proteína de fusión. Aquí, la secuencia de nucleótidos que codifica el resto de péptido señal de la  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, como ya se ha descrito anteriormente, es una secuencia de nucleótidos 1-93 de la secuencia de nucleótidos que codifica  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre representada por SEC ID N°: 9.

En el presente documento, la explicación para el ADN descrito anteriormente se aplica de forma similar a los nucleótidos que representan un codón de cada uno de los aminoácidos anteriores.

Un ejemplo particularmente preferible del ADN descrito en (2a) anterior incluye ADN en el que “los nucleótidos que representan un codón de ácido glutámico o ácido aspártico” son nucleótidos que representan un codón de ácido glutámico, y “los nucleótidos que representan un codón de leucina, valina o isoleucina” son nucleótidos que representan un codón de leucina. Un ejemplo preferible de dicho ADN es ADN compuesto de una secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 7) en la que los nucleótidos 604-606 que representan un codón de serina se sustituyen por nucleótidos que representan un codón de ácido glutámico (“agc” → “gag”), y los nucleótidos 613-615 que representan un codón de alanina se sustituyen por nucleótidos que representan un codón de leucina (“gcc” → “ctc”) en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 5. En este ejemplo, los nucleótidos 604-606 después de la sustitución no están limitados y pueden ser nucleótidos distintos de “gag” mencionado anteriormente siempre que representen un codón de ácido glutámico. De forma similar, los nucleótidos 613-615 después de la sustitución no están limitados y pueden ser nucleótidos distintos de “ctc” mencionado anteriormente siempre que representen un codón de leucina.

Con respecto a la preparación de dicho mutante de ADN de tipo sustituido, es válida la explicación para el ADN descrito anteriormente de forma similar.

El ADN descrito en (2b) anterior puede obtenerse de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica por un método de hibridación conocido usando ADN descrito en (2a). El ADN compuesto de una secuencia de nucleótidos complementaria de este ADN, o un fragmento de la misma como una sonda. Con respecto al tipo, procedimiento y las condiciones de la hibridación así como cada biblioteca, es válida la explicación para el ADN descrito anteriormente de forma similar.

El ADN para hibridar tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de preferentemente al menos 40% o más, más preferentemente 60% o más, aún más preferentemente 90% o más, particularmente preferentemente 95% o más y más preferentemente 99% o más con la secuencia de nucleótidos del ADN descrito en (2a) anterior.

Además, en el ADN descrito en (2b) anterior, los nucleótidos son iguales que los nucleótidos en el sitio sustituido anteriormente en la posición correspondiente.

En el presente documento, la expresión “sitio sustituido” se refiere a un sitio de la sustitución de nucleótidos realizada en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a) anterior. Específicamente, la expresión se refiere a un sitio de nucleótidos (tripleto) que representa un codón alterado resultante de la sustitución de nucleótidos. Más específicamente, la expresión “sitio sustituido” se refiere a los nucleótidos 604-606 (siempre que la secuencia de nucleótidos esté limitada a las secuencias de nucleótidos descritas en (2a)), y los nucleótidos 613-615 (siempre que la secuencia de nucleótidos esté limitada a las secuencias de nucleótidos descritas en (2a)) entre los 1.275 nucleótidos que constituyen las secuencias de nucleótidos descritas en (2a).

Además, los “nucleótidos” en la expresión “nucleótidos correspondientes a los nucleótidos en el sitio sustituido” se refieren a nucleótidos (tripleto) que se sitúan opuestos a nucleótidos (tripleto) complementarios de los nucleótidos en el sitio sustituido en un híbrido preparado hibridando el ADN descrito en (2b) anterior con una cadena complementaria del ADN descrito en (2a) anterior. Por ejemplo, cuando la secuencia de nucleótidos del ADN descrito en (2b) anterior no tiene una mutación tal como delección o adición, en comparación con el ADN descrito en (2a) (es decir, cuando las longitudes (los números de nucleótidos) de ambos ADN son iguales), los nucleótidos 604-606 y/o los nucleótidos 613-615 de la secuencia de nucleótidos del ADN descrito en (2b) son los “nucleótidos” en la expresión “nucleótidos correspondientes a los nucleótidos en el sitio sustituido”.

Es importante que el ADN descrito en (2b) anterior sea ADN que codifique una proteína que tenga actividad  $\alpha$ -GAL. Por lo tanto, por ejemplo, nucleótidos que representan un codón de un resto de aminoácido que se cree que es importante para el rendimiento de unión (rendimiento de unión a sustrato) con un resto de  $\alpha$ -galactosa de un sustrato de  $\alpha$ -GAL y la reactividad catalítica al sustrato son preferentemente nucleótidos que no están mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a). Los ejemplos preferibles de dichos nucleótidos de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a) incluyen los nucleótidos 124-135 (4 codones), 271-285 (5 codones), 391-423 (11 codones), 490-516 (9 codones), 616-618 (1 codón), 667-702 (12 codones) y 766-804 (13 codones) entre las secuencias de nucleótidos descritas en (i) a (iii) anteriores. Entre estos nucleótidos, los nucleótidos 508-510 y 691-693, que representan codones de restos de aminoácidos en un sitio catalítico, son particularmente preferibles.

Además, en el ADN descrito en (2b) anterior, los nucleótidos que representan un codón de un resto de aminoácido que se cree que es importante para formar un homodímero también están preferentemente no mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a). Los ejemplos preferibles de dichos nucleótidos de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a) incluyen los nucleótidos 175-177 y 1.090-1.092 entre las secuencias de nucleótidos.

Además, en el ADN descrito en (2b) anterior, los nucleótidos que representan un codón de un resto de aminoácido como un sitio de unión a cadena de azúcar de tipo N también están preferentemente no mutados (suprimidos, sustituidos o añadidos) a partir de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a) anteriores. Los ejemplos preferibles de dichos nucleótidos de las secuencias de nucleótidos descritas en (2a) anteriores incluyen los nucleótidos 412-414, 571-573, 643-645, 1.117-1.119 y 1.195-1.197 entre las secuencias de nucleótidos.

Un ejemplo particularmente preferible del ADN descrito en (2b) anterior es ADN compuesto de una secuencia de nucleótidos que no es completamente idéntica a la secuencia de nucleótidos del ADN descrito en (2a) anterior pero que es completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos después de la traducción (es decir, ADN obtenido realizando una mutación silenciosa en el ADN descrito en (2a) anterior).

Con respecto al gen descrito anteriormente que codifica la proteína de la presente invención, los codones correspondientes a cada uno de los aminoácidos después de la traducción no están particularmente limitados. En consecuencia, el gen que codifica la proteína de la presente invención puede contener ADN que representa codones que se usan en general (preferentemente, codones cuya frecuencia de uso es alta) en un mamífero tal como ser humano después de la transcripción, o ADN que representa codones que se usan en general (preferentemente, codones cuya frecuencia de uso es alta) en, por ejemplo, un microorganismo tal como *E. coli* o levadura o una planta después de la transcripción.

#### 4. Vector recombinante y transformante

En general, para expresar la proteína de la presente invención, en primer lugar, se construyó un vector recombinante introduciendo el gen anteriormente descrito de la presente invención en un vector de expresión. En esta etapa, según sea necesario, puede unirse un promotor de la transcripción, secuencia de SD (en caso de que un hospedador sea una célula procariota) y secuencia de Kozak (en caso de que un hospedador sea una célula eucariota) cadena arriba del gen para incorporar en el vector de expresión, previamente. Como alternativa, un terminador puede unirse cadena abajo del gen previamente. Además, un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de adición de poli A, un marcador selectivo y similares también pueden añadirse previamente. Los elementos anteriores, tales como un promotor de la transcripción, requeridos para expresar un gen pueden estar contenidos en el gen desde el comienzo. En caso de que estos elementos estén contenidos en el vector de expresión desde el comienzo, estos pueden utilizarse. Las realizaciones de uso de los elementos no están particularmente limitadas.

Como un método para incorporar el gen en un vector de expresión, pueden emplearse diversos tipos de métodos usando una técnica de recombinación génica conocida, por ejemplo, un método que use una enzima de restricción o un método que use una topoisomerasa. El vector de expresión no está limitado siempre que pueda conservar un gen que codifique una proteína de la presente invención, siendo los ejemplos ADN plasmídico, ADN de bacteriófago, ADN de retrotransposón, un vector de retrovirus y ADN de cromosoma artificial. Un vector adecuado para una célula hospedadora usada puede seleccionarse y usarse de forma apropiada.

Posteriormente, el vector recombinante construido se introduce en un hospedador para obtener un transformante, y el transformante se cultiva. Por lo tanto, la proteína de la presente invención puede expresarse. El término "transformante" usado en la presente invención se refiere a un producto resultante de la introducción de un gen ajeno en un hospedador. Por ejemplo, el transformante incluye un producto en el que se introduce un gen ajeno introduciendo ADN plasmídico o similares en un hospedador (transformación) y un producto en el que se introduce un gen ajeno infectando un hospedador con un virus o un fago (transducción).

El hospedador no está limitado siempre que el hospedador pueda expresar una proteína de la presente invención después de introducción del vector recombinante, y pueda seleccionarse de forma apropiada. Los ejemplos del hospedador incluyen hospedadores conocidos tales como células animales, por ejemplo, una célula humana y una célula de ratón, células vegetales, bacterias, levaduras y similares.

Cuando se usa una célula animal como hospedador, por ejemplo, se usa un fibroblasto humano, una célula CHO, una célula COS-7 de simio, Vero, una célula L de ratón, GH3 de rata o una célula FL humana. Como alternativa, también pueden usarse células de insecto tales como una célula Sf9 o una célula Sf21.

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

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

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

El método para obtener un transformante no está limitado y puede seleccionarse de forma apropiada teniendo en cuenta la combinación de los tipos de un hospedador y un vector de expresión usados. Los ejemplos preferibles del método incluyen un método de electroporación, un método de lipofección, un método de choque térmico, un método

de PEG, un método de fosfato cálcico, un método de DEAE-dextrano y un método para infectar un virus tal como un virus de ADN o un virus de ARN.

5 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 a o diferente del tipo de codón de un hospedador que de hecho se usa.

#### 5. Método para producir proteína

10 Puede producirse una proteína de la presente invención (una proteína que tenga actividad  $\alpha$ -GAL), por ejemplo, alterando la estructura del sitio activo (en particular, el sitio de unión a sustrato) de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre de modo que se pueda unir con el mismo un sustrato de  $\alpha$ -GAL. Si el sustrato de  $\alpha$ -GAL puede unirse con el sitio activo, el sustrato puede hidrolizarse mediante catálisis por el sitio catalítico de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre.

15 Dicha alteración estructural se realiza de la siguiente manera. Por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que constituye el sitio activo (sitio de unión a sustrato) de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, (i) la serina 188 se sustituye por otro aminoácido tal como ácido glutámico o ácido aspártico, (ii) la alanina 191 se sustituye por otro aminoácido tal como leucina, valina, isoleucina, fenilalanina o metionina, o (iii) tanto la serina 188 como la alanina 191 se sustituyen como se ha descrito en (i) y (ii) anteriormente por una técnica de recombinación génica. La alteración estructural puede conseguirse realizando la estructura de la cadena o las cadenas laterales del aminoácido o los aminoácidos después del reemplazo a partir de la de antes del reemplazo. En consecuencia, la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre puede alterarse. En particular, la alteración estructural anteriormente descrita se realiza preferentemente sustituyendo la serina 188 con ácido glutámico y la alanina 191 con leucina. Por lo tanto, la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -GAL puede transmitirse a  $\alpha$ -NAGA. En la alteración estructural anterior, una sustitución de aminoácidos que proporciona una alteración de estructura significativa es la sustitución de la alanina 25 191 con leucina o similares. Más específicamente, la cadena lateral del aminoácido 191 se altera de “-CH<sub>3</sub>”, es decir, la cadena lateral de alanina, a una cadena lateral voluminosa, tal como “-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>”, es decir, la cadena lateral de leucina. Como resultado, el espacio del sitio activo donde el grupo de N-acetilo en un sustrato de  $\alpha$ -NAGA va a incorporarse está restringido, reduciendo de este modo el rendimiento de unión de la proteína con el sustrato. En su lugar, el rendimiento de unión con un sustrato de  $\alpha$ -GAL aumenta en consecuencia.

30 El método anteriormente descrito para producir una proteína de la invención puede llevarse a cabo, sin limitación, usando  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre que contiene el péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, como el  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre para someter a alteración estructural, o el método puede llevarse a cabo mediante una etapa de adición (unión) de un péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre a un mutante de  $\alpha$ -NAGA obtenido por alteración estructural o, si el mutante de  $\alpha$ -NAGA incluye un péptido señal de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre, mediante una etapa de reemplazo 35 de este péptido señal con un péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre.

40 Por lo tanto, un ejemplo preferible de un método para producir la proteína de la invención incluye un método para producir una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -GAL, que comprende alterar la estructura del sitio activo de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa humana de tipo silvestre que incluye un péptido señal de  $\alpha$ -galactosidasa humana de tipo silvestre de modo que pueda unirse con el mismo un sustrato de  $\alpha$ -galactosidasa.

45 Además, un ejemplo preferible de un método para producir la proteína de la invención también incluye un método para producir una proteína que tenga actividad  $\alpha$ -GAL, que comprenda añadir (unir) un péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre a una proteína que tenga la estructura del sitio activo de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre alterado de modo que pueda unirse con el mismo un sustrato de  $\alpha$ -GAL, o que comprenda reemplazar un resto del péptido señal de una proteína que tiene la estructura del sitio activo de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre alterado de modo que un sustrato de  $\alpha$ -GAL pueda unir el mismo con un péptido señal de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre.

50 El reemplazo anteriormente mencionado del resto del péptido señal puede llevarse a cabo de acuerdo con una técnica de recombinación génica convencional usando información de secuencia de nucleótidos e información de secuencia de aminoácidos conocidas sobre  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre y  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre.

55 La proteína de la presente invención puede producirse específicamente por un método que incluye una etapa de cultivar el transformante anteriormente descrito y una etapa de recoger una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa del producto cultivado resultante. En el presente documento, la expresión “producto cultivado” se refiere a todo de un sobrenadante de cultivo, células cultivadas, bacterias cultivadas, residuos celulares y residuos bacterianos. El cultivo del transformante puede realizarse de acuerdo con un método general usado para cultivar un hospedador. La proteína diana se acumula dentro del producto cultivado.

60 Como medio usado para el cultivo, puede usarse cualquier medio natural o sintético conocido siempre que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y similares que puedan utilizarse por el hospedador, y siempre que el transformante pueda cultivarse eficazmente.

Para evitar la pérdida de un vector recombinante contenido en el transformante y pérdida de un gen que codifica una proteína diana, el cultivo puede realizarse bajo presión de selección. Específicamente, en caso de que un marcador selectivo sea un gen de resistencia a fármaco, puede añadirse un fármaco correspondiente al medio. En caso de que un marcador selectivo sea un gen complementario auxotrófico, puede retirarse un factor nutricional correspondiente del medio. Por ejemplo, en caso de que se cultive un fibroblasto humano transducido con un vector que contiene el gen resistente a G418, puede añadirse G418 (sulfato de G418) durante el cultivo, según sea necesario.

En caso de que se cultive un transformante o similar transformado con un vector de expresión que use un promotor inducible como un promotor, puede añadirse al medio un inductor favorable (por ejemplo, IPTG), según sea necesario.

Las condiciones para cultivar el transformante no están particularmente limitadas siempre que no se interfiera con la productividad de la proteína diana y el crecimiento del hospedador. 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 durante 5 a 100 horas. El pH puede ajustarse usando un ácido inorgánico u orgánico, una solución alcalina o similares. Los ejemplos del método de cultivo incluyen cultivo sólido, cultivo estático, cultivo en agitación y cultivo en agitación-aireación.

Una vez que se ha producido la proteína diana en bacterias o en células al final del cultivo, la proteína diana puede recogerse rompiendo las bacterias o las células. Como un método para romper las bacterias de las células, por ejemplo, puede emplearse un tratamiento de 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, peptinasa o similares, un tratamiento de congelación-descongelación, un tratamiento con una solución hipotónica o un tratamiento inductor de bacteriolisis usando un fago. Después de la rotura, los restos de la rotura (que contienen una fracción insoluble de un extracto celular) de las bacterias o las células puede retirarse, según sea necesario. Los ejemplos del método para retirar el resto incluyen separación por centrifuga y filtración. La eficacia de la retirada de los restos puede aumentarse usando, por ejemplo, un floculante o un coadyuvante de filtración, según sea necesario. El sobrenadante obtenido después de la retirada del resto es una fracción soluble del extracto celular, y puede usarse como una solución de proteína en bruto.

Cuando la proteína diana se produce en bacterias o en células, como alternativa, las bacterias de las células en sí mismas pueden recogerse por separación por centrifuga, separación por membrana o similares, y usarse sin romper.

Por otro lado, cuando la proteína diana se produce fuera de las bacterias o fuera de las células, el medio se usó directamente, o las bacterias o las células se retiran por separación por centrifuga, filtración o similares. Posteriormente, la proteína diana se recoge del producto cultivado por extracción mediante precipitación con sulfato de amonio, según sea necesario, y se aísla adicionalmente y se purifica por diálisis y cromatografía (tal como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de afinidad).

Cuando la proteína diana se produce usando bacterias o células (en o fuera de las bacterias o células) como se ha descrito anteriormente, el resto del péptido señal se retira en general tras el transporte desde el retículo endoplásmico dentro de las bacterias o células al citoplasma o tras la secreción fuera de las bacterias o células, dejando una proteína madura para recoger sin el resto de péptido señal. La presente invención, sin embargo, no se limita a esto y, por ejemplo, una proteína que tenga dos o más restos de péptido señal (consecutivos) requeridos para el transporte del retículo endoplásmico al citoplasma o para la secreción fuera de las bacterias o células puede expresarse de modo que se recoja una proteína que tenga al menos un resto de péptido señal restante después del transporte o secreción. En este caso, si la proteína diana resultante fuera a usarse como un elemento activo de una composición farmacéutica o similares, el resto de péptido señal puede, por ejemplo, escindirse o degradarse con una enzima para usar la proteína en una forma de proteína madura.

El rendimiento de producción de una proteína obtenida cultivando un transformante o similares puede determinarse, por ejemplo, por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) con respecto a unidad por solución de cultivo, por peso húmedo o peso seco de bacterias, por proteína en una solución enzimática en bruto, o similares.

Además del sistema de síntesis de proteínas usando un transformante descrito anteriormente, puede producirse una proteína diana usando un sistema de síntesis de proteínas sin células en el que no se usan células vivas.

El sistema de síntesis de proteínas sin 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 sin células que puede usarse también incluye un sistema de transcripción sin células en el que se sintetiza ARN usando ADN como un molde.

En este caso, el extracto celular usado deriva preferentemente de la célula hospedadora descrita anteriormente. Los ejemplos del extracto celular que puede usarse incluyen extractos derivados de células eucariotas y células procariotas, más específicamente, 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 puede, sin limitación, concentrarse o diluirse tras su uso, o se puede usar sin tratamiento adicional.

El extracto celular puede obtenerse, por ejemplo, por ultrafiltración, diálisis o precipitación con polietilenglicol (PEG).

Como alternativa, dicha síntesis de proteínas sin células puede realizarse usando un kit disponible en el mercado. Los ejemplos del kit incluyen un kit de reactivo PROTEIOS™ (Toyobo Co., Ltd.), Sistema TNT™ (Promega), un dispositivo de síntesis PG-Mate™ (Toyobo Co., Ltd.) y RTS (Roche Diagnostics K.K.).

La proteína diana producida por síntesis de proteínas sin células puede purificarse como se ha descrito anteriormente seleccionando apropiadamente medios tales como cromatografía.

## 6. Composición farmacéutica para tratar enfermedad de Fabry

### (i) Composición farmacéutica como agente enzimático usado para reemplazo enzimático o similares

Como se ha descrito anteriormente, la proteína de la presente invención puede ejercer diversos excelentes efectos con respecto al tratamiento de enfermedad de Fabry, y por lo tanto puede usarse preferentemente como un elemento activo de una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Fabry (un agente terapéutico para enfermedad de Fabry). En otras palabras, una composición farmacéutica para tratar enfermedad de Fabry puede comprender la proteína anteriormente descrita de la presente invención. Preferentemente, la composición farmacéutica está específicamente en una forma de un agente enzimático que puede usarse para terapia de reemplazo enzimático.

La proteína de la presente invención, que actúa como un elemento activo en la composición farmacéutica, puede usarse, sin limitación, en forma de una sal, un hidrato o similares, según sea necesario, o en un estado modificado químicamente de forma apropiada teniendo en cuenta la estabilidad del almacenamiento (particularmente para mantener la actividad enzimática) como un agente terapéutico.

La composición farmacéutica puede contener componentes distintos de la proteína de la presente invención. Los ejemplos de los otros componentes incluyen diversos tipos de componentes farmacéuticamente aceptables (tales como diversos tipos de vehículo farmacológicamente aceptables) que se requieren de acuerdo con el uso (la realización de uso) de la composición farmacéutica. Los otros componentes pueden estar contenidos apropiadamente de modo que los efectos conseguidos por la proteína de la presente invención y similares no se alteren.

En caso de que la composición farmacéutica se use como un agente enzimático para reemplazo enzimático, la relación de mezcla de la proteína de la presente invención y los tipos y relaciones de mezcla de otros componentes usados pueden determinarse de forma apropiada de acuerdo con un método para preparar un agente enzimático conocido para reemplazo enzimático (en particular, un agente enzimático usado para terapia de reemplazo enzimático para enfermedad de Fabry).

El método para administrar la composición farmacéutica no está limitado. Cuando la composición farmacéutica es un agente enzimático usado para reemplazo enzimático, se usa en general administración parenteral tal como goteo intravenoso. Puede prepararse una preparación farmacéutica que puede usarse en diversos métodos de administración tales como administración parenteral seleccionando y usando de forma apropiada un excipiente, una carga, un diluyente, un aglutinante, un humectante, un disgregante, un lubricante, un tensioactivo, un dispersante, un tampón, un conservante, un solubilizador, un antiséptico, un agente saporífero, un lenitivo, un agente estabilizante, un agente de isotonicidad o similares, todos los cuales se usan en general en la producción de medicinas de acuerdo con un método rutinario.

La forma de la composición farmacéutica no está limitada. Cuando la composición farmacéutica es un agente enzimático usado para reemplazo enzimático, se usa en general una inyección intravenosa (incluyendo infusión por goteo). Por ejemplo, la composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de, por ejemplo, una ampolla de una única dosis o un recipiente multidosis.

En general, la dosificación de la composición farmacéutica puede determinarse de forma apropiada en un amplio intervalo teniendo en cuenta la relación de mezcla del elemento activo en la preparación farmacéutica así como la edad y el peso corporal del sujeto (paciente) al que se va a administrar la composición farmacéutica, el tipo, la condición y similares de la enfermedad, además de la vía de administración, el número de administraciones, el periodo de administración y similares. En particular, en caso de que la composición farmacéutica sea un agente enzimático para reemplazo enzimático, el número de dosis es preferentemente de aproximadamente uno cada dos o cuatro semanas, mientras que la cantidad del mismo por dosis es tal que la proteína o similar (enzima recombinante) de la presente invención, como un elemento activo, se administra, por ejemplo, para preferentemente de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg, y aún más preferentemente de aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg en relación con el peso corporal de un paciente.

En la presente invención, la proteína (enzima recombinante) de la presente invención, que actúa como un elemento activo, es excelente en su estabilidad en sangre y la eficacia de captación de la misma por una célula de un órgano afectado es alta. Por lo tanto, incluso cuando la proteína se usa en una cantidad menor que una proteína convencional, el efecto del reemplazo enzimático puede ser igual que o más fuerte que el conseguido con la proteína convencional. Además, dado que los efectos secundarios alérgicos son insignificantes, las cargas físicas, mentales y económicas en los pacientes pueden reducirse notablemente.

#### (ii) Composición farmacéutica como agente terapéutico génico

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

En caso de que se use la composición farmacéutica como un agente terapéutico génico, puede emplearse un método en el que el gen se administra directamente por inyección, o un método en el que se administra un vector que incorpora un ácido nucleico. Los ejemplos del vector incluyen un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado, un vector del virus del herpes, un vector de virus vaccinia, un vector retroviral y un vector de lentivirus. Usando estos vectores virales, el agente terapéutico génico puede administrarse eficazmente. También puede usarse un kit de transferencia génica disponible en el mercado (por ejemplo, nombre del producto: AdenoExpress, fabricado por Clontech).

Además, en caso de que se use la composición farmacéutica como un agente terapéutico génico, la composición puede introducirse en un retículo endoplásmico de fosfolípidos tal como un liposoma, y el retículo endoplásmico puede administrarse. Específicamente, un retículo endoplásmico que conserva un gen de la presente invención se introduce en una célula predeterminada por un método de lipofección. La célula resultante se administra después, por ejemplo, por vía intravenosa o por vía intraarterial. Como alternativa, dicha célula puede administrarse localmente a un órgano afectado por enfermedad de Fabry. Por ejemplo, en caso de que la composición farmacéutica se administre a un adulto, la dosis es preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 1.000 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg al día en relación con el peso corporal del paciente.

#### 7. Método de tratamiento de enfermedad de Fabry

Un método de tratamiento de enfermedad de Fabry puede comprender administrar la composición farmacéutica descrita anteriormente a un paciente con enfermedad de Fabry. También se describe en el presente documento el uso de la composición farmacéutica para tratar enfermedad de Fabry, y el uso de la composición farmacéutica o la proteína de la presente invención para producir un fármaco para tratar la enfermedad de Fabry.

La composición farmacéutica usada en el método terapéutico descrito en el presente documento puede ser una composición farmacéutica que contenga una proteína de la presente invención ("sección 6 (i)" anterior), una composición farmacéutica que contiene un gen de la presente ("sección 6 (ii)" anterior), o una combinación de estas composiciones farmacéuticas que pueden seleccionarse apropiadamente, sin limitación, teniendo en cuenta el estado del paciente, la presencia o ausencia de efectos secundarios adversos, el efecto de administración y similares. Aquí, cada una de las composiciones farmacéuticas para administrar a un paciente con enfermedad de Fabry se administra preferentemente en la realización de uso como un agente enzimático para reemplazo enzimático o como un agente terapéutico génico descrito anteriormente.

En particular, cuando las composiciones farmacéuticas se usan en combinación como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, la proporción de dosificación, el número de dosis y el periodo de administración de cada una de las composiciones farmacéuticas pueden determinarse de forma apropiada para ajustarse a cada paciente. Por ejemplo, un método preferible y dosis para administración de cada una de las composiciones farmacéuticas y similares son como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se describirá ahora más específicamente por medio de Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los mismos.

[Ejemplo 1]

<Selección del sitio de mutación para introducir en  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA)>

Para diseñar una nueva enzima en la que la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA humana se altera por una especificidad de sustrato similar a la de  $\alpha$ -GAL humana, los sitios de mutación (posición de aminoácidos) para introducir en  $\alpha$ -NAGA humana se determinaron por comparación y estudio usando modelos estructurales

tridimensionales de las proteínas. Los procedimientos y resultados de la determinación se describen específicamente a continuación.

### 1. Datos usados

Se usaron los datos de secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -NAGA humana y  $\alpha$ -GAL humana registrados con Swiss-Prot como se muestra posteriormente (véase Tabla 1). Se usaron los datos de estructuras tridimensionales de las proteínas  $\alpha$ -NAGA de pollo y  $\alpha$ -GAL humana registradas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) como se muestra posteriormente (véase Tabla 2).

#### (1) Datos de secuencias de aminoácidos

Base de datos usada: Swiss-Prot (<http://tw.expasy.org/uniprot/>)

Tabla 1		
	nombre de la entrada	número de referencia
$\alpha$ -NAGA Humana	NAGAB_HUMAN	P17050
$\alpha$ -GAL Humana	AGAL_HUMAN	P06280

#### (2) Datos estructurales tridimensionales de proteínas

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

Tabla 2		PDB ID
$\alpha$ -NAGA de Pollo	1KTC (véase *1 posterior)	
$\alpha$ -GAL Humana	1R47 (véase *2 posterior)	

\*1: Garman SC *et al.*, Structure (Camb), 2002, 10(3): 425-34.

\*2: Garman SC *et al.*, J. Mol. Biol., 2004, 19; 337(2): 319-35.

### 2. Construcción del modelo estructural tridimensional de $\alpha$ -NAGA humana

Se construyó un modelo de estructura tridimensional de  $\alpha$ -NAGA humana basándose en la estructura de  $\alpha$ -NAGA de pollo usando un método existente, un método de modelización de homología (véase Sutcliffe MJ *et al.*, Prot. Eng., 1987, 1, 377-84; y Sutcliffe MJ *et al.*, Prot. Eng., 1987, 1, 385-92). La estructura de  $\alpha$ -NAGA de pollo (complejo sustrato) registrada en la PDB se usó como una estructura de un molde usado para modelización de homología. El grado de coincidencia (identidad) de aminoácidos entre  $\alpha$ -NAGA humana y  $\alpha$ -NAGA de pollo es del 75%, lo que satisface la condición (identidad  $\geq 30\%$ ) para construir un modelo estructural por el método de modelización de homología. La construcción de un modelo estructural por el método de modelización de homología se realizó usando software existente MODELLER (disponible mediante acceso a la Web de MODELLER CBSU (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/modeller.aspx>)). Además, se construyó un modelo de un complejo sustrato de  $\alpha$ -NAGA humana adaptando un sustrato unido a  $\alpha$ -NAGA de pollo en el modelo estructural construido de  $\alpha$ -NAGA humana de acuerdo con la posición del sustrato.

### 3. Comparación de estructuras tridimensionales que contribuyen a la especificidad de sustrato de $\alpha$ -GAL humana y la de $\alpha$ -NAGA humana

La estructura tridimensional de  $\alpha$ -NAGA humana es similar a la de  $\alpha$ -GAL humana, y los dominios catalíticos tanto de  $\alpha$ -NAGA humana como de  $\alpha$ -GAL humana tienen una estructura de barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>. Los restos de aminoácidos (restos catalíticos) requeridos para acción catalítica presente en los sitios activos (incluyendo sitio catalítico y un sitio de unión a sustrato) se localizan en el lado C terminal de cada cadena de la estructura de barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>. En las Figuras 1, 2A y 2B, las estructuras tridimensionales de  $\alpha$ -NAGA humana y  $\alpha$ -GAL humana se muestran como un modelo de lazo, y los restos de aminoácidos en los sitios catalíticos y el sitio de unión al sustrato en cada una de las estructuras se muestran como un modelo de barras. Para comparar las relaciones posicionales entre el sustrato y los restos en el sitio catalítico y el sitio de unión al sustrato en la estructura, se superpuso la estructura de  $\alpha$ -NAGA en la estructura de  $\alpha$ -GAL por el método de superposición desarrollado por Kabsch (véase Kabsch W. *et al.*, Acta Crystallogr; 1976: A32, 827-828; y Kabsch W. *et al.*, Acta Crystallogr; 1978: A34, 922-923). Posteriormente, en el modelo estructural de  $\alpha$ -NAGA humana, se seleccionaron restos de aminoácidos implicados en la unión del sustrato extrayendo restos de aminoácidos adyacentes al sustrato. Los resultados se muestran en la Tabla 3. La columna derecha de la Tabla 3 muestra 14 restos de aminoácidos seleccionados de  $\alpha$ -NAGA humana, y la columna izquierda muestra restos de aminoácidos en  $\alpha$ -GAL humana que corresponden posicionalmente a esos 14 restos de aminoácidos.

Tabla 3

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

(\*) resto catalítico

Estos restos de aminoácidos se compararon entre sí superponiendo la estructura de  $\alpha$ -NAGA humana con la de  $\alpha$ -GAL humana para detectar restos que fueron idénticos entre sí y restos que fueron diferentes entre sí, definiendo de este modo la similitud y diferencia entre las secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -GAL humana y  $\alpha$ -NAGA humana.

#### 4. Similitud entre $\alpha$ -GAL humana y $\alpha$ -NAGA humana

Como resultado, se ha descubierto que entre los 14 restos extraídos, 12 restos incluyendo Asp156 y Asp217 como los sitios catalíticos de  $\alpha$ -NAGA humana eran idénticos entre  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL. Las posiciones de átomos de estos restos de aminoácidos también se superpusieron satisfactoriamente entre sí, y por lo tanto, se confirmó que las posiciones de átomos de estos restos de aminoácidos en las estructuras fueron estrictamente similares entre sí. La Figura 2A muestra las posiciones de los restos de aminoácidos comunes a  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL en las estructuras tridimensionales. La Figura 2C muestra la interacción entre cada uno de los restos de aminoácidos y el sustrato. Se cree que todos estos restos están implicados con el sustrato mediante un enlace de hidrógeno o un enlace hidrófobo. Obsérvese que, en la Figura 2C, los aminoácidos que no están subrayados son aminoácidos comunes de  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL, y los aminoácidos subrayados son aminoácidos diferentes entre  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL.

#### 5. Diferencia entre $\alpha$ -GAL humana y $\alpha$ -NAGA humana

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

Como se muestra en la Figura 2C, en  $\alpha$ -GAL, el átomo de carbono en la posición 2 del azúcar (anillo de 6 miembros) en el sustrato de  $\alpha$ -GAL o  $\alpha$ -NAGA, se unió con un "grupo-OH (un grupo hidroxilo)" o un grupo "-NH-C(CH<sub>3</sub>)=O (un grupo N-acetilo)", respectivamente.

En  $\alpha$ -NAGA, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de Ser188 se une supuestamente con el átomo de oxígeno del grupo N-acetilo en el sustrato mediante un enlace de hidrógeno, y el grupo metilo de la cadena lateral de Ala191 se une supuestamente al grupo metilo del grupo N-acetilo en el sustrato mediante un enlace hidrófobo. Basándose en estos supuestos, se cree que Ser188 y Ala191 de  $\alpha$ -NAGA son restos importantes para reconocer el grupo N-acetilo en el sustrato.

Por otro lado, se ha indicado que en  $\alpha$ -GAL humana, Glu203 y Leu206, que son diferentes de los restos correspondientes de  $\alpha$ -NAGA, son importantes para reconocer un sustrato de  $\alpha$ -GAL (Garman SC *et al.*, J. Mol. Biol., 2004, 19; 337(2): 319-35). Además, se ha descubierto por un análisis de estructura cristalina de rayos X que el grupo carboxilo de la cadena lateral de Glu203 de  $\alpha$ -GAL forma un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo del sustrato. Además, Leu206 de  $\alpha$ -GAL es un resto que tiene una cadena lateral voluminosa y ocupa una parte del espacio del sitio de unión al sustrato de  $\alpha$ -GAL. Por otro lado, el grupo hidroxilo (en la posición 2) en el sustrato de  $\alpha$ -GAL es un grupo funcional que no es voluminoso. Resulta evidente que el grupo hidroxilo es menor que, por ejemplo, el grupo N-acetilo en el sustrato de  $\alpha$ -NAGA. En consecuencia, se cree que, en la unión entre  $\alpha$ -GAL y el sustrato, el tamaño del espacio del sitio de unión al sustrato de  $\alpha$ -GAL es adecuado para el tamaño del grupo

hidroxilo en el sustrato de  $\alpha$ -GAL. En consecuencia, en  $\alpha$ -GAL, dos restos, Glu203 y Leu206, parecen contribuir a la fuerza de la especificidad del sustrato.

#### 6. Verificación de especificidad de sustrato con modelos estructurales tridimensionales

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

De acuerdo con los resultados, en el modelo complejo en el que el sustrato de  $\alpha$ -GAL se acopló al modelo estructural de  $\alpha$ -NAGA, la cadena lateral de Ser188 de  $\alpha$ -NAGA no interactuó con el grupo hidroxilo en la posición 2 del sustrato de  $\alpha$ -GAL. Además, se formó un espacio libre entre Ala191 y el sustrato de  $\alpha$ -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  $\alpha$ -NAGA se acopló a la estructura de  $\alpha$ -GAL, se confirmó que el grupo N-acetilo en la posición 2 del sustrato de  $\alpha$ -NAGA colisiona contra Glu203 y Leu206 de  $\alpha$ -GAL. En consecuencia, se ha predicho que la unión del sustrato se bloqueó por la presencia de estos dos restos.

Estos resultados predichos apoyaron los resultados experimentales descritos anteriormente. Por lo tanto, se ha apoyado que Ser188 y Ala191 de  $\alpha$ -NAGA y Glu203 y Leu206 de  $\alpha$ -GAL eran importantes para la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -GAL, respectivamente.

#### 7. Sustitución de restos de aminoácidos para modificar la especificidad de sustrato de $\alpha$ -NAGA humana a especificidad de sustrato similar a la de $\alpha$ -GAL humana.

Como se ha descrito anteriormente, las secuencias de aminoácidos entre  $\alpha$ -GAL humana y  $\alpha$ -NAGA humana son completamente idénticas incluyendo el sitio catalítico, excepto por los dos restos que reconocen el grupo funcional unido con el átomo de carbono en la posición 2 del azúcar (anillo de seis miembros) en cada uno de los sustratos. Esto indica la posibilidad de mantener la actividad catalítica tal como es antes de la sustitución alterando solamente la especificidad de sustrato de específico de  $\alpha$ -NAGA a específico de  $\alpha$ -GAL o viceversa sustituyendo estos dos restos que contribuyen en gran medida a la especificidad de sustrato. Para alterar la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -NAGA humana para expresar actividad  $\alpha$ -GAL, es importante una sustitución de aminoácidos en estas dos posiciones. Sustituyendo Ser188 de  $\alpha$ -NAGA humana por Glu, puede cancelarse el reconocimiento del grupo N-acetilo del sustrato de  $\alpha$ -NAGA mediante un enlace de hidrógeno, y en su lugar puede introducirse una interacción con un grupo hidroxilo del sustrato de  $\alpha$ -GAL mediante un enlace de hidrógeno. Además, reemplazando Ala191 de  $\alpha$ -NAGA humana por Leu, el espacio en el que va a incorporarse un grupo de N-acetilo tras la unión de un sustrato de  $\alpha$ -NAGA se ocupará por la cadena lateral voluminosa de Leu, y este impedimento estérico inhibe la unión del sustrato. Se esperaba que, en  $\alpha$ -NAGA, estos efectos cancelaran el reconocimiento original de un sustrato de  $\alpha$ -NAGA y dieran como resultado una alta especificidad con un sustrato de  $\alpha$ -GAL.

#### 8. Evaluación del modelo de sustitución de aminoácidos de $\alpha$ -NAGA humano

Para confirmar el efecto de la sustitución de Ser188 y Ala191 de  $\alpha$ -NAGA por Glu y Leu, respectivamente, en la estructura adyacente, se construyó un modelo mutante de  $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)), y la estructura tridimensional del modelo mutante de  $\alpha$ -NAGA se comparó con la de  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre. Como resultado, se confirmó que las sustituciones anteriores no afectaban a la conformación compuesta de los restos de aminoácidos adyacentes. En consecuencia, se supuso que el mutante de  $\alpha$ -NAGA obtenido introduciendo estas mutaciones en  $\alpha$ -NAGA humana puede existir sin ningún problema conformacional.

Además, se construyó un modelo complejo en el que un sustrato de  $\alpha$ -GAL se acoplaba a la estructura del mutante de  $\alpha$ -NAGA. Como resultado, se confirmó que la cadena lateral de Glu188 del mutante de  $\alpha$ -NAGA existe a una distancia capaz de formar un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo en la posición 2 del sustrato (véase Figura 5(b)). Además, en un modelo complejo en el que un sustrato de  $\alpha$ -NAGA se acopló a la estructura del mutante de  $\alpha$ -NAGA, se supuso que el grupo de N-acetilo en la posición 2 del sustrato provoca un impedimento estérico con la cadena lateral de Leu191, que inhibía la unión con el sustrato.

De acuerdo con los resultados anteriores, se esperaba que el mutante de  $\alpha$ -NAGA perdiera la especificidad por el sustrato original de  $\alpha$ -NAGA y adquiriera una alta especificidad por el sustrato de  $\alpha$ -GAL (es decir, el mutante de  $\alpha$ -NAGA pierde sustancialmente la actividad  $\alpha$ -NAGA y adquiere actividad  $\alpha$ -GAL).

La estructura del mutante de  $\alpha$ -NAGA construido ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)) se muestra en la Figura 6.

9. Otros candidatos de sustitución de aminoácidos de  $\alpha$ -NAGA humana

La modificación anteriormente descrita de la especificidad de sustrato se consigue por dos efectos, es decir, el efecto inhibitor de la unión con el sustrato de  $\alpha$ -NAGA mediante un impedimento estérico y el efecto de formación de un enlace de hidrógeno con un sustrato de  $\alpha$ -GAL. Con respecto a las sustituciones de aminoácidos anteriormente descritas, se ha estudiado la posibilidad de sustitución por otros aminoácidos.

En primer lugar, para el efecto inhibitor de la unión anterior, se realizó una sustitución por Leu, es decir, el mismo aminoácido que  $\alpha$ -GAL, como un primer candidato. Además, para una sustitución que da como resultado el mismo efecto, se consideró una sustitución por un resto de aminoácido hidrófobo, Val, Ile, Phe o Met.

Además, para el efecto de formación de enlace de hidrógeno anterior, se realizó una sustitución con Glu, es decir, el mismo aminoácido que  $\alpha$ -GAL, como un primer candidato. Además, para una sustitución que dé como resultado el mismo efecto, se consideró una sustitución con Asp, que también tiene un grupo carboxilo como Glu.

10. Secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -NAGA humana de tipo silvestre y secuencia de aminoácidos de mutante de  $\alpha$ -NAGA

La secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -NAGA humana de tipo silvestre se representa por "SEC ID N°: 2", y la secuencia de aminoácidos del mutante de  $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)) se representa por "SEC ID N°: 4".

[Ejemplo 2]

<Preparación de mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con péptido señal de  $\alpha$ -GAL>

De acuerdo con el siguiente procedimiento, "mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL)", en el que un péptido señal de  $\alpha$ -GAL está fusionado con un mutante de  $\alpha$ -NAGA, es decir,  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L).

1. Preparación de vector de retrovirus de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA)

Se obtuvo un clon de ADNc de  $\alpha$ -NAGA (N-acetilgalactosaminidasa de *Homo sapiens*, alfa, ARNm, Referencia de Gene Bank: BC000095, IMAGE: 3504221) de Open Biosystems. La secuencia codificante de  $\alpha$ -NAGA se amplificó por PCR con la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones de reacción, usando el ADNc de  $\alpha$ -NAGA comprado como un molde con cebadores descritos a continuación y polimerasa KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 5' de NAGA:

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (SEC ID N°: 13)

Cebador 3' de NAGA:

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3' (SEC ID N°: 14)

<Composición de mezcla de reacción>

Molde (10 ng/ $\mu$ l):	2 $\mu$ l
Tampón 10 x:	10 $\mu$ l
dNTP 2,5 mM:	10 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> 25 mM:	4 $\mu$ l
Polimerasa KOD-plus:	2 $\mu$ l
Cebador 5' de NAGA (10 $\mu$ M):	2 $\mu$ l
Cebador 3' de NAGA (10 $\mu$ M):	2 $\mu$ l
Agua esterilizada:	68 $\mu$ l
<b>Total:</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

<Condiciones de reacción>

La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. Posteriormente, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y

elongación: 68 °C (90 segundos)” un total de 35 veces, y la mezcla de reacción se enfrió después a 4 °C.

El fragmento de ADN de  $\alpha$ -NAGA preparado se purificó por electroforesis en gel de agarosa.

5 Un fragmento de ADN de  $\alpha$ -NAGA preparado cuyos extremos se fosforilaron con T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs: NEB) se ligó con un vector retroviral pCX4Neo preparado escindiendo con una enzima de restricción Hpa I (extremos romos) (NEB) y desfosforilando después usando Fosfatasa Alcalina, de Intestino de Ternero (NEB) (Tsuyoshi Akagi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100, 13567-13572 (2003)). Se transformó  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo resultante de la reacción de ligamiento en células competentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen Corporation) y se sembraron en una placa de LB que contenía ampicilina. Después se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina.

10 Cada una de las colonias resistentes resultantes se suspendió en un medio LB, que se usó como un molde para realizar una PCR de colonias con la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones de reacción, con los cebadores a continuación y Mezcla Maestra de PCR (fabricada por Promega).

15 Cebador 5' de NAGA:

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (SEC ID N°: 13)

20 Cebador 3' de pCX4

5'-AAACCGTTGCTAGCTTAAGTT-3' (SEC ID N°: 15)

<Composición de mezcla de reacción>

Molde (1 colonia/10 $\mu$ l):	1 $\mu$ l
Mezcla Maestra de PCR:	10 $\mu$ l
Cebador 5' de NAGA (10 $\mu$ M):	0,5 $\mu$ l
Cebador 3' de pCX4 (10 $\mu$ M):	0,5 $\mu$ l
Agua esterilizada:	8 $\mu$ l
Total:	20 $\mu$ l

25

<Condiciones de reacción>

30 La mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante dos minutos. Posteriormente, se realizó un ciclo que consistía en “desnaturalización y disociación térmica: 95 °C (30 segundos) → hibridación: 55 °C (30 segundos) → síntesis y elongación: 72 °C (90 segundos)” un total de 40 veces, y la mezcla de reacción se enfrió después a 4 °C.

35 Se seleccionó un clon en el que se integró ADN de  $\alpha$ -NAGA en la orientación directa 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 que tenía el ADN de  $\alpha$ -NAGA integrado en la orientación directa. El clon de *E. coli* seleccionado de  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo se cultivó en masa para obtener 1 mg o más (1 mg/ml) de ADN plasmídico de  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo.

## 2. Preparación de mutante de $\alpha$ -NAGA

40 En primer lugar, se preparó  $\alpha$ -NAGA-(S188E), basándose en el cual se preparó un mutante de  $\alpha$ -NAGA, es decir,  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L). El método de preparación se llevó a cabo con referencia al manual de instrucciones del Sistema de Mutagénesis Dirigida GeneTailor (Invitrogen Corporation), según fue necesario.

45 En primer lugar, se metiló  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo (100 ng) con ADN Metilasa (4 U). Se preparó  $\alpha$ -NAGA-(S188E) amplificando el ADN con la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones de reacción, usando el  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo metilado con un cebador 5' de NAGA S188E-GT (la mutación con sentido erróneo S188E introducida está subrayada) y un cebador 3' de NAGA S188E-GT que se diseñaron de modo que la mutación con sentido erróneo (S188E) de la serina 188 (S) a ácido glutámico (E) se introdujo y polimerasa KOD-plus.

50 Cebador 5' de NAGA S188E-GT:

5'-CCCATCGCCTTCTCCTGCGAGTGGCCAGCCTATGA-3' (SEC ID N°: 16)

Cebador 3' de NAGA S188E-GT:

55 5'-GCAGGAGAAGGCGATGGGGCGGCCTGTG-3' (SEC ID N°: 17)

## &lt;Composición de la mezcla de reacción&gt;

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

## &lt;Condiciones de reacción&gt;

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

10 El fragmento de ADN amplificado ( $\alpha$ -NAGA-(S188E) pCX4Neo) se transformó en células competentes DH5a-T1 (Invitrogen Corporation) que tenían endonucleasa McrBC que escinde ADN metilado. Dado que  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo, que se usó como un molde, se había metilado, se escindió por endonucleasa McrBC y no pudo formar colonias. Por otro lado, dado que un plásmido que tiene una mutación S188E no se había metilado este no se escindió y pudo formar colonias. Después las varias colonias formadas se cultivaron, y después se extrajo y purificó el ADN plasmídico. La introducción de la mutación de S188E se confirmó por un método de secuenciación de nucleótidos conocido usando un secuenciador.

15 A continuación, se preparó  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) por amplificación por PCR con la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones de reacción, usando el  $\alpha$ -NAGA-(S188E) pCX4Neo purificado como un molde con un cebador 5' de NAGA A191L-GT (una mutación de sentido erróneo de A191L introducida está subrayada) y un cebador 3' de NAGA A191L-GT que se diseñó de modo que se introdujo la mutación de sentido erróneo (A191L) de la alanina 191 (A) a leucina (L), y polimerasa KOD-plus.  
Cebador 5' de NAGA A191L-GT:

25 5'-TTCTCCTGCGAGTGGCCACTCTATGAAGCGGCCT-3' (SEC ID N°: 18)

Cebador 3' de NAGA A191L-GT:

30 5'-TGGCCACTCGCAGGAGAAGGCGATGGGG-3' (SEC ID N°: 19)

## &lt;Composición de mezcla de reacción&gt;

Molde (6 ng/μl):	1 μl
Tampón 10 x:	5 μl
dNTP 2,5 mM:	5 μl
MgSO <sub>4</sub> 25 mM:	2 μl
Polimerasa KOD-plus:	1 μl
Cebador 5' de NAGA A191L-GT (10 μM):	1 μl
Cebador 3' de NAGA A191L-GT (10 μM):	1 μl
Agua esterilizada:	34 μl
<b>Total:</b>	<b>50 μl</b>

## &lt;Condiciones de reacción&gt;

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

40 El fragmento de ADN amplificado ( $\alpha$ -NAGA-(S188E/A191L) pCX4Neo) se transformó en células competentes DH5a-T1. Después se extrajo y purificó el ADN plasmídico. La introducción de la mutación A191L, además de la mutación S188E, se confirmó por un método de secuenciación de nucleótidos conocido usando un secuenciador.



### 3. Preparación de $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de $\alpha$ -GAL y un mutante de $\alpha$ -NAGA fusionado con el péptido señal de $\alpha$ -GAL

5 Cuando se introdujo el gen de  $\alpha$ -NAGA en una célula animal, se descubrió que la cantidad de la proteína de enzima  $\alpha$ -NAGA recombinante secretada al sobrenadante de cultivo era pequeña, permaneciendo la mayoría en la célula. En consecuencia, para permitir la secreción de  $\alpha$ -NAGA (tipo silvestre) y mutante de  $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)) al sobrenadante de cultivo en una gran cantidad, se produjeron proteínas de enzimas de  $\alpha$ -NAGA recombinantes cuyos restos de péptido señal (restos de péptido señal de  $\alpha$ -NAGA) se reemplazaron con restos de péptido señal de  $\alpha$ -GAL que se sabía que se secretaban a un sobrenadante de cultivo en una gran cantidad.

10 Se obtuvo ADNc de  $\alpha$ -GAL empleando información de secuencia de nucleótidos y un método de clonación conocidos. En primer lugar, se usó ADNc de  $\alpha$ -GAL como un molde junto con los cebadores 5' GLA y 3' SgGALNAGA2, para amplificar una secuencia de nucleótidos que codificaba el péptido señal de  $\alpha$ -GAL por PCR usando la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones. Aquí, el cebador 3' SigGALNAGA2 tiene una secuencia homóloga del resto 3' terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y una secuencia homóloga del extremo 5' terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica  $\alpha$ -NAGA. Esta PCR dio como resultado un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de  $\alpha$ -GAL como un producto amplificado (en lo sucesivo en el presente documento, denominado producto A de PCR).

Cebador 5' GLA:

5' -ACAATGCAGCTGAGGAACCCAGAA-3' (SEC ID N°: 20)

25 Cebador 3' SigGALNAGA2

5' -GTCCAGTGCTCTAGCCCCAG-3' (SEC ID N°: 21)

<Composición de mezcla de reacción>

30	Molde (6 ng/ $\mu$ l):	1 $\mu$ l
	Tampón 10 x:	5 $\mu$ l
	dNTP 2,5 mM:	5 $\mu$ l
	MgSO <sub>4</sub> 25 mM:	2 $\mu$ l
	Polimerasa KOD-plus:	1 $\mu$ l
	Cebador 5' GLA (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
	Cebador 3' SigGALNAGA2 (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
	Agua esterilizada:	34 $\mu$ l
	<b>Total:</b>	<b>50 <math>\mu</math>l (producto A de PCR)</b>

<Condiciones de reacción>

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

40 A continuación, se usó ADNc de cada uno de  $\alpha$ -NAGA y  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) como un molde junto con los cebadores 5' SigGALNAGA2 y 3' NAGA, para amplificar una región de ADNc que consistía en una secuencia de nucleótidos sin una secuencia de nucleótidos que codificaba en péptido señal de  $\alpha$ -NAGA, por PCR usando la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones. Aquí, el cebador 5' SigGALNAGA2 tiene una secuencia homóloga del resto 3' terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y una secuencia homóloga del resto 5' terminal de  $\alpha$ -NAGA. Esta PCR dio como resultado un fragmento de ADN que tenía una secuencia de nucleótidos que codificaba una parte distinta del resto de péptido señal de  $\alpha$ -NAGA o  $\alpha$ -NAGA (S188E/A191L) como un producto amplificado (en lo sucesivo en el presente documento, denominado producto B de PCR).

Cebador 5' SigGALNAGA2:

5' -AGAGCACTGGACAATGGGCT-3' (SEC ID N°: 22)

50

Cebador 3' NAGA:

5' -TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3' (SEC ID N°: 23)

55

## &lt;Composición de mezcla de reacción&gt;

Molde (6 ng/ $\mu$ l):	1 $\mu$ l
Tampón 10 x:	5 $\mu$ l
dNTP 2,5 mM:	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> 25 mM:	2 $\mu$ l
Polimerasa KOD-plus:	1 $\mu$ l
Cebador 5' SigGALNAGA2 (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
Cebador 3' NAGA (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
Agua esterilizada:	34 $\mu$ l
<hr/> Total:	<hr/> 50 $\mu$ l (producto B de PCR)

## &lt;Condiciones de reacción&gt;

5 La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. Posteriormente, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y elongación: 68 °C (un minuto y 20 segundos)" un total de 35 veces, y la mezcla de reacción se enfrió después a 4 °C.

10 Finalmente, los productos de PCR A y B resultantes de la PCR anterior se usaron como moldes para amplificación usando los cebadores 5' GLA y 3' NAGA, con la siguiente composición de mezcla de reacción en las siguientes condiciones.

## 15 &lt;Composición de mezcla de reacción&gt;

Producto de PCR A (6 ng/ $\mu$ l):	1 $\mu$ l
Producto de PCR B (6 ng/ $\mu$ l):	1 $\mu$ l
Tampón 10 x:	5 $\mu$ l
dNTP 2,5 mM:	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> 25 mM:	2 $\mu$ l
Polimerasa KOD-plus:	1 $\mu$ l
Cebador 5' GLA (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
Cebador 3' NAGA (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
Agua esterilizada:	34 $\mu$ l
<hr/> Total:	<hr/> 50 $\mu$ l

## &lt;Condiciones de reacción&gt;

20 La mezcla de reacción se calentó a 94 °C durante dos minutos. Posteriormente, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización y disociación térmica: 94 °C (15 segundos) → hibridación: 60 °C (30 segundos) → síntesis y elongación: 68 °C (un minuto y 20 segundos)" un total de 35 veces, y la mezcla de reacción se enfrió después a 4 °C.

25 Esta PCR proporcionó, como productos amplificados, un fragmento de ADN que tenía una secuencia de nucleótidos que codificaba  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y un fragmento de ADN que tenía una secuencia de nucleótidos que codificaba  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL. Cada uno de los fragmentos de ADN resultantes se separó por electroforesis con un gel de agarosa de bajo punto de fusión, seguido de purificación usando un kit de purificación de fragmentos de ADN disponible en el mercado.

30 Después, se ligó cada uno de los fragmentos de ADN purificados que tenían su extremo terminal fosforilado con polinucleótido quinasa T4 (NEB) con un vector retroviral pCX4Neo que se ha sometido a escisión con enzima de restricción Hpa I (extremos romos) (NEB) seguido de desfosforilación con Fosfatasa Alcalina, Intestino de Ternero (NEB)(Tsuyoshi Akagi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 13567-13572 (2003)) por una técnica recombinante génica convencional. La  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y la  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neo fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL resultantes de la reacción de ligamiento se transformaron cada una en células competentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen Corporation), se sembraron en una placa de LB que contenía ampicilina para obtener una colonia resistente a ampicilina.

40 Cada una de las colonias resistentes resultantes se suspendió en un medio LB. La solución celular se usó como un molde para realizar PCR de colonias con los siguientes cebadores y mezcla Maestra de PCR (Promega) usando la siguiente composición de mezcla de reacción con las siguientes condiciones.

Cebador 5' pCX4:

5'-GGGTGGACCATCCTCTAGACT-3' (SEC ID N°: 24)

5 Cebador 3' NAGA:

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3' (SEC ID N°: 23)

<Composición de mezcla de reacción>

10

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

<Condiciones de reacción>

15

La mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante dos minutos. Posteriormente, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización y disociación térmica: 95 °C (30 segundos) → hibridación: 55 °C (30 segundos) → síntesis y elongación: 72 °C (un minuto y 20 segundos)" un total de 40 veces, y la mezcla de reacción se enfrió después a 4 °C.

20

A partir del producto amplificado resultante de esta PCR, se seleccionaron clones que tenían el fragmento de ADN de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL o  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL integrado en orientación directa. Específicamente, los moldes de *E. coli* con el producto amplificado de 1,4 kb se seleccionaron como los clones que tenían el fragmento de ADN de  $\alpha$ -NAGA fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL o  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL integrado en la orientación directa. Se cultivaron en masa clones de *E. coli* de la  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neo fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL para obtener ADN plasmídico de 1 mg o más (1 mg/ml).

25

[Ejemplo 3]

30

<Preparación de retrovirus recombinante que expresa  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL o mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL>

35

Se obtuvieron células de empaquetamiento de retrovirus (Phoenix Ampho Lote N°: F-14727 HEK293 de Riñón Embrionario Humano Transformado) de ATCC (Coligan, J. E. *et al.*, Curr. Protocols Immunol., Supl. 31, 10.28.1-10.28.17 (1999)). Se cultivaron células Phoenix Ampho en un medio DMEM (alta glucosa) complementado con FBS inmovilizado al 10% y un antibiótico a 37 °C con concentración de CO<sub>2</sub> al 5%.

40

Para preparar retrovirus recombinantes, se transfectó el vector de retrovirus de  $\alpha$ -NAGA pCX4Neo fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL o vector de retrovirus de  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neo fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL a las células de Phoenix Ampho. En esta transfección, se añadieron 2 ml de medio OPTIMEM (Invitrogen Corporation) que contenía 1 µg de vector de retrovirus, 1 µg de pCLAMP (RK Naviaux *et al.*, J. Virol., 70, 5701-5705 (1996)) y 18 µl de Dofect-GT1 (reactivo de transfección; Dojindo Laboratories) a las células Phoenix Ampho (5 x 10<sup>5</sup>/placa de 60 mm) y la mezcla se incubó a 37 °C durante cuatro horas. Posteriormente, el medio de cultivo se alteró por 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 1000 rpm durante 10 minutos. El retrovirus recombinante contenido en el sobrenadante se distribuyó y almacenó a -80 °C.

45

[Ejemplo 4]

50

<Establecimiento de líneas celulares CHO-K1 que expresan de forma estable  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL>

55

Cada uno de los retrovirus recombinantes que expresaban  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL preparada en el Ejemplo 3 se usó para infectar células CHO-K1 para establecer células que se expresaban de forma estable para  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL. Específicamente, el establecimiento se realizó mediante las siguientes etapas (i) a (v):

(i) Se sembraron  $1 \times 10^5$  células CHO-K1 en una placa de 60 mm y se cultivaron en un medio OMEN complementado con FBS inmovilizado al 10% y un antibiótico a 37 °C durante una noche.

(ii) Se añadió polibreno (Sigma H-9266, Bromuro de Hexadimetrina) al medio de cultivo hasta una concentración final de 2 µg/ml, y se realizó cultivo 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) La solución de virus se retiró. Posteriormente, se añadieron 5 ml de un medio de cultivo, y se cultivó durante una noche.

(v) Se realizó cultivo con un medio selectivo complementado con G418 (250 µg/ml), estableciendo de este modo células CHO-K1. El medio selectivo se cambió una vez cada tres días durante 14 días o más. Si la célula establecida expresaba o no la proteína diana se confirmó por la actividad enzimática y un método de transferencia de Western (para más detalles, véase a continuación).

[Confirmación de la expresión de proteína diana por el método de transferencia de Western]

Para examinar si las células CHO-K1 que expresan  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y las células CHO-K1 que expresan  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL, establecidas con retrovirus, expresaban o no la proteína diana, se realizó transferencia de Western. Se proporcionó un anticuerpo policlonal anti  $\alpha$ -NAGA obtenido por un método conocido para preparar un anticuerpo como un anticuerpo usado en esta transferencia de Western.

Como las muestras para la transferencia de Western, se usaron sobrenadantes de las células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL. Se realizó SDS-PAGE de la siguiente manera. Se midió la concentración de una proteína de la muestra. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente de tampón de muestras de SDS 2 x (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 30% y BPB 0,2%) a la muestra que contenía 5 µg de la proteína. La mezcla se hirvió durante cinco minutos, y la muestra resultante se aplicó después a un gel de 4% a 20% (PAG mini: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) para realizar electroforesis a una corriente constante de 30 mA durante dos horas.

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

Después de completar la transferencia, la membrana se bloqueó con un tampón de bloqueo (leche desnatada al 5% en TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y NaCl 100 mM)) durante 30 minutos. Después 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 tres veces. Después se añadió un anticuerpo marcado con HRP anti IgG de conejo (anticuerpo secundario; Amersham Biosciences) diluido 5.000 veces con el tampón de bloqueo, y se realizó 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 tres veces. Se añadió reactivo colorante ECL (Nacalai Tesque, Inc.) para permitir la reacción a temperatura ambiente durante dos minutos. Posteriormente, la membrana se reveló poniendo en contacto con ECL Hyperfilm™ en una habitación oscura durante un minuto.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que las células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL establecidas y las células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL secretaban cada una  $\alpha$ -NAGA de tipo silvestre y mutante de  $\alpha$ -NAGA ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)) de aproximadamente 45 kD a los sobrenadantes de cultivo, respectivamente.

[Ejemplo 5]

<Transición de la actividad enzimática de un mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL>

El hecho de que la  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL haya adquirido la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -GAL se confirmó por el siguiente procedimiento.

Los sobrenadantes de cultivo de células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y las células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionado con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL

establecidos en el Ejemplo 4 se usaron como muestras para realizar un ensayo de actividad enzimática con respecto a actividades  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -NAGA. La actividad enzimática se determinó usando un sustrato sintético compuesto de un sustrato fluorogénico, es decir, un derivado de 4-metilumbeliferona (4-MU), midiendo la cantidad de 4-MU liberada de 1 ml de la solución enzimática por hora como una intensidad de fluorescencia. Más específicamente, se usó 4-MU- $\alpha$ -D-galactósido (4-MU- $\alpha$ -GAL; Calbiochem, CA) como el sustrato sintético de  $\alpha$ -GA1. Se usó 4-MU- $\alpha$ -N-acetil-D-galactosaminida (4-MU- $\alpha$ -NAGA; Seikagaku Corporation) como el sustrato sintético de  $\alpha$ -NAGA. Para la medición de la actividad  $\alpha$ -GAL, se añadió N-acetil-D-galactosamina (Sigma, MO) como un inhibidor de  $\alpha$ -NAGA, que reacciona con 4-MU- $\alpha$ -GAL al mismo tiempo, a la solución de sustrato previamente a una concentración final de 117 mM.

Se añadió un tampón de Mcllvain (ácido cítrico/ácido fosfórico, pH 4,6, 40  $\mu$ l) que contenía 4-MU- $\alpha$ -GAL 5 mM o un tampón de Mcllvain (ácido cítrico/ácido fosfórico, pH 4,7, 40  $\mu$ l) que contenía 4-MU- $\alpha$ -NAGA 1 mM al sobrenadante de cultivo (10  $\mu$ l) y se mezcló, y se permitió una reacción a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se terminó añadiendo un tampón de Glicina 0,2 M (pH 10,7, 950  $\mu$ l). Para detectar la cantidad de 4-MU liberada, se midió la cantidad de 4-MU a una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm usando un espectrofluorofotómetro (ARVO MX, Perkin Elmer). La actividad enzimática de  $\alpha$ -GAL o  $\alpha$ -NAGA se determinó por la cantidad de 4-MU (nmol 4-MU/h/ml) que puede liberarse por volumen y tiempo de reacción de la solución enzimática.

Los resultados del ensayo de actividad enzimática mostraron que  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL expresada por células CHO-K1 se secretó al sobrenadante de cultivo y mostró alta actividad  $\alpha$ -GAL, lo que indica adquisición de la especificidad del sustrato de  $\alpha$ -GAL.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	actividad enzimática $\alpha$ -GAL (nmol 4-MU/h/ml)
CHO-K1 (control)	0-20
$\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de $\alpha$ -GAL	0-20
$\alpha$ -NAGA-(188E/A191L) fusionada con el péptido señal de $\alpha$ -GAL	200-400

[Ejemplo 6]

<Estabilidad del mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL en sangre (en plasma)>

La estabilidad de la  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL en sangre (en plasma) se confirmó por el siguiente procedimiento.

En primer lugar, se preparó una solución enzimática de  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL como en el Ejemplo 4. Además, como un control, se preparó otra solución enzimática de la misma manera que la solución enzimática anterior usando células preparadas introduciendo un gen de  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre en F377. Se añadió plasma (50  $\mu$ l) de un sujeto sano a cada una de las soluciones enzimáticas (50  $\mu$ l) y se mezcló. Se inició después una reacción a 37 °C, y se tomaron muestras de 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción con el tiempo para medir la actividad  $\alpha$ -GAL. La actividad enzimática se midió como en el Ejemplo 4. La actividad  $\alpha$ -GAL de la muestra tomada en el momento de mezclar la solución enzimática con plasma se definió como un patrón (100%), y una reducción en la actividad enzimática con el tiempo se representó como un porcentaje.

Como resultado,  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL tuvo una excelente capacidad de mantenimiento de la actividad  $\alpha$ -GAL en sangre (en plasma) con el tiempo, en comparación con  $\alpha$ -GAL de tipo silvestre, lo que muestra que  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) es altamente estable en sangre.

[Ejemplo 7]

<Degradación de trihexósido de ceramida (CTH) acumulada en fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Fabry por mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con péptido señal de  $\alpha$ -GAL>

Los sobrenadantes de cultivo de células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y células CHO-K1 que expresaban  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionadas con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL se recogieron para usarse como muestras de enzima. Se añadieron  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL,  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -GAL con una actividad de 1.000 nmol/h/ml al medio de fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Fabry cultivados (F337) para cultivo durante dos días. Al final del cultivo, se detectó la THC acumulada dentro de las células por tinción de anticuerpos fluorescente de la siguiente manera.

En primer lugar, se inmovilizaron fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Fabry cultivados mediante adición de enzimas, con paraformaldehído al 4%/PBS (pH 7,0) durante un minuto, se añadió BSA 1%/PBS, se bloqueó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió anticuerpo monoclonal anti THC (anticuerpo primario) diluido 100 veces con BSA 1%/PBS, y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La incubación con anticuerpo primario se siguió de tres veces de lavado de cinco minutos con PBS. Después, se añadió anti IgG de ratón de Cabra Alexa Fluor 488 diluido 1000 veces con BSA 1%/PBS (anticuerpo secundario; Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La incubación con el anticuerpo secundario se siguió de tres veces de lavado de cinco minutos con PBS, montando con Medio de Montaje Permafluor (Thermo), y observación con sistema de microscopio de láser confocal LSM510 (Carl Zeiss).

Como resultado de la tinción de los anticuerpos, se observó reducción de THC significativa en medios de fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Fabry con  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL y  $\alpha$ -GAL mientras que no se observó reducción de THC significativa con  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL (Figura 7).

[Ejemplo 8]

<Establecimiento de técnica de purificación de mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL (1)>

Se llevó a cabo un experimento preliminar para establecer una técnica de purificación de  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL. El sobrenadante de cultivo (aproximadamente 6 litros) que contenía  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL secretada de la línea celular CHO-K1 que expresa de forma estable obtenida en el Ejemplo 4 se recogió y se concentró por ultrafiltración (punto de corte de peso molecular a 30 kD; Millipore YM30) hasta una concentración de aproximadamente 170 ml (30 veces). Posteriormente, el producto resultante se cambió de tampón a un tampón MES 20 mM (pH 6,0) por diálisis.

Como la primera etapa, se adsorbió un mutante de  $\alpha$ -NAGA con una actividad enzimática de 500  $\mu$ mol/h (aproximadamente 6 mg) en una columna de intercambio aniónico de Q Sepharose HP HiLoad (26/10) equilibrada con MES 20 mM (pH 6,0), que después se lavó con MES 20 mM (pH 6,0) y además con NaCl 150 mM/MES 20 mM (pH 6,0). A continuación, el mutante de  $\alpha$ -NAGA se eluyó con NaCl 250 mM/MES 20 mM (pH 6,0) para recoger fracciones con alta actividad enzimática. La producción de recuperación con la columna de intercambio aniónico de Q Sepharose HiLoad fue de aproximadamente 47% con una purificación 7,4 veces.

Como la segunda etapa, se aplicó un eluato de columna de Q Sepharose HP (actividad enzimática 224  $\mu$ mol/h: aproximadamente 3 mg) a una columna de Heparina HP HiTrap equilibrada con MES 20 mM (pH 6,0) para permitir que la impureza se absorba en la columna. Se cargó MES 20 mM (pH 6,0) en la columna y se recogió la fracción de mutante de  $\alpha$ -NAGA que fluyó a través de la columna. El rendimiento de recuperación después de la columna de Heparina HP fue de 44% con una purificación 15,7 veces.

Como la tercera etapa, la fracción (actividad enzimática 213  $\mu$ mol/h: aproximadamente 3 mg) que fluyó a través de la columna de heparina equilibrada con un tampón de fosfato potásico 1 mM (pH 6,0) se adsorbió en una columna de hidroxapatita CHT-2 Bio-Scale. La columna se lavó con tampón de fosfato potásico 1 mM (pH 6,0), después se sometió a elución con tampón de fosfato potásico 37,5 mM (pH 6,0) para recoger una fracción con alta actividad enzimática. El rendimiento de recuperación después de la columna de hidroxapatita CHT-2 Bio-Scale fue del 18% con purificación 55 veces.

Las etapas de la purificación anteriormente descrita se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Etapas de purificación de mutante de $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de $\alpha$ -GAL								
Muestra	Cantidad de solución (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad específica ( $\mu$ mol/h /ml)	Actividad específica (mol/h /mg)	Actividad específica total ( $\mu$ mol/h)	Factor	Cantidad total de proteína (mg)	Recuperación (%)
Concentración de Amicon/diálisis	168,5	5,3	2,86	0,54	482	1	893,05	100
Diálisis de HiLoadQ	92	0,61	2,44	3,99	224	7,4	56,2	47
Diálisis de heparina	120	0,21	1,77	8,45	213	15,7	25,2	44
Hidroxapatita	12,6	-	6,95	-	88	-	-	18
Concentración	2	1,10	32	29,8	65	55	2,2	14

\*mutante de  $\alpha$ -NAGA...disuelto en tampón de fosfato potásico 35 mM (pH 6,0)

[Ejemplo 9]

<Examen de la captación de mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL por diversos órganos>

5 Se administraron por vía intraperitoneal (ip.) o intravenosa (iv.) mutantes de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL (purificación parcial; obtenida en el Ejemplo 8) con una actividad enzimática  $\alpha$ -GAL comparable a 1 mg/kg o 0,3 mg/kg de preparación de  $\alpha$ -GAL disponible en el mercado (Fabrazyme; Genzyme) a ratones de modelo de enfermedad de Fabry para examinar la captación por el hígado. En este ejemplo, la expresión "mutante de  $\alpha$ -NAGA" se refiere a " $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)".

10 [Método]

15 1. Los siguientes grupos experimentales se establecieron con ratones de modelo de enfermedad de Fabry (también denominados "ratones de enfermedad de Fabry") (macho, 9-13 g) y ratones de tipo silvestre (los ratones de tipo silvestre pertenecían al grupo experimental 1) solamente).

1) grupo no administrado (control) (n = 1)

2) mutantes de  $\alpha$ -NAGA (con una actividad comparable a Fabrazyme 1 mg/kg), grupo de administración ip. (n = 3)

20 3) mutantes de  $\alpha$ -NAGA (con una actividad comparable a Fabrazyme 0,3 mg/kg), grupo de administración iv. (n = 2)

25 2. Sesenta minutos después de la administración, se resecaaron hígados, corazones y riñones de los ratones distintos de los controles después de perfusión sistémica con 30 ml de PBS con anestesia. Se determinó la actividad  $\alpha$ -GAL de cada órgano por un método rutinario.

[Resultados]

30 Los resultados de la comparación de actividades  $\alpha$ -GAL en diversos órganos en cada grupo experimental se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

	Ratones de tipo silvestre	Ratones de modelo de enfermedad de Fabry		
	No administrado	No administrado	Mutante de $\alpha$ -NAGA ip.	Mutante de $\alpha$ -NAGA iv.
Hígado	17	0,18	31	31
Corazón	7,0	0,12	1,8	3,2
Riñón	11	0,38	2,7	1,3
(nmol/h/mg)				

35 Como se puede apreciar a partir de los resultados anteriores, la actividad  $\alpha$ -GAL en los hígados del grupo no administrado (control) fue casi 0. Por otro lado, la actividad  $\alpha$ -GAL promedio en los hígados del grupo de administración ip. de mutante de  $\alpha$ -NAGA fue 31 (nmol/h/mg), lo que excedía la actividad  $\alpha$ -GAL en el hígado de los ratones de tipo silvestre. Además, la actividad  $\alpha$ -GAL promedio en los hígados del grupo de administración iv. del mutante de  $\alpha$ -NAGA también fue de hasta 31 (nmol/h/mg).

40 Con respecto a las comparaciones entre el grupo de administración ip. y el grupo de administración iv. de mutantes de  $\alpha$ -NAGA, la captación por el hígado fue la misma, es decir, 31, como se ha mencionado anteriormente. Ya que, sin embargo, las dosificaciones para los grupos de administración ip. e iv. fueron de 1,0 mg/kg y 0,3 mg/kg, respectivamente, se descubrió que la vía de administración iv. proporcionaba una captación más eficaz por el hígado que la vía de administración ip.

45 Las actividades  $\alpha$ -GAL en el corazón y el riñón fueron menores que la del hígado, lo que indica que las eficacias de captación del mutante de  $\alpha$ -NAGA por el corazón y el riñón fueron menores que por el hígado. Sin embargo, en general, se considera que aproximadamente el 20% de actividad del valor normal (es decir, el valor del grupo de ratones de tipo silvestre al que no se ha administrado) no provoca anomalías en el cuerpo. En consecuencia, incluso las actividades  $\alpha$ -GAL en el corazón y el riñón parecen mostrar suficiente eficacia del mutante de  $\alpha$ -NAGA.

Además, el riñón y el corazón son parte de los órganos que se han hecho particularmente problemáticos cuando se provoca disfunción tras la aparición de la enfermedad de Fabry, y son, junto con las células endoteliales, los tejidos

de órgano diana de administración de un agente terapéutico. Aunque los agentes terapéuticos convencionales para terapia de reemplazo enzimático muestran un cierto nivel de efecto en las células endoteliales, sus efectos fueron insuficientes en riñón y corazón. Por lo tanto, los resultados anteriores de potenciación de la actividad de  $\alpha$ -GAL en el corazón y el riñón (en comparación con el grupo de ratones de modelo de enfermedad de Fabry sin administración de mutante de  $\alpha$ -NAGA) indicaron que el mutante de  $\alpha$ -NAGA era una proteína enzimática excelente como un elemento activo de un agente terapéutico para enfermedad de Fabry.

[Ejemplo 10]

<Establecimiento de técnica de purificación de mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL (2)>

Se purificó un mutante de  $\alpha$ -NAGA fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL ( $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL), en lo sucesivo en el presente documento denominado un "mutante de  $\alpha$ -NAGA" en el presente ejemplo).

El sobrenadante de cultivo (aproximadamente 20 litros) de  $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) fusionada con el péptido señal de  $\alpha$ -GAL secretada de la línea celular CHO-K1 de expresión estable obtenida en el Ejemplo 4 se recogió y se concentró por ultrafiltración (punto de corte de peso molecular a 30 kD; Millipore YM30) hasta una concentración de aproximadamente 740 ml (27 veces). Posteriormente, se añadió sulfato de amonio al resultante hasta 50% y el precipitado resultante se recogió por centrifugación (17.000 rpm). El precipitado se disolvió en MES 20 mM (pH 6,0)/sulfato de amonio 900 mM para proporcionar 1.400 ml.

Después, esta solución se añadió a una columna de Fenil Sepharose HP HiLoad (26/10) equilibrada con MES 20 mM (pH 6,0)/sulfato de amonio 900 mM para permitir la adsorción del mutante de  $\alpha$ -NAGA. El resultante se lavó con MES 20 mM (pH 6,0)/sulfato de amonio 900 mM y MES 20 mM (pH 6,0)/sulfato de amonio 500 mM. Posteriormente, el mutante de  $\alpha$ -NAGA se eluyó con MES 20 mM (pH 6,0)/sulfato de amonio 200 mM para recoger fracciones con alta actividad enzimática. El rendimiento de recuperación hasta la columna de Fenil Sepharose HP HiLoad (26/10) fue de aproximadamente 63% con purificación 12 veces.

La fracción activa de cromatografía en columna de Fenil Sepharose HP HiLoad (26/10) se dializó con acetato sódico 20 mM (pH 5,0) y después se añadió a una columna de SP Sepharose HP HiLoad (26/10) equilibrada con acetato sódico 20 mM (pH 5,0). El mutante de  $\alpha$ -NAGA se recogió en la fracción de flujo continuo de acetato sódico 20 mM (pH 5,0). El rendimiento de recuperación activa hasta la columna de SP Sepharose HP HiLoad (26/10) fue de aproximadamente el 40% con purificación 188 veces.

La fracción activa resultante se añadió a una columna de Q Sepharose HP (26/10) equilibrada con MES 20 mM (pH 6,0) para permitir la adsorción del mutante de  $\alpha$ -NAGA. El resultante se lavó con MES 20 mM (pH 6,0)/cloruro sódico 190 mM y MES 20 mM (pH 6,0)/cloruro sódico 190 mM. Posteriormente, el mutante de  $\alpha$ -NAGA se eluyó con MES 20 mM (pH 6,0)/cloruro sódico 250 mM para recoger fracciones con alta actividad enzimática. El rendimiento de recuperación activa hasta la columna de Q Sepharose HP HiLoad (26/10) fue de aproximadamente el 38% con una purificación 489 veces.

Las etapas de la purificación anteriormente descrita del mutante de  $\alpha$ -NAGA se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Etapas	Cantidad de solución (ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Actividad ( $\mu$ mol/h /ml)	Actividad específica ( $\mu$ mol/h /mg)	Actividad total (mmol/h)	Factor	Cantidad total de proteína (mg)	Recuperación (%)
Concentración de Amicon	740	82	74	0,90	55	1	60936	100
Precipitación de sulfato de amonio al 50%	1400	20	38	1,9	53	2,1	27983	96
Fenil Sepharose	425	7,7	81	10	34	12	3269	63
SP-Sepharose	185	0,71	119	169	22	188	131	40
Q-Sepharose	45	1,06	465	439	21	489	48	38



El reactivo en cada etapa de purificación (contenido proteico: 10 µg) se separó por electroforesis en gel de amida poliacrílica-SDS de acuerdo con un método convencional y se sometió a tinción con CBB. Los resultados se muestran en la Figura 8. En la Figura 8, se observan dos bandas que representan el mutante de α-NAGA (véase flechas en la figura) mientras que solamente apareció una única banda después de tratamiento con N-gluconasa (no mostrado). Por lo tanto, las proteínas de las dos bandas son los mismos mutantes de α-NAGA excepto por el número de cadenas de azúcares.

[Ejemplo 11]

<Examen de la captación del mutante de α-NAGA fusionada con el péptido señal de α-GAL por diversos órganos>

El mutante de α-NAGA obtenido por purificación en el Ejemplo 10 se administró por vía intravenosa (administrado iv.) a los ratones del modelo de enfermedad de Fabry (también denominados ratones de enfermedad de Fabry) para examinar la captación por diversos órganos.

En este ejemplo, un “mutante de α-NAGA” se refiere a “α-NAGA(S188E/A191L).

[Método]

1. Los siguientes grupos experimentales 1) a 3) se establecieron con ratones de modelo de enfermedad de Fabry (machos, 25-35 g) y ratones de tipo silvestre.

1) ratones de tipo silvestre (n = 3)

2) ratones con enfermedad de Fabry (n = 3)

3) ratones con enfermedad de Fabry, grupo al que se administró mutante de α-NAGA (n = 3) (dosificación: 1,9 mmol/h/kg de peso del ratón (con una actividad comparable a Fabrazyme 1 mg/kg))

2. Sesenta minutos después de la administración, se resecaron hígados, riñones, corazones, pulmones, cerebros y músculo esquelético del grupo 3) al que se administró el mutante de α-NAGA después de perfusión sistémica con 30 ml de PBS con anestesia.

[Resultados]

Los resultados de la comparación de las actividades α-GAL en diversos órganos se muestran en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

Actividades de α-galactosidasa en diversos órganos después de una hora tras la administración de una única dosis de α-NAGA(S188E/A191L) a ratones con enfermedad de Fabry						
	Actividad α-galactosidasa (nmol/h/mg de proteína: media ± DT)					
	Riñón	Corazón	Hígado	Pulmón	Cerebro	Músculo esquelético
Ratones de tipo silvestre (n=3)	11 ± 2	3,5 ± 0,6	14 ± 7	28 ± 6	23 ± 4	3,8 ± 0,7
Ratones con enfermedad de Fabry (n=3)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ratones con enfermedad de Fabry + α-NAGA(S188E/A191L) (n = 3)	24 ± 4	10 ± 2	193 ± 30	19 ± 10	<1	<1

Como puede apreciarse a partir de los resultados anteriores, la actividad α-GAL en cada tejido de los ratones con enfermedad de Fabry fue de 1,0 nmol/h/mg de proteína o menor. Por otro lado, para el grupo al que se administró mutante de α-NAGA, la actividad α-GAL aumentó en cuatro órganos excepto el cerebro y el músculo esquelético en comparación con los ratones con enfermedad de Fabry. En el riñón y el corazón, es decir, los órganos predominantemente afectados por enfermedad de Fabry, la actividad α-GAL fue mayor que la del riñón y el corazón de los ratones de tipo silvestre, respectivamente, lo que muestra la utilidad del mutante de α-NAGA.

[Ejemplo 12]

<Experimento para confirmar la adquisición de actividad α-GAL y el efecto de degradar sustancia acumulada en diversos órganos por múltiples dosis de mutante de α-NAGA fusionada con el péptido señal de α-GAL>

El mutante de  $\alpha$ -NAGA obtenido por purificación en el Ejemplo 10 se administró por vía intravenosa (administrado iv.) a ratones de modelo de enfermedad de Fabry (también denominados ratones con enfermedad de Fabry) para múltiples dosis. Veinticuatro horas después, se examinó la captación por los diversos órganos y el efecto de la degradación de la sustancia acumulada en los diversos órganos.

5

En el presente ejemplo, un “mutante de  $\alpha$ -NAGA” se refiere a “ $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L)”.

[Método]

10 1. Los siguientes grupos experimentales se establecieron con ratones de modelo de enfermedad de Fabry (macho, 15-20 g) y ratones de tipo silvestre. Aquí, 1) y 2) son iguales que 1) y 2) en el Ejemplo 11.

1) ratones de tipo silvestre (n = 3)

2) ratones con enfermedad de Fabry (n = 3)

15 3) ratones con enfermedad de Fabry, grupo al que se administró mutante de  $\alpha$ -NAGA (n = 4) (se les proporcionaron 1,9 mmol/h/kg de peso de ratón por dosis, cada 24 horas cuatro veces)

2. “Medición de la actividad  $\alpha$ -GAL”

20 Veinticuatro horas después de la cuarta administración, se resecaron hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro y músculo esquelético del grupo 3) al que se proporcionó el mutante de  $\alpha$ -NAGA después de retirar sangre con anestesia. Se determinó la actividad  $\alpha$ -GAL en cada órgano de acuerdo con un método rutinario.

25 3. “Análisis del efecto de degradación del sustrato: análisis de TLC”

El efecto de degradación del sustrato de cada órgano se determinó midiendo el trihexósido de ceramida (THC) acumulada en los órganos. El hígado, riñón y corazón resecados se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se usaron para extracción de glucolípidos totales de cada órgano. Los órganos congelados (50-250 mg) se homogeneizaron en agua hasta 250 mg/ml y se sometieron a extracción con una composición de disolvente de cloroformo:metanol:agua = 4:8:3 de acuerdo con el método de Svennerholm L y Fredman P (véase Svennerholm L, Fredman P, A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1980; 617: 97-109). Después de la centrifugación, se recogió la solución de extracto. Los restos se sometieron a extracción de nuevo con una composición de disolvente de cloroformo:metanol:agua = 5:10:4, se centrifugaron y la solución de extracto resultante se mezcló con la solución de extracto anterior. La solución de extracto mixta se evaporó hasta su sequedad con corriente de nitrógeno.

Tras el análisis de THC, las muestras secas se disolvieron en una composición de disolvente de cloroformo:metanol:agua = 40:20:3 a 2  $\mu\text{l}$  por peso húmedo del órgano (mg). La solución de extracto del órgano preparada se añadió a gel de sílice 60 HPTLC junto con una preparación de THC convencional (THC eritrocítica de cerdo, Wako Pure Chemicals), y se reveló con un disolvente de revelado de cloroformo:metanol:cloruro cálcico acuoso 0,22% = 11:9:2. Después de secar la HPTLC, el resultante se sometió a revelado de color químico con reactivo de orcinol.

45 4. «Análisis del efecto de degradación de sustrato: análisis inmunohistoquímico»

El efecto de degradación de sustrato de cada órgano se analizó de forma inmunohistoquímica. De acuerdo con un método convencional (véase Ikuya Nonaka, *Pathology of Muscles for Clinical Medicine*, 3ª edición revisada, Japan Medical Journal), los hígados, riñones y corazones resecados se cortaron para preparar secciones congeladas de 6  $\mu\text{m}$  de grosor con un criostato. Además, se realizó inmunohistotinción de acuerdo con un método convencional (véase H. Sakuraba *et al.*, Corrective effect of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase having mammalian-like-mannose-type sugar chains produced in yeast on Fabry mice., *J. Human Genet.*, 51, 341-352, 2006). Las secciones congeladas se inmovilizaron con paraformaldehído al 4%/PBS (pH 7,0) durante 15 minutos, se les añadió suero de cabra al 10%/PBS, se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora, se les añadió anticuerpo monoclonal anti THC diluido 2 veces con suero de cabra 10%/PBS (anticuerpo primario), y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante dos horas. Después de la incubación con el anticuerpo primario, el resultante se lavó con Tween 20 0,05%/PBS (PBS-T) durante 5 minutos tres veces. Se añadió anti IgG de ratón de cabra Alexa Fluor 488 (anticuerpo secundario: Invitrogen) diluido 1000 veces con suero de cabra 10%/PBS y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de incubación con el anticuerpo secundario, el resultante se lavó con PBS-T durante 5 minutos tres veces, se montó con medio de montaje Permafluor (Thermo) y se observó con un sistema microscópico fluorescente Axiovert135 (Carl Zeiss).

60

## [Resultados]

## 1. «Medición de la actividad restante»

- 5 Los resultados de la comparación de actividades  $\alpha$ -GAL en diversos órganos se muestran en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Actividad $\alpha$ -galactosidasa de cada tejido 24 horas después de cuatro veces de administración de $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) a ratones con enfermedad de Fabry						
	Actividad $\alpha$ -galactosidasa (nmol/h/mg de proteína: media $\pm$ DT)					
	Riñón	Corazón	Hígado	Pulmón	Cerebro	Músculo esquelético
Ratones de tipo silvestre (n=3)	11 $\pm$ 2	3,5 $\pm$ 0,6	14 6 7	28 $\pm$ 6	23 6 4	3,8 $\pm$ 0,7
Ratones con enfermedad de Fabry (n=3)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ratones con enfermedad de Fabry + $\alpha$ -NAGA(S188E/A191L) (n = 4)	16 $\pm$ 1	30 $\pm$ 7	380 6 34	14 $\pm$ 7	<1	1,2 $\pm$ 0,3

- 10 Para el grupo al que se proporcionaron cuatro dosis del mutante de  $\alpha$ -NAGA, no se detectó ninguna actividad  $\alpha$ -GAL en los cerebros 24 horas después de la administración final. Por otro lado, en los órganos distintos del cerebro, permaneció una actividad  $\alpha$ -GAL mayor en comparación con los ratones con enfermedad de Fabry. En los órganos afectados predominantemente por la enfermedad de Fabry, es decir, los riñones y los corazones, la actividad  $\alpha$ -GAL fue mayor que la de los riñones y corazones de los ratones de tipo silvestre, respectivamente. Esto muestra que el mutante de  $\alpha$ -NAGA permanece no solamente inmediatamente después de la administración sino durante algunos días en los órganos predominantemente afectados, es decir, en los riñones y los corazones. Teniendo en cuenta que se considera en general que una actividad de aproximadamente el 20% del valor normal no provoca ninguna anomalía en el cuerpo, la administración del mutante de  $\alpha$ -NAGA a intervalos regulares mantendría suficiente actividad en el corazón y el riñón.

- 20 Los riñones y los corazones son parte de los órganos en los que la disfunción tras la aparición de enfermedad de Fabry se hace particularmente problemática y por lo tanto son tejidos orgánicos diana, junto con células endoteliales vasculares, tras la administración de un agente terapéutico. Aunque los agentes terapéuticos convencionales para terapia de reemplazo enzimático muestran algún nivel de efecto en las células endoteliales vasculares, sus efectos fueron insuficientes en riñones y corazones. Por lo tanto, los resultados de las actividades  $\alpha$ -GAL en los corazones y riñones mostrados anteriormente demuestran que el mutante de  $\alpha$ -NAGA es una proteína enzimática excelente como un elemento activo de un agente terapéutico para enfermedad de Fabry.

## 2. «Análisis del efecto de degradación del sustrato»

- 30 Los resultados del análisis de THC, es decir, un sustrato de  $\alpha$ -GAL, en los hígados, riñones y corazones se muestran en la Figura 9. La hoja de TLC se secó y se sometió después a inmunotinción de TLC usando anticuerpo anti THC de acuerdo con un método rutinario (véase Kotani M *et al.*, Generation of one set of murine monoclonal antibodies specific for globo-series glycolipids: evidence for differential distribution of the glycolipids in rat small intestine., Arch. Biochem. Biophys., 1994; 310: 89-96) para confirmar que la banda marcada THC en la figura era realmente THC.

- 40 Las cantidades de THC en todos los hígados, riñones y corazones de los ratones con enfermedad de Fabry a los que se administró el mutante de  $\alpha$ -NAGA cuatro veces se redujeron en comparación con las cantidades de THC en los órganos respectivos del grupo de ratones con enfermedad de Fabry no administrados.

## 3. «Análisis del efecto de degradación del sustrato: análisis inmunohistoquímico»

- 45 El efecto de degradación del sustrato en cada órgano se muestra como los resultados del análisis inmunohistoquímico por un método convencional, en las Figuras 10 (riñón), 11 (corazón) y 12 (hígado).

- 50 Como resultado de la tinción de anticuerpo, la reducción en las cantidades de THC se observó en los hígados, riñones y corazones de los ratones con enfermedad de Fabry a los que se administró mutante de  $\alpha$ -NAGA en comparación con los órganos respectivos de los ratones con enfermedad de Fabry, lo que muestra que el mutante de  $\alpha$ -NAGA tiene THC degradada en los órganos.

La reducción en las cantidades de THC en los riñones y corazones, es decir, los órganos predominantemente afectados por enfermedad de Fabry, demuestra que el mutante de  $\alpha$ -NAGA puede degradar suficientemente la THC de sustrato en el cuerpo en lugar de  $\alpha$ -GAL, lo que muestra que el mutante de  $\alpha$ -NAGA es eficaz en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Fabry.

5

### Aplicabilidad industrial

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar enfermedad de Fabry, usando una proteína (mutante de  $\alpha$ -NAGA) que tiene actividad  $\alpha$ -GAL, que no tiene ningún efecto secundario alérgico, cuya estabilidad en sangre (plasma) es alta, y que puede captarse fácilmente por una célula de un órgano afectado. Aquí, dicha proteína no provoca ningún efecto secundario alérgico porque incluso un paciente con enfermedad de Fabry tiene en general  $\alpha$ -NAGA en el cuerpo como una persona normal, y por lo tanto no se induce ninguna reacción alérgica contra un mutante de  $\alpha$ -NAGA que tenga sustancialmente la misma estructura superficial que  $\alpha$ -NAGA. La estabilidad de la proteína en la sangre (plasma) es alta porque  $\alpha$ -NAGA es originalmente más estable que  $\alpha$ -GAL en la sangre, y esa estabilidad se muestra de forma similar también en el caso de un mutante de  $\alpha$ -NAGA. Además, la proteína se capta fácilmente por una célula de un órgano afectado porque originalmente tiene más cadenas de azúcares de unión a M6P que  $\alpha$ -GAL, y esta característica estructural es similar para un mutante de  $\alpha$ -NAGA.

10

15

20

Por lo tanto, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede usarse eficazmente para terapia de reemplazo enzimática, uno de los métodos para tratar enfermedad de Fabry, y por lo tanto es extremadamente útil como una composición farmacéutica que puede ejercer excelentes efectos terapéuticos.

25

Además, la presente invención proporciona, además de la proteína anteriormente descrita (mutante de  $\alpha$ -NAGA) que tiene actividad  $\alpha$ -GAL como una nueva enzima altamente funcional con especificidad de sustrato alterada, un gen que puede codificar dicha proteína, un vector recombinante que comprende dicho gen, un transformante que comprende el vector recombinante, y un método para producir dicha proteína.

### Texto libre del listado de secuencias

30

SEC ID N°: 3: ADN recombinante  
SEC ID N°: 4: proteína recombinante  
SEC ID N°: 5: ADN recombinante  
SEC ID N°: 6: proteína recombinante  
SEC ID N°: 7: ADN recombinante

35

SEC ID N°: 8: proteína recombinante  
SEC ID N°: 13: ADN sintético  
SEC ID N°: 14: ADN sintético  
SEC ID N°: 15: ADN sintético  
SEC ID N°: 16: ADN sintético

40

SEC ID N°: 17: ADN sintético  
SEC ID N°: 18: ADN sintético  
SEC ID N°: 19: ADN sintético  
SEC ID N°: 20: ADN sintético  
SEC ID N°: 21: ADN sintético

45

SEC ID N°: 22: ADN sintético  
SEC ID N°: 23: ADN sintético  
SEC ID N°: 24: ADN sintético

### LISTADO DE SECUENCIAS

50

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

55

<120> Composición farmacéutica para terapia de reemplazo enzimático

<130> PCT08-0037

60

<150> JP 2007-133536  
<151> 18-05-2007

<160> 24

65

<170> Patent In versión 3.4

ES 2 549 121 T3

<210> 1  
 <211> 1236  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1236)

10

<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	
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 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 tot 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 tot 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

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 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

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1236)

15

<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 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 ago			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 oaa 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 aag 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 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			

ES 2 549 121 T3

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  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> proteína recombinante

10

<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

<210> 5  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> ADN recombinante

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1278)

15

<400> 5

atg cag ctg agg aac cca gaa cta cat ctg ggc tgc gcg ott gog ott 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 ggg ctc ctg cag aca cca ccc atg ggc tgg ctg gcc tgg gaa 144  
Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala Trp Glu  
35 40 45

cgc ttc cgc tgc aac att aac tgt gat gag gac cca aag aac tgc ata 192  
Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn Cys Ile  
50 55 60

agt gaa cag ctc ttc atg gag atg gct gac cgg atg gca cag gat gga 240  
Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln Asp Gly  
65 70 75 80

tgg cgg gac atg ggc tac aca tac cta aac att gat gac tgc tgg atc 288  
Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys Trp Ile  
85 90 95

ggc ggt cgc gat gcc agt ggc cgc ctg atg cca gat ccc aag cgc ttc 336  
Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys Arg Phe  
100 105 110

cct cat ggc att cct ttc ctg gct gac tac gtt cac tcc ctg ggc ctg 384  
Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu Gly Leu  
115 120 125

aag ttg ggt atc tac gcg gac atg ggc aac ttc acc tgc atg ggt tac 432  
Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met Gly Tyr  
130 135 140

cca ggc acc aca ctg gac aag gtg gtc cag gat gct cag acc ttc gcc 480



Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Gln	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe	Ala		
145					150					155					160		
gag	tgg	aag	gta	gac	atg	ctc	aag	ctg	gat	ggc	tgc	ttc	tcc	acc	ccc		528
Glu	Trp	Lys	Val	Asp	Met	Leu	Lys	Leu	Asp	Gly	Cys	Phe	Ser	Thr	Pro		
				165					170					175			
gag	gag	cgg	gcc	cag	ggg	tac	ccc	aag	atg	gct	gct	gcc	ctg	aat	gcc		576
Glu	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Tyr	Pro	Lys	Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	
			180					185						190			
aca	ggc	cgc	ccc	atc	gcc	ttc	tcc	tgc	agc	tgg	cca	gcc	tat	gaa	ggc		624
Thr	Gly	Arg	Pro	Ile	Ala	Phe	Ser	Cys	Ser	Trp	Pro	Ala	Tyr	Glu	Gly		
			195				200					205					
ggc	ctc	ccc	cca	agg	gtg	aac	tac	agt	ctg	ctg	gcg	gac	atc	tgc	aac		672
Gly	Leu	Pro	Pro	Arg	Val	Asn	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Ile	Cys	Asn		
	210					215					220						
ctc	tgg	cgt	aac	tat	gat	gac	atc	cag	gac	tcc	tgg	tgg	agc	gtg	ctc		720
Leu	Trp	Arg	Asn	Tyr	Asp	Asp	Ile	Gln	Asp	Ser	Trp	Trp	Ser	Val	Leu		
	225				230					235					240		
tcc	atc	ctg	aat	tgg	ttc	gtg	gag	cac	cag	gac	ata	ctg	cag	cca	gtg		768
Ser	Ile	Leu	Asn	Trp	Phe	Val	Glu	His	Gln	Asp	Ile	Leu	Gln	Pro	Val		
				245					250					255			
gcc	ggc	cct	ggg	cac	tgg	aat	gac	cct	gac	atg	ctg	ctc	att	ggg	aac		816
Ala	Gly	Pro	Gly	His	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Leu	Ile	Gly	Asn		
			260					265					270				
ttt	ggt	ctc	agc	tta	gag	caa	tcc	cgg	gcc	cag	atg	gcc	ctg	tgg	acg		864
Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Glu	Gln	Ser	Arg	Ala	Gln	Met	Ala	Leu	Trp	Thr		
		275					280					285					
gtg	ctg	gca	gcc	ccc	ctc	ttg	atg	tcc	aca	gac	ctg	cgt	acc	atc	tcc		912
Val	Leu	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Met	Ser	Thr	Asp	Leu	Arg	Thr	Ile	Ser		
	290					295					300						
gcc	cag	aac	atg	gac	att	ctg	cag	aat	cca	ctc	atg	atc	aaa	atc	aac		960
Ala	Gln	Asn	Met	Asp	Ile	Leu	Gln	Asn	Pro	Leu	Met	Ile	Lys	Ile	Asn		
	305				310					315					320		
cag	gat	ccc	tta	ggc	atc	cag	gga	cgc	agg	att	cac	aag	gaa	aaa	tct		1008

Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu Lys Ser  
 325 330 335

ctc atc gaa gtg tac atg cgg cct ctg tcc aac aag gct agc gcc tta 1056  
 Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser Ala Leu  
 340 345 350

gtc ttc ttc agc tgc agg acc gat atg cct tat cgc tac cac tcc tcc 1104  
 Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His Ser Ser  
 355 360 365

ott ggc cag ctg aac ttc acc ggg tct gtg ata tat gag gcc cag gac 1152  
 Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala Gln Asp  
 370 375 380

gtc tac tca ggt gac atc atc agt ggc ctc cga gat gaa acc aac ttc 1200  
 Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr Asn Phe  
 385 390 395 400

aca gtg atc atc aac cct tca ggg gta gtg atg tgg tac ctg tat ccc 1248  
 Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu Tyr Pro  
 405 410 415

atc aag aac ctg gag atg tcc cag cag tga 1278  
 Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln  
 420 425

<210> 6  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> proteína recombinante

<400> 6

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

5

10

Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala Trp Glu  
 35 40 45

Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn Cys Ile  
 50 55 60

Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln Asp Gly  
 65 70 75 80

Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys Trp Ile  
 85 90 95

Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys Arg Phe  
 100 105 110

Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu Gly Leu  
 115 120 125

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

Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr Phe Ala  
 145 150 155 160

Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser Thr Pro  
 165 170 175

Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu Asn Ala  
 180 185 190

Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr Glu Gly  
 195 200 205

Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile Cys Asn  
 210 215 220

Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser Val Leu  
 225 230 235 240

Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln Pro Val  
 245 250 255

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

Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu Trp Thr  
 275 280 285

Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr Ile Ser  
 290 295 300

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

Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu Lys Ser  
 325 330 335

Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser Ala Leu  
 340 345 350

Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His Ser Ser  
 355 360 365

Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala Gln Asp  
 370 375 380

Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr Asn Phe  
 385 390 395 400

Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu Tyr Pro  
 405 410 415

Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln  
 420 425

5 <210> 7  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> ADN recombinante

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1278)

15 <400> 7

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 ggg ctc ctg cag aca cca ccc atg ggc tgg ctg gcc tgg gaa 144  
 Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala Trp Glu  
 35 40 45

cgc ttc cgc tgc aac att aac tgt gat gag gac cca aag aac tgc ata 192  
 Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn Cys Ile  
 50 55 60

agt gaa cag ctc ttc atg gag atg gct gac cgg atg gca cag gat gga	240
Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln Asp Gly	
65 70 75 80	
tgg cgg gac atg ggc tac aca tac cta aac att gat gac tgc tgg atc	288
Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys Trp Ile	
85 90 95	
ggc ggt cgc gat gcc agt ggc cgc ctg atg cca gat ccc aag cgc ttc	336
Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys Arg Phe	
100 105 110	
cct cat ggc att cct ttc ctg gct gac tac gtt cac tcc ctg ggc ctg	384
Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu Gly Leu	
115 120 125	
aag ttg ggt atc tac gog gac atg ggc aac ttc acc tgc atg ggt tac	432
Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met Gly Tyr	
130 135 140	
cca ggc acc aca ctg gac aag gtg gtc cag gat gct cag acc ttc gcc	480
Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr Phe Ala	
145 150 155 160	
gag tgg aag gta gac atg ctc aag ctg gat ggc tgc ttc tcc acc ccc	528
Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser Thr Pro	
165 170 175	
gag gag cgg gcc cag ggg tac ccc aag atg gct gct gcc ctg aat gcc	576
Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu Asn Ala	
180 185 190	
aca ggc cgc ccc atc gcc ttc tcc tgc gag tgg cca ctc tat gaa ggc	624
Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Glu Gly	
195 200 205	
ggc ctc ccc oca agg gtg aac tac agt ctg ctg gog gac atc tgc aac	672
Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile Cys Asn	
210 215 220	
ctc tgg cgt aac tat gat gac atc cag gac tcc tgg tgg agc gtg ctc	720
Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser Val Leu	
225 230 235 240	

toc atc ctg aat tgg ttc gtg gag cac cag gac ata ctg cag cca gtg Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln Pro Val 245 250 255	768
gcc ggc cct ggg cac tgg aat gac cct gac atg ctg ctc att ggg aac Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile Gly Asn 260 265 270	816
ttt ggt ctc agc tta gag caa tcc cgg gcc cag atg gcc ctg tgg acg Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu Trp Thr 275 280 285	864
gtg ctg gca gcc ccc ctc ttg atg tcc aca gac ctg cgt acc atc tcc Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr Ile Ser 290 295 300	912
gcc cag aac atg gac att ctg cag aat cca ctc atg atc aaa atc aac Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile Lys Ile Asn 305 310 315 320	960
cag gat ccc tta ggc atc cag gga cgc agg att cac aag gaa aaa tct Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu Lys Ser 325 330 335	1008
ctc atc gaa gtg tac atg cgg cct ctg tcc aac aag gct agc gcc tta Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser Ala Leu 340 345 350	1056
gtc ttc ttc agc tgc agg acc gat atg cct tat cgc tac cac tcc tcc Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His Ser Ser 355 360 365	1104
ctt ggc cag ctg aac ttc acc ggg tct gtg ata tat gag gcc cag gac Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala Gln Asp 370 375 380	1152
gtc tac tca ggt gac atc atc agt ggc ctc oga gat gaa acc aac ttc Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr Asn Phe 385 390 395 400	1200
aca gtg atc atc aac cct tca ggg gta gtg atg tgg tac ctg tat ccc Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu Tyr Pro 405 410 415	1248

atc aag aac ctg gag atg tcc cag cag tga  
 Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln  
                   420                  425

1278

<210> 8  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> proteína recombinante

10

<400> 8

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 Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala Trp Glu  
                   35                  40                  45

Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn Cys Ile  
                   50                  55                  60

Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln Asp Gly  
 65                  70                  75                  80

Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys Trp Ile  
                   85                  90                  95

Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys Arg Phe  
                   100                  105                  110

Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu Gly Leu



	115		120		125														
Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Met	Gly	Asn	Phe	Thr	Cys	Met	Gly	Tyr				
	130					135					140								
Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Gln	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe	Ala				
145					150					155					160				
Glu	Trp	Lys	Val	Asp	Met	Leu	Lys	Leu	Asp	Gly	Cys	Phe	Ser	Thr	Pro				
				165					170					175					
Glu	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Tyr	Pro	Lys	Met	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala				
			180					185					190						
Thr	Gly	Arg	Pro	Ile	Ala	Phe	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu	Tyr	Glu	Gly				
		195					200					205							
Gly	Leu	Pro	Pro	Arg	Val	Asn	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Ile	Cys	Asn				
	210					215					220								
Leu	Trp	Arg	Asn	Tyr	Asp	Asp	Ile	Gln	Asp	Ser	Trp	Trp	Ser	Val	Leu				
225					230					235					240				
Ser	Ile	Leu	Asn	Trp	Phe	Val	Glu	His	Gln	Asp	Ile	Leu	Gln	Pro	Val				
				245					250					255					
Ala	Gly	Pro	Gly	His	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Leu	Ile	Gly	Asn				
			260					265					270						
Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Glu	Gln	Ser	Arg	Ala	Gln	Met	Ala	Leu	Trp	Thr				
		275					280					285							
Val	Leu	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Met	Ser	Thr	Asp	Leu	Arg	Thr	Ile	Ser				

290		295		300											
Ala	Gln	Asn	Met	Asp	Ile	Leu	Gln	Asn	Pro	Leu	Met	Ile	Lys	Ile	Asn
305					310					315					320
Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Ile	Gln	Gly	Arg	Arg	Ile	His	Lys	Glu	Lys	Ser
				325					330					335	
Leu	Ile	Glu	Val	Tyr	Met	Arg	Pro	Leu	Ser	Asn	Lys	Ala	Ser	Ala	Leu
			340					345						350	
Val	Phe	Phe	Ser	Cys	Arg	Thr	Asp	Met	Pro	Tyr	Arg	Tyr	His	Ser	Ser
			355				360						365		
Leu	Gly	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Ile	Tyr	Glu	Ala	Gln	Asp
	370					375								380	
Val	Tyr	Ser	Gly	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Asp	Glu	Thr	Asn	Phe
385					390					395					400
Thr	Val	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Leu	Tyr	Pro
				405					410						415
Ile	Lys	Asn	Leu	Glu	Met	Ser	Gln	Gln							
			420					425							

5 <210> 9  
 <211> 1290  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1290)

<400> 9

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	
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 got	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 occ ttt	caa aag occ	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 got	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 Ala Pro	Leu Phe	Met Ser Asn	Asp Leu Arg	His Ile Ser				
	290		295		300				
cct caa gcc	aaa got 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				
	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	got 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 oct 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> 10  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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

10

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**

5 <210> 11  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(45)

<400> 11

**atg tot 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**

15 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 12

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

25 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 13  
 gatgctgctg aagacagtgc tctt 24

35 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> ADN sintético

45 <400> 14  
 tcactgctgg gacatctcca gggt 24

50 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

55 <400> 15  
 aaaccgttgc tagcttaagt t 21

<210> 16



<211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 16  
 10 cccatcgct tctcctgca gtggccagcc tatga 35  
 <210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 17  
 20 gcaggagaag gcgatggggc ggctgtg 28  
 <210> 18  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 30 <400> 18  
 ttctctgcg agtggccact ctatgaaggc ggcct 35  
 <210> 19  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 40 <400> 19  
 tggccactcg caggagaagg cgatgggg 28  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 50 <400> 20  
 acaatgcagc tgaggaaccc agaa 24  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 21  
 65 gtccagtgtct ctagccccag 20  
 <210> 22

ES 2 549 121 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 22	
10	agagcactgg acaatgggct	20
	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 23	
20	tcactgctgg gacatctcca gggt	24
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
30	<400> 24	
	gggtggacca tcctctagac t	21

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que se selecciona de (a) y (b) a continuación:
  - 5 (a) una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 donde el aminoácido 202 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 se sustituye por ácido glutámico o ácido aspártico mientras que el aminoácido 205 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 se sustituye por leucina, valina o isoleucina; y
  - 10 (b) una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa y que comprende una secuencia de aminoácidos donde de uno a diez aminoácidos distintos de los aminoácidos sustituidos 202 y 205 se suprimen, sustituyen o añaden en la secuencia de aminoácidos en (a) y donde los aminoácidos 42 a 45, 59, 91 a 95, 131 a 141, 164 a 172, 206, 223 a 234, 256 a 268 y 364 en la secuencia de aminoácidos en (a) no están mutados.
- 15 2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el aminoácido sustituido 202 de la proteína de la reivindicación 1 (a) es ácido glutámico mientras que el aminoácido sustituido 205 de la proteína de (a) anterior es leucina.
3. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para uso en un método para tratar la enfermedad de Fabry.
- 20 4. Un gen que se selecciona de (a) y (b) a continuación:
  - (a) un gen que codifica la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
  - (b) un gen que codifica una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa y que comprende ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 donde los nucleótidos 604-606 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 se sustituyen por nucleótidos de un codón de ácido glutámico o ácido aspártico, donde los nucleótidos 613-615 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 se sustituyen por nucleótidos de un codón de leucina, valina o isoleucina y donde los nucleótidos 124 a 135, 175 a 177, 271 a 285, 391 a 423, 490 a 516, 616 a 618, 667 a 702, 766 a 804 y 1.090 a 1.092 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5 no están mutados.
- 30 5. Un gen de acuerdo con la reivindicación 4, donde los nucleótidos sustituidos 604-606 del gen de la reivindicación 4 (b) anterior son nucleótidos de un codón de ácido glutámico mientras que los nucleótidos sustituidos 613-615 del gen de la reivindicación 4 (b) son nucleótidos de un codón de leucina.
- 35 6. Un vector recombinante que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.
7. Un transformante que comprende un vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 6.
- 40 8. Un método para producir una proteína, que comprende las etapas de: cultivar el transformante de acuerdo con la reivindicación 7; y recoger una proteína que tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa del producto cultivado resultante.

Fig. 1

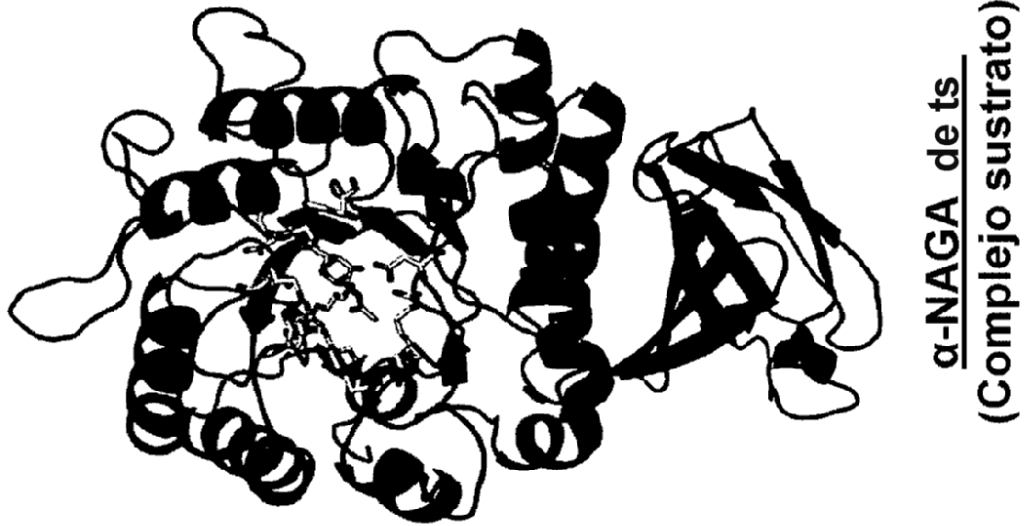
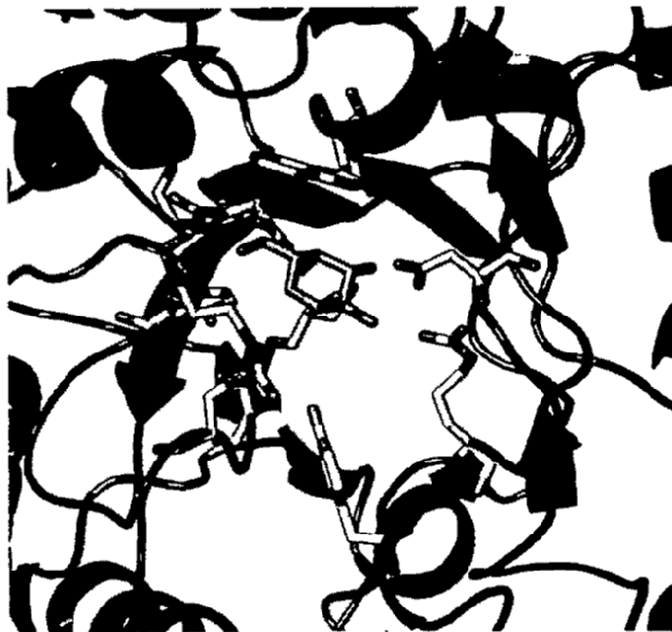


Fig. 2A



$\alpha$ -NAGA de ts  
(Complejo sustrato)



$\alpha$ -GAL de ts  
(Complejo sustrato)

Fig. 2B

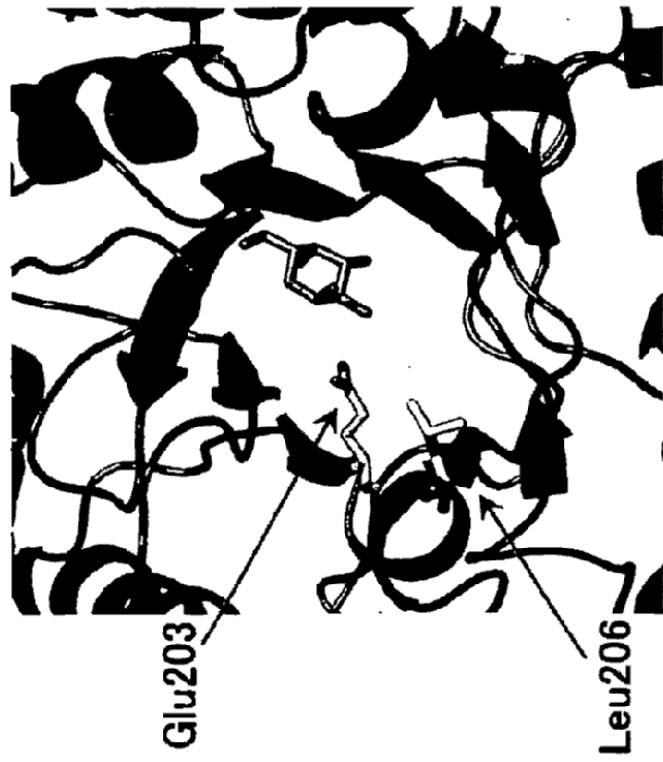


Fig. 2C

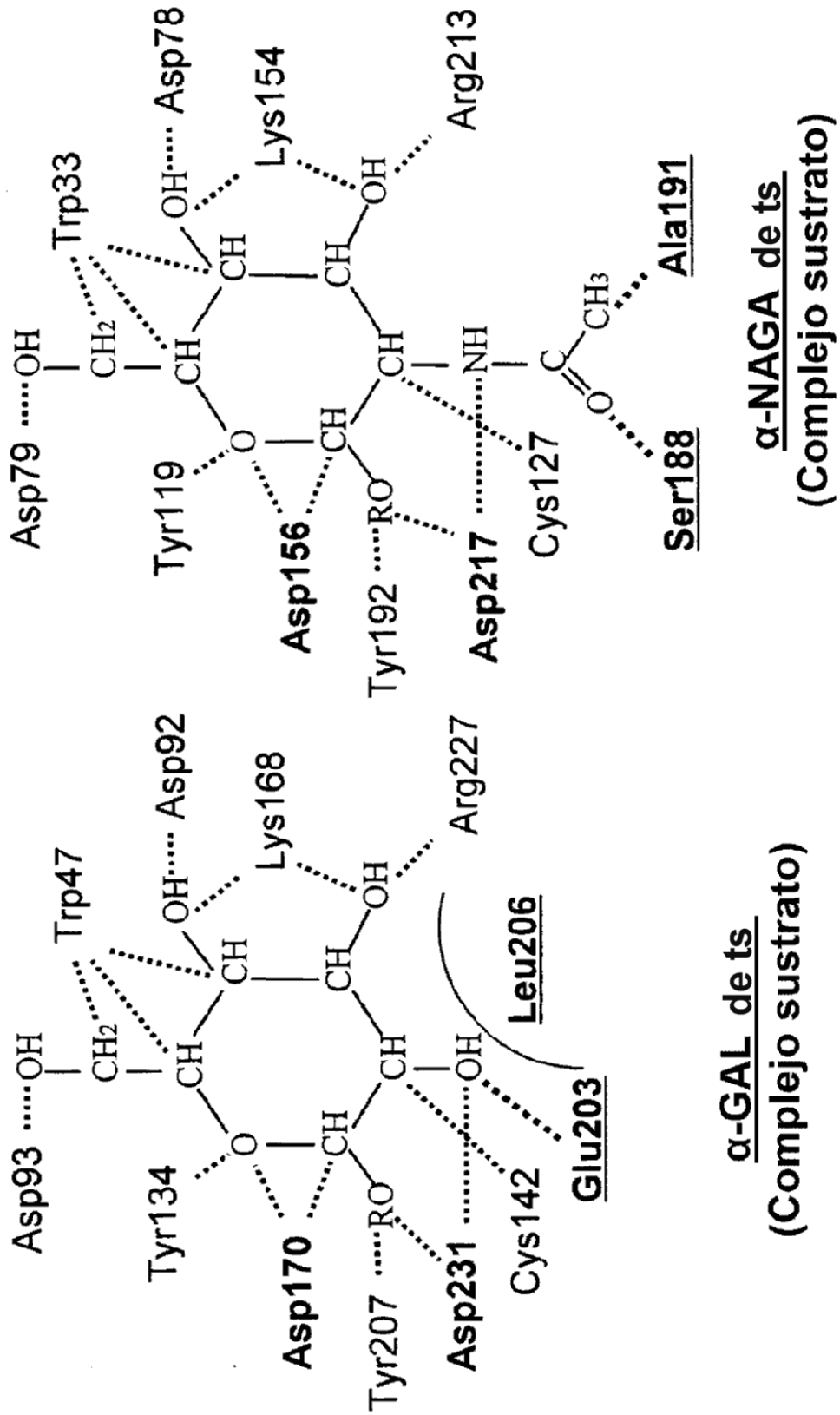


Fig. 3

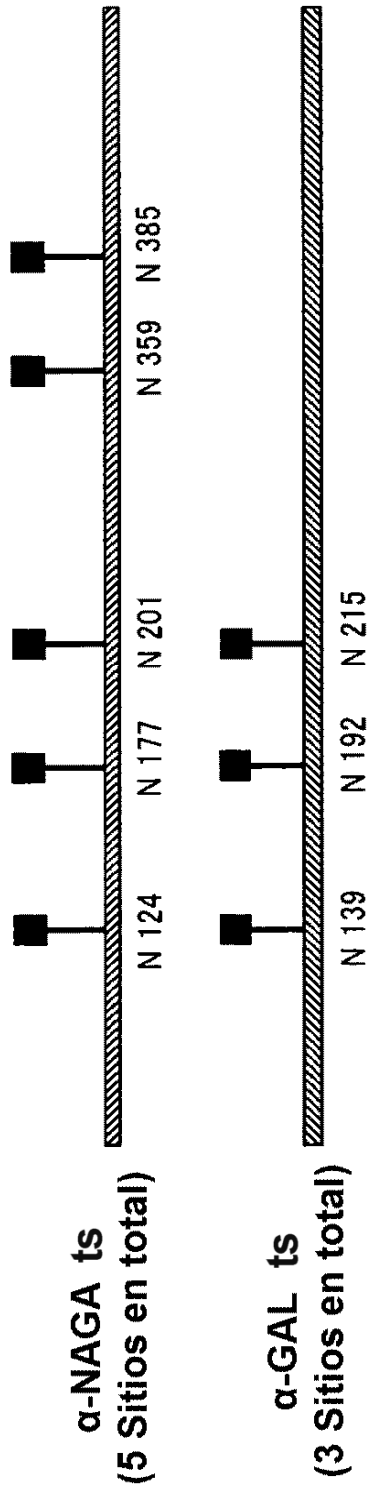




Fig. 4

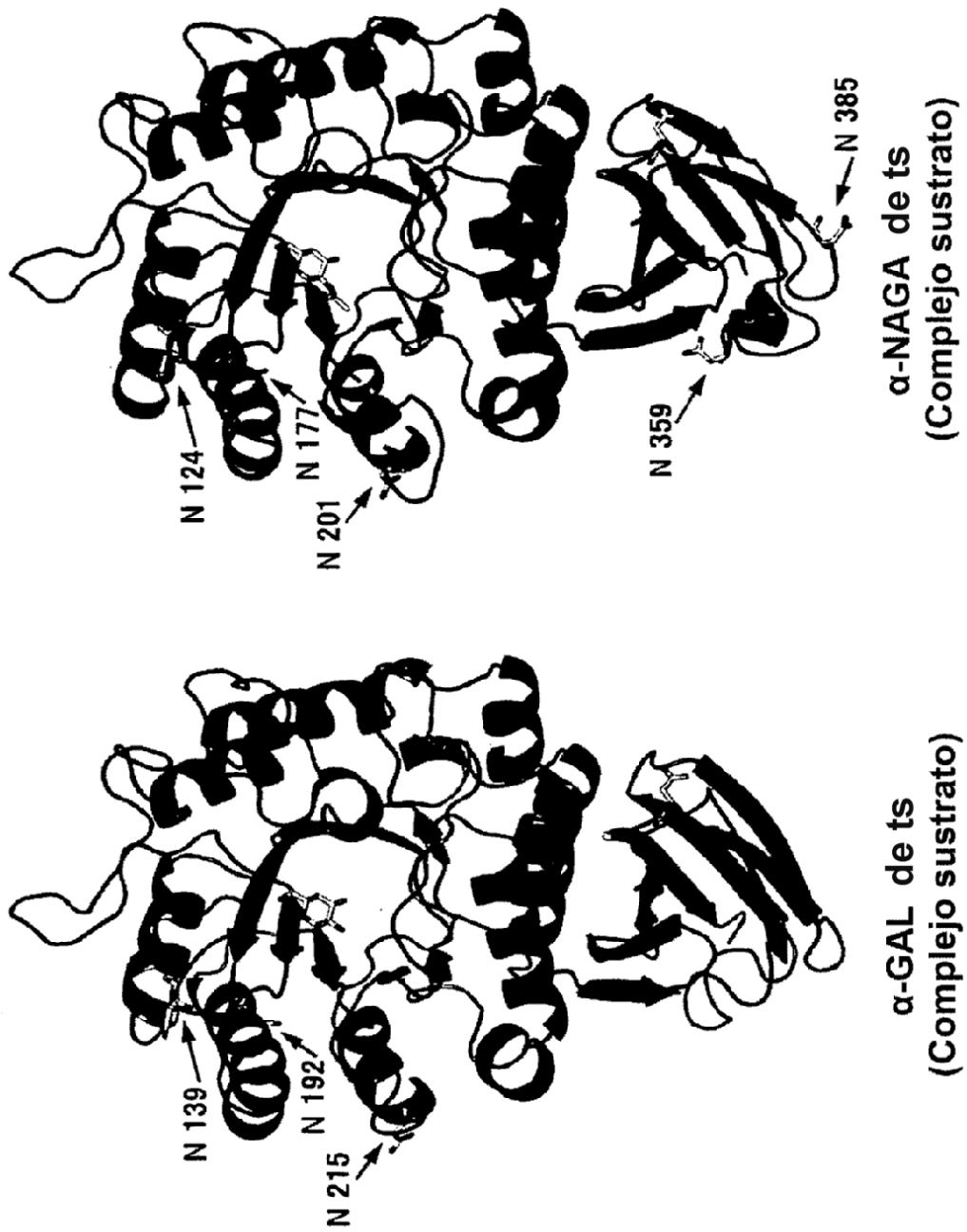


Fig. 5

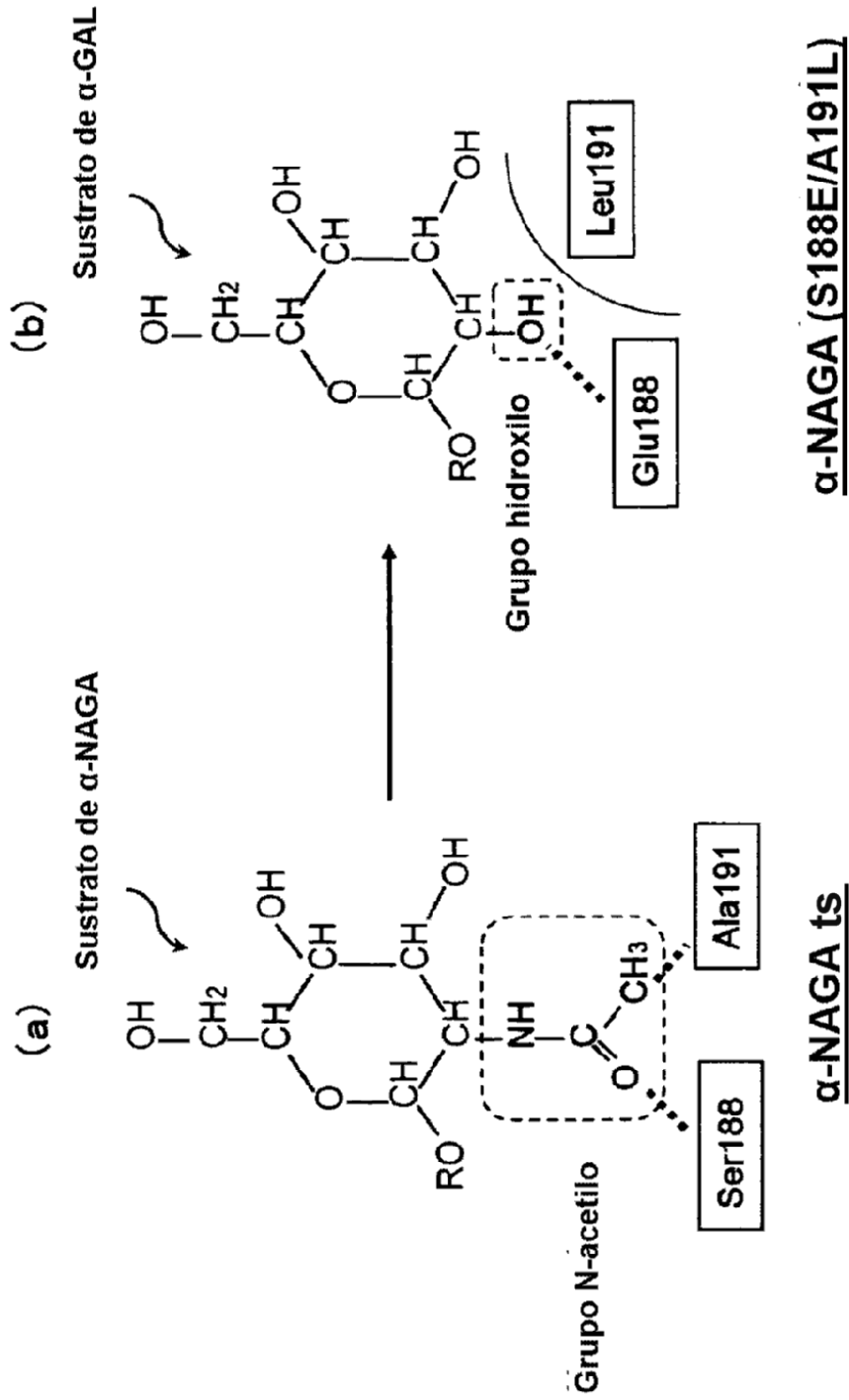


Fig. 6



Fig. 7

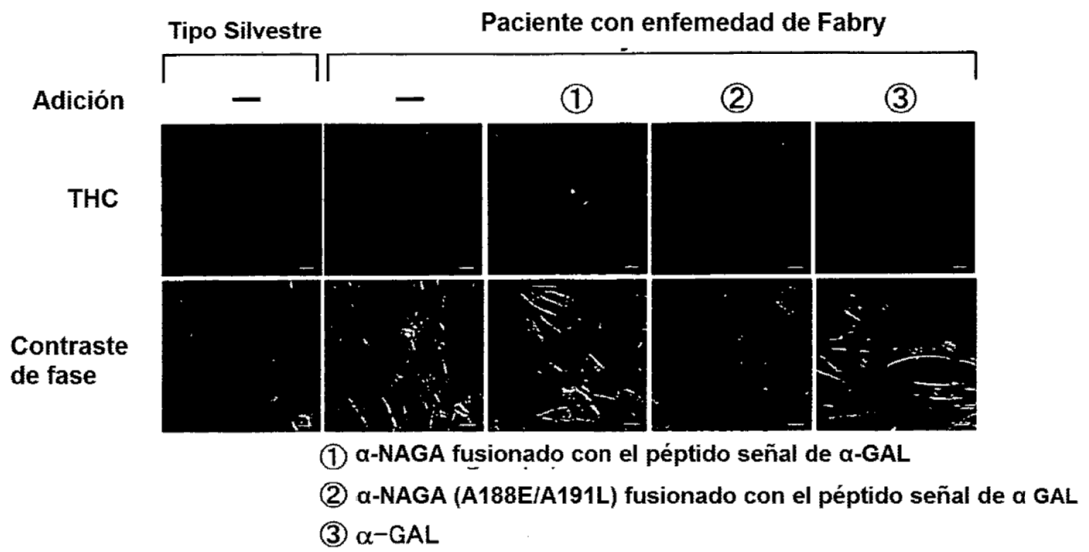


Fig. 8

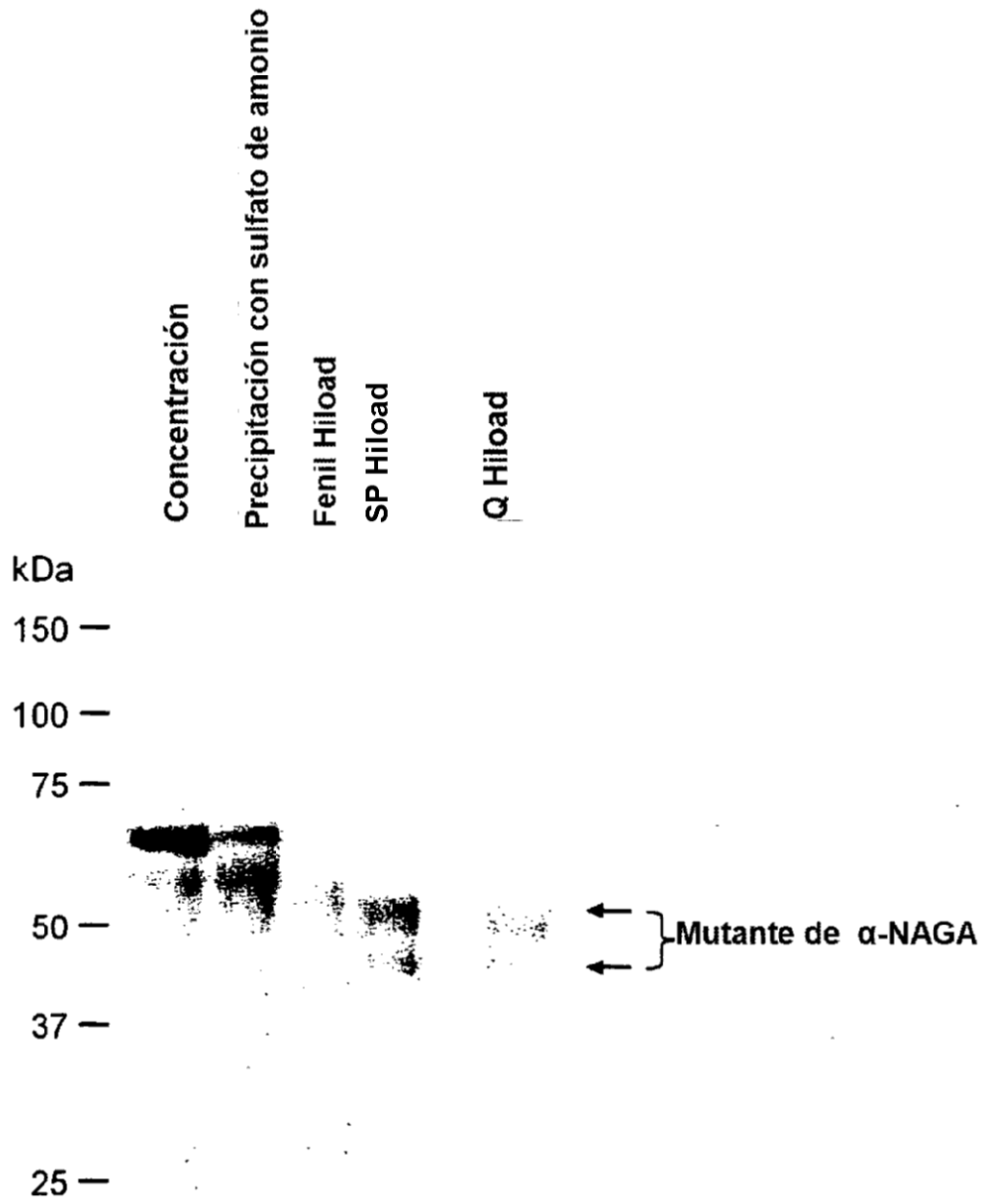
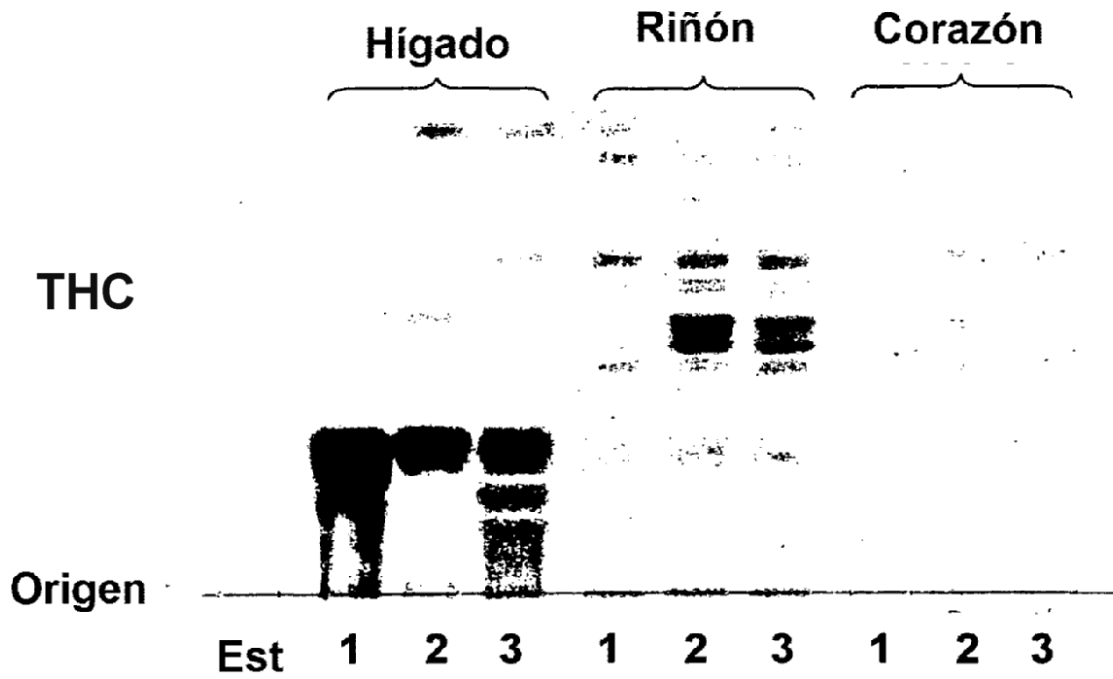


Fig. 9



Est : THL estándar  
1 : Ratones de tipo silvestre  
2 : Ratones con enfermedad de Fabry  
3 : Ratones con enfermedad de Fabry, grupo al que se le administra un mutante de  $\alpha$ -NAGA

Fig. 10

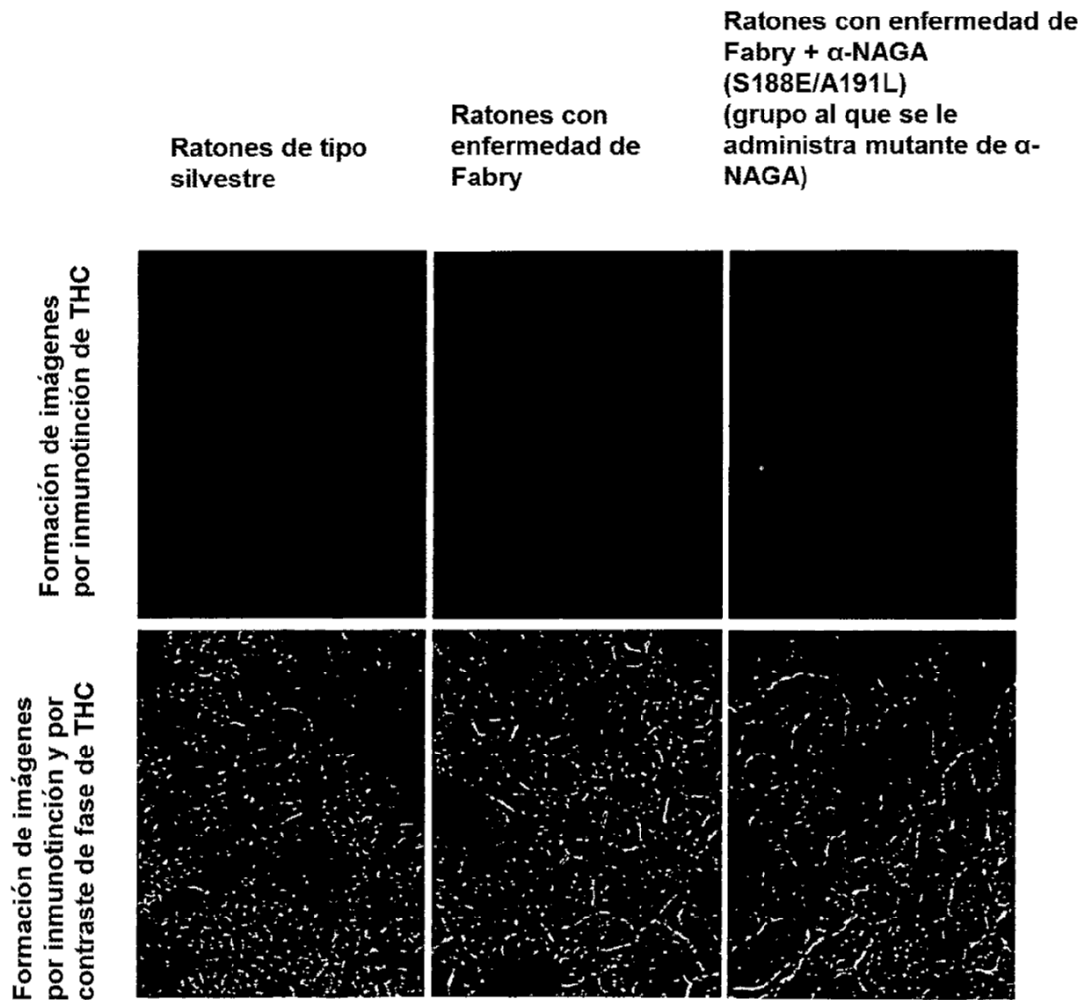


Fig. 11

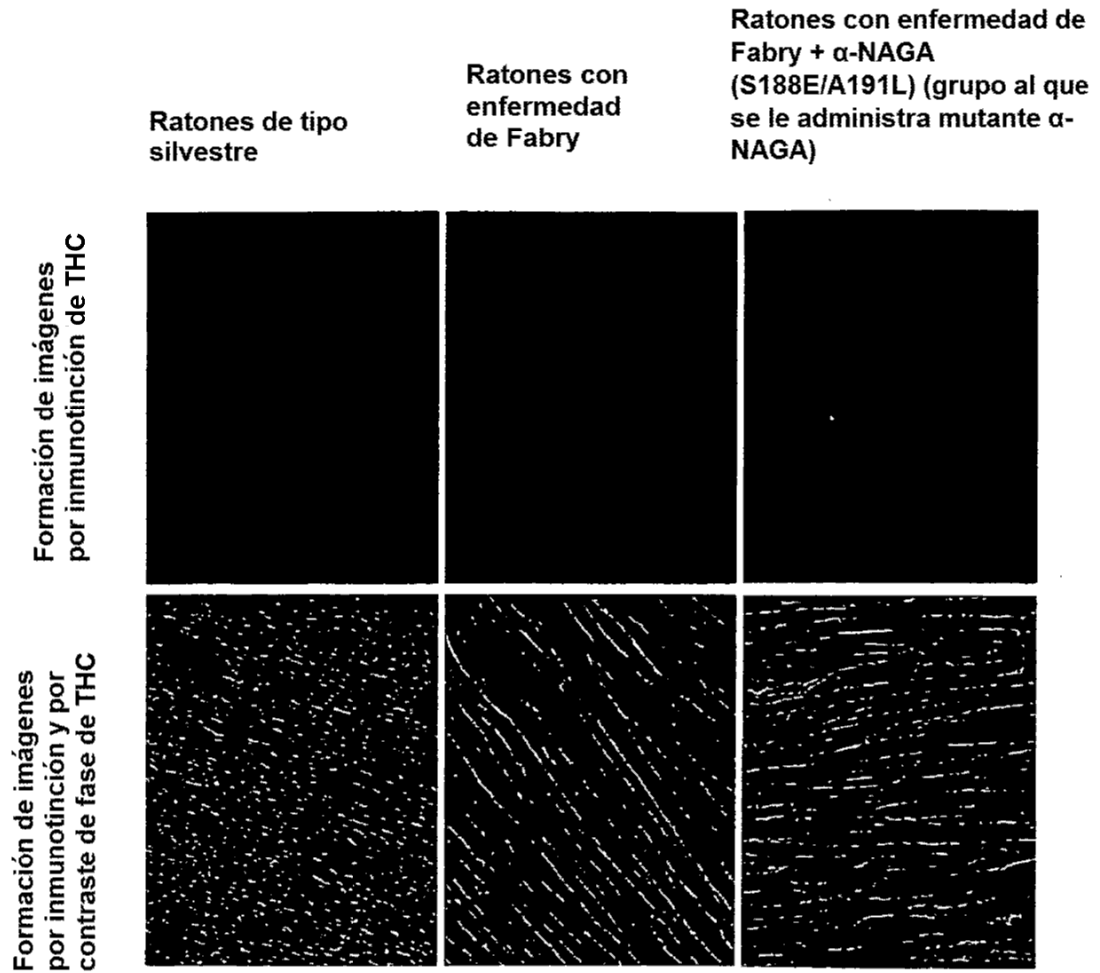




Fig. 12

