(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 716 502**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009 E 15162630 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2946785**

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

(30) Prioridad:

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

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos para determinar si un paciente con la enfermedad de Fabry se beneficiaría del tratamiento con una chaperona farmacológica específica. La presente descripción también proporciona un método *in vitro* para determinar la capacidad de respuesta enzimática (p. ej., α-galactosidasa A) a una chaperona farmacológica (p. ej., 1-desoxigalactonojirimicina) en una línea celular que expresa una forma mutante de la enzima. La invención también proporciona un método para recopilar una tabla de tratamiento de referencia que indica la capacidad de respuesta de una o más mutaciones específicas de α-galactosidasa A a una chaperona farmacológica específica.

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

Diagnóstico de la enfermedad de Fabry

Debido a que la enfermedad de Fabry es poco común, implica múltiples órganos, tiene una franja de aparición etaria amplia y es heterogénea, un diagnóstico adecuado supone un reto. Es poco conocida entre los profesionales sanitarios y los diagnósticos erróneos son frecuentes. Algunos ejemplos de diagnósticos seriamente considerados en pacientes a los que finalmente se les diagnosticó la enfermedad de Fabry incluyen: prolapso de la válvula mitral, glomerulonefritis, proteinuria idiopática, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Whipple, abdomen agudo, colitis ulcerativa, porfiria aguda intermitente y neoplasia maligna oculta. Así pues, incluso para los varones tradicionalmente afectados, el diagnóstico requiere aproximadamente 5-7 años o incluso más. Esto resulta preocupante, ya que cuanto más tiempo padezca una persona la enfermedad de Fabry, más probable será que se produzca un daño mayor en los órganos y tejidos afectados, y que el estado de la persona empeore. El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se suele confirmar sobre la base de una disminución de la actividad de α-Gal A en

leucocitos plasmáticos o periféricos (LEU), una vez que un paciente es sintomático, acompañada de un análisis mutacional. En mujeres, el diagnóstico supone un reto aún mayor ya que la identificación enzimática de mujeres portadoras es menos fiable debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X en algunas células de las portadoras. Por ejemplo, algunas portadoras obligadas (hijas de varones tradicionalmente afectados) tienen actividades enzimáticas de α-Gal A que varían de actividades normales a muy bajas. Debido a que las portadoras pueden tener una actividad enzimática de α-Gal A normal en leucocitos, únicamente la identificación de una mutación en α-Gal A mediante pruebas genéticas proporciona una identificación de portadoras y/o un diagnóstico preciso.

Tratamiento de la enfermedad de Fabry

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

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

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

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

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

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

Para aplicar la terapia con SPC de forma eficaz, se debe adoptar un método rápido, eficaz y de amplia aplicación para detectar la capacidad de respuesta de los pacientes a la terapia SPC antes de iniciar el tratamiento. El

tratamiento se puede implementar en función de los resultados de la detección. Por lo tanto, en la técnica siguen requiriéndose métodos relativamente no invasivos para evaluar rápidamente la estimulación enzimática con terapias potenciales antes de tomar decisiones sobre el tratamiento, por cuestiones de beneficios tanto de costos como emocionales del paciente.

Shimotori *et al*., Human Mutation 29(2), 2007, páginas 1-10 describe un método para identificar pacientes con mutaciones sensibles de alfa-Gal a la 1-desoxigalactonojirimicina.

Resumen de la invención

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

La presente invención proporciona un método para recopilar una tabla de tratamiento de referencia que indica la capacidad de respuesta de una o más mutaciones específicas de α-Gal A a una chaperona farmacológica específica, el método comprende:

i. analizar la respuesta *in vitro* a una chaperona farmacológica específica en una célula huésped que ha sido transformada con un vector de ácido nucleico que codifica una primera α-Gal A mutante por medio del método que comprende:

a. incubar unas primeras células huésped con la chaperona farmacológica específica;

b. medir la actividad de α-Gal A en las células huésped;

c. comparar la actividad de α-Gal A medida en lisados de las primeras células huésped con α-Gal A medida en lisados de las segundas células huésped no tratadas con la chaperona farmacológica específica; y

d. determinar si la primera α-Gal A mutante es sensible al tratamiento con la chaperona farmacológica específica;

ii. repetir las etapas a) y d) para las segundas y posteriores mutaciones de α-Gal A,

iii. recopilar una tabla que enumera las formas mutantes sensibles y no sensibles de α-Gal A, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta,

las primeras y segundas células huésped son células HEK-293 MSR; y una α-Gal A mutante se define como sensible al tratamiento con la chaperona farmacológica si:

hay un aumento de 1,3 a 40 veces en la actividad de α-Gal A en las primeras células huésped en comparación con la actividad de α-Gal A en las segundas células huésped; o

la actividad de α-Gal A en las primeras células huésped es al menos aproximadamente de un 2 a un 100% de actividad de α-Gal A de células HEK-293 MSR que expresan un tipo natural de α-Gal A.

En otra realización, la "tabla de tratamiento de referencia" enumera mutaciones para una enzima lisosomal y la tabla de tratamiento de referencia se emplea para determinar la mejor estrategia terapéutica para tratar un trastorno por acumulación lisosomal. En otra realización de la invención, la proteína es α-Gal A, y la enfermedad es la enfermedad de Fabry.

En una realización, la tabla de tratamiento de referencia describe formas mutantes de enzima, tal como una enzima lisomal (p. ej., α-Gal A) y las opciones de tratamiento están establecidas para los trastornos por acumulación lisosomal (p. ej., enfermedad de Fabry).

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

En otra realización, la presente invención proporciona el uso de α-Gal A para tratar a un paciente que se ha diagnosticado que expresa ciertas proteínas mutantes α-Gal A, tal como se enumera en la reivindicación, donde la actividad de α-Gal A mutante, cuando se expresa en una célula huésped, se puede incrementar al administrar una SPC para esa proteína (por ejemplo, 1-deoxigalactonojirimicina, DGJ).

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

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2A-C muestra la capacidad de respuesta de diferentes mutaciones de α-Gal A al tratamiento con DGJ. La magnitud del incremento en los niveles de actividad de α-Gal A después del tratamiento con DGJ y los valores de CE50 se enumeran para cada mutación ensayada en la Figura 1A-D que respondió al tratamiento con DGJ. El incremento en la actividad enzimática se muestra como un porcentaje de actividad de α-Gal A natural.

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

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

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

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

La Figura 7 muestra la secuencia de ADNc de α-Gal A que fue mutada por mutagénesis dirigida.

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

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

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

La Figura 11 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de la alfa-glucosidasa (GAA) lisosomal humana (N.o de acceso a GenBank: Y00839).

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

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

La Figura 14 muestra la CE50 para la actividad de GAA inducida por DNJ en células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con la mutación P545L de GAA.

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

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

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para recopilar una tabla de tratamiento de referencia que indica la capacidad de respuesta de una o más mutaciones específicas de α-Gal A a una chaperona farmacéutica específica, donde el método es como se estableció anteriormente.

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

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

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

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

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

En otra realización no limitante, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente con Fabry que incluye el paso de administrar al paciente con Fabry una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), donde el paciente expresa una α-Gal A mutante, cuya actividad, cuando se expresa en una célula huésped, se puede aumentar si se pone en contacto con una SPC (p. ej., DGJ). Tales mutaciones de α-Gal A que se pueden tratar de acuerdo con este método incluyen, pero no se limitan a, mutaciones A121T, A156V, A20P, A288D, A288P, A292P A348P, A73V, C52R, C94Y, D234E, D244H, D244N, D264Y, E338K, E341D, E358K, E398K, E48K, E59K, E66Q, F113L, G144V, G183D, G260A, G271S, G325D, G328A, G35R, G373D, G373S, H225R, I219N, I242N, I270T, I289F, I303N, I317T, I354K, 191T, L14P, L166V, L243F, L300F, L310F, L32P, L45R, M267I, M284T, M296I, M296V, M72V, M76R, N224S, N263S, N298K, N298S, N320I, N320Y, N34K, P205R, P259L, P265L, P265R, P293A, P293S, P409S, P40L, P40S, Q279E, Q279H, Q279R, Q280H, Q280K, Q312H, Q321E, Q321R, Q327E, R301P, R342Q, R363C, R363H, R49G, R49L, R49S, S201Y, S276N, S297C, S345P, T194I, V269M, V316E, W340R, W47L y W95S.

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

Una ventaja del ensayo descrito por la presente invención es su amplio espectro de aplicación a pacientes que son mujeres con un trastorno por acumulación lisosomal ligado al cromosoma X, como la enfermedad de Fabry. Debido a la inactivación del cromosoma X, una muestra extraída de una paciente que es una mujer comprenderá tanto células sanas normales como células mutantes con deficiencia enzimática. Un ensayo para determinar el efecto de SPC sobre dicha muestra mostrará una estimulación de la actividad enzimática debido a la expresión de enzimas naturales normales de las células sanas incluso en el caso en que las células enfermas con la enzima mutante puede que no respondan al SPC. La presente invención vence este obstáculo gracias a que una línea celular transfectada con un vector que codifica una proteína mutante expresará únicamente la forma mutante de la proteína y, por lo tanto, no existirá ninguna proteína natural expresada por la línea celular para provocar dicha pseudoestimulación observada en los ensayos con células derivadas de los pacientes.

En otra realización no limitante, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente con Pompe que incluye el paso de administrar al paciente con Pompe una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxinojirimicina (DNJ), donde el paciente expresa una GAA mutante, cuya actividad, cuando se expresa en una célula huésped, se puede aumentar si se pone en contacto con una SPC (p. ej., DNJ). Tales mutaciones de GAA que se pueden tratar de acuerdo con este método incluyen, pero no se limitan a, mutaciones E262K, P266S, P285R, P285S, L291F, L291H, L291P, M318K, G377R, A445P, Y455C, Y455F, P457L, G483R, G483V, M519V, S529V, P545L, G549R, L552P, Y575S, E579K, A610V, H612Q, A644P y ΔN470.

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

Definiciones

Los términos utilizados en la presente descripción generalmente tienen los significados habituales que se les dan en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se emplea cada término.

A continuación, o en cualquier otra parte en la descripción, se describen algunos términos para proporcionar una orientación adicional para el especialista mediante la descripción de las composiciones y métodos de la invención, cómo producirlos y utilizarlos.

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

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

Un “portador” es una mujer que posee un cromosoma X con un gen α-Gal A defectuoso y un cromosoma X con el gen normal, y en la cual la inactivación del cromosoma X del alelo normal está presente en uno o más tipos de células. Un portador suele ser diagnosticado la enfermedad de Fabry.

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

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

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

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

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

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

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

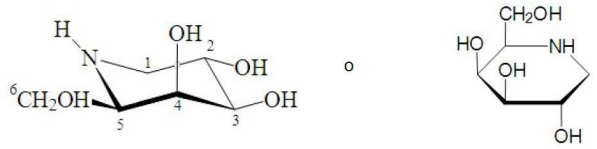
Como se emplea en la presente en una realización, el término “Gba mutante” incluye una Gba que presenta una mutación en el gen que codifica Gba que provoca la incapacidad de la enzima para adoptar una conformación estable en las condiciones que suele presentar el RE. El no poder adoptar una configuración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

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

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

A continuación se presenta una descripción de algunas chaperonas farmacológicas específicas (SPC) contempladas por esta invención:

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



o

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

Otras SPC para α-GAL se describen en las Patentes de EE. UU. 6.274.597, 6.774.135, y 6.599.919 de Fan et al., e incluyen α-3,4-di-epi-homonojirimicina, 4-epi-fagomina, y α-alo-homonojirimicina, N-metil-desoxigalactonojirimicina, β-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina y α-galacto-homonojirimicina, calistegina A_3, calistegina B_2, calistegina B_3, N-metil-calistegina A_3, y N-metil-calistegina B_2 y N-metil-calistegina B_3.

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

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

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

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

Un “paciente que responde” es un individuo al que se le ha diagnosticado o que se sospecha que padece un trastorno por acumulación lisosomal, como por ejemplo, enfermedad de Fabry, cuyas células experimentan una actividad de α-Gal A suficientemente incrementada, y/o la mejoría de los síntomas o una mejora en marcadores indirectos, como respuesta al contacto con una SPC. Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos para las enfermedades de Fabry se presentan en la Patente de EE. UU. con Nº de serie 60/909.185 (publicada como WO008/121826).

Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos para la enfermedad de Fabry presentados en la Patente de EE. UU. con N.o de serie 60/909.185 incluyen aumentos en los niveles o la actividad de α-GAL A en células (p. ej., fibroblastos) y tejido; reducciones de la acumulación de GL-3; disminución de concentraciones en plasma de homocisteína y molécula de adhesión celular vascular-1 (MACV-1); disminución de acumulación de GL-3 en las células miocárdicas y fibrocitos valvulares; reducción de la hipertrofia cardíaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejoría de la insuficiencia valvular y de arritmias; mejoría de la proteinuria; disminución de concentraciones urinarias de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida, y mayores concentraciones urinarias de glucosilceramida y esfingomielina (Fuller et al., Clinical Chemistry. 2005; 51: 688-694); la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos “cebra”) en células epiteliales glomerulares; mejorías en la función renal;

alivio de la hipohidrosis, la ausencia de angioqueratomas; y mejorías en anomalías auditivas tales como la pérdida de la audición sensorineural de alta frecuencia, pérdida progresiva de la audición, sordera súbita o tinnitus. Las mejorías en síntomas neurológicos incluyen la prevención del ataque isquémico transitorio (AIT) o accidente cerebrovascular; y mejoría del dolor neuropático que se manifiesta como acroparestesia (ardor u hormigueo en las extremidades).

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

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

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

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

Método para determinar las opciones de tratamiento

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

Ensayo *in vitro*

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

Transfección transitoria de una línea celular y expresión de una enzima lisosomal mutante

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

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

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

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

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

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

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

En un ejemplo no limitante, la transfección transitoria se puede llevar a cabo en células GripTite 293 MSR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.) empleando el reactivo Fugene de alto rendimiento (Roche). Las células se pueden sembrar en un recipiente de ensayo adecuado, tal como una placa de 96 pocillos (Costar) con una densidad de, por ejemplo, 7.5-10k células/pocillo, y se pueden incubar en condiciones adecuadas, como por ejemplo, a 37ºC, 5% de CO_2 durante 24 horas antes de la transfección. Después de la transfección con constructos de expresión que contienen una α-Gal A mutante específica, las células se pueden incubar de nuevo, por ejemplo, a 37°C, 5% de CO_2 durante una hora antes de agregar DGJ de 50 nM a 1 mM. Las células se pueden incubar posteriormente durante 4-5 días antes de la lisis y el ensayo.

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

Los lisados se pueden descongelar inmediatamente antes del ensayo y se deben suspender empleando una mezcladora tipo vórtex y someter a ultrasonidos antes de agregarlos a los pocillos adecuados, p. ej., en una microplaca. En el contexto de la enfermedad de Fabry, se agrega posteriormente N-acetilgalactosamina (GalNAc) a cada pocillo (para inhibir la α-galactosidasa B), seguida de una breve incubación. Posteriormente se agrega 4-

metilumbeliferil-α-D-galactopiranósido (4-MU Gal) u otro sustrato DGJ debidamente marcado y la placa se mezcla suavemente durante un periodo de tiempo breve, se cubre y se incuba a 37ºC durante un tiempo suficiente para la hidrólisis del sustrato, normalmente aproximadamente 1 hora. Para detener la reacción, se agrega tampón de NaOH-glicina, pH 10.7, a cada pocillo y la placa se lee en un lector de fluorescencia en placas (p. ej., Wallac 1420 Victor3 ™ o un instrumento similar). Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron habitualmente a 355 nm y 460 nm, respectivamente. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por hora. Para cada muestra de un paciente al menos tres muestras normales se pueden evaluar al mismo tiempo.

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

En un ejemplo específico, después de incubar con una SPC, por ejemplo, DGJ, las células huésped se pueden lavar dos veces con PBS, posteriormente se pueden incubar en 200µl de medio recién preparado a 37 °C, 5% de CO_2 durante dos horas, seguido de 2 lavados con PBS adicionales. A continuación, las células se pueden lisar en 60 µL de tampón de lisis (citrato sódico 27 mM/fosfato sódico dibásico 46 mM, 0.5% de Triton X-100, pH 4.6). Posteriormente, se pueden agregar diez µL de lisado a 50 µL de tampón de ensayo (tampón de lisis sin Triton X-100, pero que contiene 4-MU-α-D-galactopiranósido (4-MUG) 6 mM y N-acetil-D-galactosamina (GalNac) 117 mM) y se incuba a 37 °C durante 1 h. Se pueden agregar posteriormente setenta µL de solución de terminación (glicina 0.4 M, pH 10.8) y la fluorescencia se lee en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Se puede sustraer el fondo definido por el recuento de la solución que contiene sustrato únicamente del recuento de la fluorescencia bruta. Se empleó un kit de ensayo para proteínas MicroBCA (*Pierce*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para determinar la concentración de proteína en 40 µL de lisado celular. Se procesó una curva estándar para la 4-metilumbeliferona (4-MU) con concentraciones de 30 µM a 1.3 nM en paralelo para calcular la actividad absoluta de α-Gal A expresada como nmol/mg de proteína/h o se normalizó posteriormente para % de actividad de la enzima natural sin tratar.

Tabla de tratamiento de referencia

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

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

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

Trastornos tratables

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

Criterios de determinación de eligibilidad

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

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

Kits

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

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

a. un panel de células huésped, donde cada una expresa una α-Gal A mutante, o como alternativa, una célula huésped, un vector que codifica una α-Gal A mutante y un medio para transfectar la célula huésped de forma que la célula huésped exprese la α-Gal A mutante;

b. una chaperona farmacológica específica;

c. un sustrato cromogénico o fluorogénico para el ensayo enzimático (que incluye un estándar adecuado); y

d. GalNAc.

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

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

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

Ejemplos

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

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

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

Introducción

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

Métodos y materiales

Mutagénesis: Todas las mutaciones se generaron por mutagénesis dirigida siguiendo los protocolos estándares de biología molecular. Para generar mutaciones puntuales, la mutagénesis dirigida se empleó en la expresión del vector pcDNA3.1 (*Invitrogen*) que contenía ADNc de α-GAL A humano en fase. Se diseñaron pares de cebadores específicos que contenían la mutación deseada (Figura 6). La mutagénesis se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando ADN polimerasa *PfuUltra* de alta fidelidad (*Stratagene*) en un termociclo. Cada mezcla de reacción contenía un volumen total de 50 ul con lo siguiente: 41.6 ul de dH_2O, 5.0 ul de 10X tampón de reacción *PfuUltra* de alta fidelidad, 0.5 uL de cebador-5'-directo (50 uM), 0.5 ul de cebador-3'-inverso, 1.0 ul de mezcla dNTP (que contenía 25 mM de cada dA, dT, dC, dG), 0.9 ul de *GLA* humana en pcDNA3 (2ng/ul de ADN), 0.5ul de ADN polimerasa *PfuUltra* de alto rendimiento. Los parámetros del termociclo empleados fueron los siguientes: i) 94 °C durante 30 segundos, ii) 94 °C durante 30 segundos, 55-60 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 6 minutos, iii) repetir (ii) 16 veces. Posteriormente, se agregaron 0.5 ul de *Dpn* I (New England Biolabs) a cada reacción y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se empleó un volumen de 7.5 ul para cada reacción de mutagénesis para transformar células DH5α (*New England Biolabs*). Las células se colocaron posteriormente en placas LB-agar con 75 ug/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las colonias bacterianas se recogieron, se cultivaron en LB líquido con ampicilina durante la noche con agitación a 37 °C y se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit QuickLyse Miniprep (*Qiagen*). Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de la longitud completa del gen *GLA* humano. Para algunas de las mutaciones, el ADNc de GLA humano estaba contenido en el vector plasmídico pCXN. La mutagénesis tuvo lugar en este vector con la ADN polimerasa NEB Fusion. Tras confirmar la mutación por secuenciación, el plásmido fue digerido con *EcoR*I y subclonado en el vector de expresión pcDNA3.1. La orientación correcta se confirmó por digestión con *Xho* I.

Expresión y transfección transitoria: La transfección transitoria se llevó a cabo en células GripTite 293 MSR (*Invitrogen* Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.) empleando el reactivo Fugene de alto rendimiento (*Roche*). Resumiendo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) con una densidad de 7.5-10k células/pocillo y se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2 durante 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con 0.1 µg de ADN y 0.35 µL de reactivo Fugene de alto rendimiento por pocillo (proporción de ADN: Reactivo de 2:7). Después de la transfección con constructos de expresión que contenían mutaciones de α-Gal A específicas, las células se incubaron de nuevo a 37 °C, 5% de CO_2 durante una hora antes de agregar DGJ de 20 nM a 1 mM. Las células se incubaron posteriormente durante 4-5 días antes de la lisis y el ensayo.

Medida de la actividad de α-GAL A: Las células se lavaron dos veces con PBS, luego se incubaron con 200 µl de medio fresco a 37 °C, 5% de CO_2 durante dos horas, seguido de 2 lavados con PBS adicionales. A continuación, las células se lisaron en 60 µL de tampón de lisis (citrato sódico 27 mM/fosfato sódico dibásico 46 mM, 0.5% de Triton X-100, pH 4.6). Se agregaron diez µL de lisado a 50 µL de tampón de ensayo (tampón de lisis sin Triton X-100, pero que contenía 4-MU-α-D-galactopiranósido (4-MUG) 6 mM y N-acetil-D-galactosamina (GalNac) 117 mM) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Se agregaron posteriormente setenta µL de solución de terminación (glicina 0.4 M, pH 10.8) y la fluorescencia se leyó en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Se sustrajo el fondo definido por el recuento de la solución que contiene sustrato únicamente del recuento de la fluorescencia bruta. Se empleó un kit de ensayo para proteínas MicroBCA (*Pierce*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para determinar la concentración de proteína en 40 µL de lisado celular. Se procesó una curva estándar para la 4-metilumbeliferona (4-MU) con concentraciones de 30 µM a 1.3 nM en paralelo para calcular la actividad absoluta de α-Gal A expresada como nmol/mg de proteína/h o se normalizó posteriormente como % de actividad de la enzima natural sin tratar.

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

Resultados

Todas las mutaciones de Fabry enumeradas se generaron por mutagénesis dirigida (Figura 1). Las mutaciones representadas en cursiva no se ensayaron, mientras que las representadas en texto normal fueron las mutaciones de α-Gal A que respondieron al tratamiento con DGJ en el ensayo de transfección transitoria y las representadas en negrita y subrayadas no respondieron al tratamiento con DGJ en el ensayo de transfección transitoria. La magnitud del incremento en los niveles de α-Gal A después del tratamiento con DGJ y los valores de CE50 se enumeran para cada mutación ensayada que respondió al tratamiento con DGJ (Figura 2).

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

Los niveles de α-Gal A se midieron en tres ensayos diferentes, se presentaron como porcentaje de natural y se compararon para cada mutación representándolos juntos. Los tres ensayos diferentes examinaron los niveles de α-

Gal A en linfocitos T y linfoblastos aislados de pacientes con Fabry (por ejemplo, remítase a la Patente de EE. UU. con N.o de serie 11/749.512), así como también en leucocitos (Leu) de estudios de DGJ de fase 2.

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

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

Conclusión

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

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

Entre las mutaciones sensibles identificadas, los incrementos en los niveles de α-Gal A por el tratamiento con DGJ variaron de 1.3 a 40 veces más (de 2% a 100% de natural), con valores de CE50 de entre 200 nM y >100 mM.

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

Ejemplo 3: Efecto de una SPC sobre la actividad de α-GAL A en la piel, el corazón, el riñón o el plasma *in vivo*

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

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

Se lavaron las muestras de tejido para eliminar la sangre y se pesaron y homogeneizaron con un sistema de solventes en un sistema FastPrep®. Se extrajo el homogenado posteriormente empleando extracción en fase sólida en un cartucho CI 8. El eluyente se evaporó y se reconstituyó antes de inyectarlo en un sistema LC-MS/MS. Se midieron doce isoformas de GL-3 empleando ESI-MS/MS en modo positivo. Se consiguió la separación por LC en una columna 00839a Zorbax C18.

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

Párrafos de ventaja

Los siguientes párrafos se proporcionan solo con fines descriptivos y no definen el alcance de la invención.

1. Un método para determinar si un paciente que expresa una forma mutante de una proteína responderá a tratamiento con una chaperona farmacológica específica para la proteína, cuyo método comprende:

a. poner en contacto una primera célula huésped con una chaperona farmacológica específica para la proteína, donde la primera célula huésped expresa la forma mutante de la proteína; y

b. comparar la actividad de la proteína en una segunda célula huésped que no ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica, con la actividad de la proteína en la primera célula huésped que ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica, donde un aumento en la actividad de la proteína en la primera célula huésped que ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica en comparación con la actividad de la proteína expresada por la segunda célula huésped que no ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica indica que el paciente responderá al tratamiento con la chaperona farmacológica específica.

2. El método del párrafo 1, donde la forma mutante de la proteína es causada por una mutación en sentido erróneo en un gen que codifica la proteína.

3. El método de cualquiera de los párrafos 1 o 2, donde la proteína es una enzima.

4. El método del párrafo 3, donde la enzima es una enzima lisosomal.

5. El método del párrafo 4, donde se ha diagnosticado al paciente con un trastorno por acumulación lisosomal.

6. El método del párrafo 5, donde la enzima lisosomal es α-galactosidasa A y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Fabry.

7. El método del párrafo 6, donde la α-galactosidasa A es una α-galactosidasa A mutante seleccionada de entre el grupo que consiste en las mutaciones A121T, A156V, A20P, A288D, A288P, A292P A348P, A73V, C52R, C94Y, D234E, D244H, D244N, D264Y, E338K, E341D, E358K, E398K, E48K, E59K, E66Q, F113L, G144V, G183D, G260A, G271S, G325D, G328A, G35R, G373D, G373S, H225R, I219N, I242N, I270T, I289F, I303N, I317T, I354K, I91T, L14P, L166V, L243F, L300F, L310F, L32P, L45R, M267I, M284T, M296I, M296V, M72V, M76R, N224S, N263S, N298K, N298S, N320I, N320Y, N34K, P205R, P259L, P265L, P265R, P293A, P293S, P409S, P40L, P40S, Q279E, Q279H, Q279R, Q280H, Q280K, Q312H, Q321E, Q321R, Q327E, R301P, R342Q, R363C, R363H, R49G, R49L, R49S, S201Y, S276N, S297C, S345P, T194I, V269M, V316E, W340R, W47L, y W95S de α-galactosidasa.

8. El método del párrafo 7, donde la α-galactosidasa A mutante se selecciona de entre el grupo que consiste en las mutaciones G144V, H225R, S276G, R301P, y N320I de α-galactosidasa A.

9. El método de cualquiera de los párrafos 1-8, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina.

10. El método del párrafo 5, donde la enzima lisosomal es α-glucosidasa y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Pompe.

11. El método del párrafo 10, donde la α-glucosidasa es una α-glucosidasa mutante seleccionada en entre el grupo que consiste en las mutaciones E262K, P266S, P285R, P285S, L291F, L291H, L291P, M318K, G377R, A445P, Y455C, Y455F, P457L, G483R, G483V, M519V, S529V, P545L, G549R, L552P, Y575S, E579K, A610V, H612Q, A644P, y ΔN470 de α-glucosidasa.

12. El método de los párrafos 10 u 11, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxinojirimicina.

13. El método del párrafo 5, donde la enzima lisosomal es glucocerebrosidasa y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

14. El método del párrafo 13, donde la chaperona farmacológica específica es isofagomina.

15. El método del párrafo 1, donde la célula huésped se selecciona de entre el grupo que consiste en células CHO, células HeLa, células HEK-293, células GripTite 293 MSR, células 293T, células COS, células COS-7, mioblastos primarios de ratón y células NIH 3T3.

16. El método del párrafo 15, donde la célula huésped es una célula HEK-293.

17. El método del párrafo 15, donde la célula huésped es una célula COS-7.

18. El método del párrafo 15, donde la actividad de la proteína se determina utilizando un ensayo fluorogénico que cuantifica la hidrólisis del sustrato en lisados de la célula huésped.

19. Un método para producir una tabla de terapia de tratamiento, donde la tabla de terapia de tratamiento indica si una chaperona farmacológica específica es un compuesto eficaz para aumentar la actividad de una proteína mutante, cuyo método comprende:

a. poner en contacto una primera célula huésped con una chaperona farmacológica específica para la proteína, donde la primera célula huésped expresa la proteína mutante;

b. comparar la actividad de la proteína en la primera célula huésped que ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica con la actividad de la proteína en una segunda célula huésped que no ha entrado en contacto con la chaperona farmacológica específica, y

c. registrar el resultado de la etapa (b) en la tabla de terapia de tratamiento,

donde una chaperona farmacológica específica registrada en la tabla de terapia de tratamiento que aumenta la actividad de la proteína mutante en la primera célula huésped en comparación con la actividad de la proteína mutante en la segunda célula huésped es una chaperona farmacológica específica que se puede utilizar como terapia para un paciente que expresa la proteína mutante.

20. El método del párrafo 19, donde la proteína es una enzima α-galactosidasa A.

21. El método del párrafo 20, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina.

22. El método del párrafo 19, donde la proteína es una enzima α-glucosidasa.

23. El método del párrafo 22, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxinojirimicina.

24. El método del párrafo 19, donde la proteína es una enzima glucocerebrosidasa.

25. El método del párrafo 24, donde la chaperona farmacológica específica es isofagomina.

26. Un método para seleccionar una chaperona farmacológica específica para tratar a un paciente que expresa una forma mutante de una proteína.

donde la chaperona farmacológica específica se selecciona de la tabla de tratamiento de referencia que comprende una lista de mutaciones en la proteína y el efecto de la chaperona farmacológica específica sobre la actividad de las mutaciones de la proteína, y

donde la chaperona farmacológica específica seleccionada para tratar al paciente aumenta la actividad de la proteína mutante expresada por el paciente.

27. El método del párrafo 26, donde se ha diagnosticado al paciente con un trastorno por acumulación lisosomal.

28. El método de cualquiera de los párrafos 26 o 27, donde la proteína es una enzima α-galactosidasa A.

29. El método de cualquiera de los párrafos 28, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina.

30. El método de cualquiera de los párrafos 26 o 27, donde la proteína es una enzima α-glucosidasa.

31. El método de cualquiera de los párrafos 30, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxinojirimicina.

32. El método de cualquiera de los párrafos 26 o 27, donde la proteína es una enzima glucocerebrosidasa.

33. El método de cualquiera de los párrafos 32, donde la chaperona farmacológica específica es isofagomina.

34. Un método para tratar a un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxigalactonojirimicina, donde el paciente expresa una α-galactosidasa A mutante seleccionada de entre el grupo que consiste en las mutaciones A121T, A156V, A20P, A288D, A288P, A292P A348P, A73V, C52R, C94Y, D234E, D244H, D264Y, E338K, E341D, E398K, E48K, F113L, G144V, G260A, G271S, G328A, G35R, G373D, G373S, H225R, I219N, I242N, I270T, I303N, I317T, I354K, L14P, L166V, L243F, L300F, L310F, L32P, M267I, M284T, M296I, M72V, M76R, N224S, N298K, N298S, N320I, N34K, P259L, P265L, P265R, P293A, P293S, P409S, P40L, Q279H, Q279R, Q280H, Q280K, Q312H, Q321E, Q321R, Q327E, R301P, R363H, R49G, R49S, S201Y, S276N, S297C, S345P, T194I, V269M, W340R, W47L, y W95S de α-galactosidasa.

35. Un método para tratar a un paciente diagnosticado con la enfermedad de Pompe que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de 1-desoxinojirimicina, donde el paciente expresa una α-glucosidasa mutante seleccionada de entre el grupo que consiste en las mutaciones E262K, P266S, P285R, P285S, L291F, L291H, L291P, M318K, G377R, A445P, Y455C, Y455F, P457L, G483R, G483V, M519V, S529V, P545L, G549R, L552P, Y575S, E579K, A610V, H612Q, A644P, y ΔN470 de α-glucosidasa.

36. Un método para tratar a un paciente que expresa una proteína mutante que comprende identificar la proteína mutante, determinar si el paciente debería responder a la chaperona farmacológica específica utilizando una tabla de terapia de tratamiento, y si se determina que el paciente debería responder a dicha chaperona farmacológica específica, administrar dicha chaperona farmacológica específica al paciente.

37. El método del párrafo 36, donde la proteína mutante es una enzima lisosomal mutante y al paciente se le ha diagnosticado un trastorno por acumulación lisosomal.

38. El método del párrafo 36 o 37, donde la enzima lisosomal es α-galactosidasa A y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Fabry.

39. El método de la reivindicación 37, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina.

40. El método del párrafo 36 o 37, donde la enzima lisosomal es α-glucosidada y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Pompe.

41. El método del párrafo 40, donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxinojirimicina.

42. El método del párrafo 36 o 37, donde la enzima lisosomal es glucocerebrosidasa y el trastorno por acumulación lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

43. El método del párrafo 42, donde la chaperona farmacológica específica es isofagomina.

44. El método del párrafo 34, donde la tabla de terapia de tratamiento se produce según el método de cualquiera de las reivindicaciones 19-25.

REIVINDICACIONES

1. Un método para recopilar una tabla de tratamiento de referencia que indica la capacidad de respuesta de una o más mutaciones específicas de α-Gal A a una chaperona farmacéutica específica, el método comprende:

i. analizar *in vitro* la respuesta a la chaperona farmacéutica específica en una célula huésped que se ha transformado con un vector de ácido nucleico que codifica una primera α-Gal A mutante por medio de un método que comprende:

a. incubar unas primeras células huésped con la chaperona farmacológica específica;

b. medir la actividad de α-Gal A en las células huésped;

c. comparar la actividad de α-Gal A medida en lisados de las primeras células huésped con α-Gal A medida en lisados de las segundas células huésped no tratadas con la chaperona farmacológica específica; y

d. determinar si la primera α-Gal A mutante es sensible al tratamiento con la chaperona farmacológica específica;

ii. repetir las etapas (a) y (d) para las segundas y posteriores mutaciones de α-Gal A,

iii. recopilar una tabla que enumere las formas mutantes sensibles y no sensibles de α-Gal A,

donde la chaperona farmacológica específica es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta;

las primeras y segundas células huésped son células HEK-293 MSR; y

una α-Gal A se define como sensible al tratamiento con la chaperona farmacológica específica si:

hay un aumento de 1,3 a 40 veces en la actividad de α-Gal A en las primeras células huésped en comparación con la actividad de α-Gal A en las segundas células huésped; o

la actividad de α-Gal A en las primeras células huésped es al menos aproximadamente de un 2 a un 100% de actividad de α-Gal A de células HEK-293 MSR que expresan un tipo natural de α-Gal A.

2. Un método según la reivindicación 1, donde la forma mutante de α-Gal A es causada por una mutación en sentido erróneo en un gen que codifica α-Gal A.

3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la primera célula huésped entra en contacto con 1-desoxigalactonojirimicina en una concentración de 20 nM a 1 mM.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la actividad de la proteína se determina utilizando un ensayo que cuantifica la hidrólisis de un sustrato en lisados de la célula huésped, donde un aumento en la hidrólisis es indicativo de actividad aumentada de α-Gal A; y donde el sustrato es un sustrato fluorogénico que se puede escindir con α-Gal A humana.

5. Un método según la reivindicación 4, donde el sustrato es 4-metilumbeliferil-α-D-galactopiranósido.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la chaperona farmacológica específica es clorhidrato de 1-desoxigalactonojirimicina

7. 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente al que se le ha identificado que tiene una forma mutante sensible a α-Gal A utilizando una tabla de tratamiento de referencia recopilada por un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la forma mutante sensible de α-Gal A se selecciona de entre mutaciones M1R, L14P, L16H, L16P, L19P, D33Y, N34K, G35R, L36F, A37V, P40L, P40S, M42L, M42R, M42T, L45R, W47L, E48D, E48K, R49G, R49L, R49P, R49S, M51I, C52R, L54P, D55V, C56F, C56G, C56Y, P60L, S65T, E66G, E66K, L68F, M72R, A73V, M76R, W81C, W81S, G85D, G85M, Y88D, C94Y, W95S, A97P, R112S, I117S, R118C, L120P, A121T, A135V, D136H, G147R, Y152C, A156T, A156Y, W162G, G163V, K168N, F169S, G171C, G171R, C172S, G183A, G183S, Y184C, M187T, M187V, L191P, L191Q, V199M, S201Y, P205L, P205R, P205S, N215D, Y216C, Y216D, I219N, N224D, N224S, H225R, A230T, D234E, W236L, S238N, I239T, I242N, L243F, L243W, D244H, S247C, S247P, Q250P, I253T, A257P, P259L, G261D, D264Y P265L, P265R, M267I, L268S, V269A, V269M, I270T, G271S, N272K, N272S, S276N, Q279R, Q280H, Q280K, A288D, A288P, A292P, P293A, P293S, P293T, S297C, N298H, N298K, N298S, D299G, L300F, R301G, R301P, I303N, A309P, L310F, D313G, I317N, I317T, N320I, Q321E, Q321L, Q321R, G325S, Q327E, E338K, V339E, W340R, E341D, S345P, A348P, A352D, I354K, E358G, I359T, G360D, G360S, G361R, P362L, R363P, E398K, P409S, P409T, T410A, T410I, T410P, G411D, L414S, 254del1, 247ins8, D55V/Q57L, 401ins/T401S.

8. 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta para su uso según la reivindicación 7, que es clorhidrato de 1-desoxigalactonojirimicina.

9. 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta para su uso según la reivindicación 7 o reivindicación 8, donde el paciente es mujer.

10. 1-desoxigalactonojirimicina o una sal o éster farmacéuticamente aceptables de esta para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde la forma mutante sensible se selecciona de entre las mutaciones D33Y, N34K, G35R, L36F, A37V, M42L, M42R, M42T, M51I, L54P, D55V, C56F, C56Y, P60L, E66G, E66K, A73V, G85D, G85M, A97P, R118C, A121T, A135V, Y152C, A156T, W162G, F169S, G183A, Y184C, M187T, M187V, L191Q, V199M, S201Y, P205L, P205S, N215D, Y216C, Y216D, I219N, N224S, S238N, I239T, I242N, L243F, L243W, D244H, S247C, Q250P, I253T, A257P, P259L, D264Y, P265L, V269A, V269M, I270T, G271S, S276N, Q280H, Q280K, A288P, P293T, N298S, L300F, R301G, R301P, I303N, A309P, L310F, D313G, I317T, N320I, Q321L, Q321R, G325S, Q327E, E338K, V339E, S345P, I354K, E358G, I359T, G360D, G360S, P362L, E398K, P409S, P409T, T410A, T410I, G411D, 254del1, D55V/Q57L, 401ins/T401S.

Fig. 1A

Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

Sentido erróneo	L45R	M72R	R112H	G147R	G183S	R227P	D264V	A285P	Q312R	R356G	P409S	V390frX8
M1I	H46L	M72V	R112S	S148N	G183V	R227Q	D264Y	W287C	D313G	R356W	P409T	401ins1aa/T 401S
M1K	H46R	A73V	F113L	S148R	Y184C	A230T	P265L	W287G	D313Y	Q357X	T410A	del20-24aa
M1L	H46Y	M76R	F113S	Y152C	M187T	D231G	P265R	A288D	V316E	E358A	T410I	del13-8aa
M1R	W47G	M76T	I117S	D155H	M187V	D231N	D266E	A288P	I317N	E358G	T410K	del153aa
M1T	W47L	W81C	R118C	A156T	L191P	D231V	D266H	I289F	I317T	E358K	T410P	del205-7aa
M1V	E48D	W81S	L120P	A156V	L191Q	D234E	D266N	I289S	N320I	I359T	G411D	del254aa
A13P	E48K	G85D	L120S	A156Y	T194I	D234Y	D266V	M290I	N320K	G360C	L414S	del358aa
L14P	R49C	G85M	A121P	W162C	V199M	S235C	D266Y	A291T	N320Y	G360D	L415P	ins247-8aa
L16H	R49G	Y86C	A121T	W162G	S201F	S235F	M267I	A292P	Q321E	G360S	L33Y	
L16P	R49L	Y86D	V124D	W162R	S201Y	W236C	M267R	A292T	Q321L	G361R	L166G	
F18S	R49P	Y88D	H125P	G163V	C202W	W236L	L268S	P293A	Q321R	P362L	H46S	
L19P	R49S	L89P	S126G	D165H	C202Y	W236R	V269A	P293H	G325D	R363C	I124F	
A20P	F50C	L89R	G128E	D165V	P205L	S238N	V269M	P293S	G325S	R363H		
A31V	M51I	C90R	L129P	D165Y	P205R	I239T	I270T	P293T	Q327E	R363P		
L32P	M51K	I91T	L131P	D156Y	P205S	I242F	G271C	F295C	Q327K	L372P	Compleja	
D33Y	C52G	D92G	G132E	L166V	P205T	I242N	G271S	M296I	G328A	L372R	D55V/Q57L	
N34K	C52R	D92H	G132R	L167P	L206P	L243F	G271V	M296V	G328E	G373D	L120P/A121T	
N34S	C52S	D92N	Y134H	K168N	Y207C	L243W	N272K	S297C	G328R	G373R		
G35R	C52Y	D92Y	Y134S	K168R	Y207H	D244N	N272S	S297F	G328V	G373S	Pequeña Ins/Del	
L36F	L54P	D93G	A135V	F169S	Y207S	D244H	F273L	N298H	E338K	A377D	19del5aa	
L36S	D55V	D93N	D136H	D170H	N215D	S247C	L275F	N298K	V339E	C378R	86del6aa	
A37V	C56F	D93V	D136Y	D170V	N215S	S247P	S276G	N298S	W340R	C378Y	113del8aa	
P40L	C56G	C94S	G138E	G171C	Y216C	Q250P	S276N	D299G	E341D	C382W	120del2aa/L120H	
P40S	C56Y	C94Y	G138R	G171D	Y216D	I253T	Q279E	L300F	E341K	C382Y	152ins1aa/Y152D	
T41I	Q57L	W95L	N139T	G171R	I219N	A257P	Q279H	L300H	R342L	I384N	153del1aa	
M42L	E59K	W95S	T141I	C172F	C223G	G258R	Q279K	L300P	R342Q	T385P	205del3aa	
M42R	P60L	A97P	C142R	C172G	C223R	G258V	Q279R	R301G	L344P	Q386P	205del7aa	
M42T	C63Y	A97V	C142W	C172R	C223Y	P259L	Q280H	R301P	S345P	P389R	254del1aa	
M42V	S65T	R100K	C142Y	C172S	N224D	P259R	Q280K	R301Q	A348P	F396Y	281del1aa/V281A	
G43D	E66G	R100T	A143P	C172W	N224S	G260A	T282A	I303N	W349R	E398K	358del1aa	
G43R	E66K	E103Q	A143T	C172Y	H225D	G261D	T282N	K308N	A350P	L403S	382del1aa	
G43S	E66Q	L106R	G144V	C174G	H225R	W262C	Q283P	A309P	A352D	I407K	403del1aa	
G43V	L68F	Q107L	P146S	G183A	W226C	N263S	M284T	L310F	I354K	I407R	247ins3aa	
W44C	M72I	R112C	G147E	G183D	W226R	D264A	A285D	Q312H	N355K	P409A	247ins8aa	

Fig. 1B

Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

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

Fig. 1B (Cont.)

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

Fig. 1C

Mutaciones de Fabry generadas por mutagénesis dirigida

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

Fig. 1C (Cont.)

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

Mutación	Aumento relativo	CE_{50} (μM)	Mutación	Aumento relativo	CE_{50} (μM)	Mutación	Aumento relativo	CE_{50} (μM)
M1R	2.6±0.4	3±1	G163V	3.5±0.4	27±9	A288D	6±1	200±40
L14P	2.5±0.4	3±1	L166V	4.8±0.5	13±4	A288P	20±1	25±1
L16H	5±1	0.3±0.1	K168N	22±3	70±30	I289F	19±4	300±50
L16P	5±1	0.8±0.3	F169S	2.7±0.4	1±0	A292P	3±1	160±40
L19P	2.3±0.3	1.3±0.5	G171C	9±2	190±80	P293A	21±3	475±100
A20P	1.5±0.1	0.3±0.1	G171R	4±1	4±1	P293S	19±2	560±210
L32P	7±1	2.2±0.3	C172S	7±2	680±200	P293T	12±2	36±8
D33Y	3±1	5±1	G183A	2.3±0.3	7±3	F295C	15±2	20±3
N34K	19±2	100±30	G183D	15±3	40±10	M296I	2.6±0.1	0.7±0.2
G35R	5±2	7±2	G183S	7±1	7±2	M296V	1.9±0.1	0.7±0.3
L36F	10±1	13±4	Y184C	15±1	74±1	S297C	3±1	620±20
A37V	1.6±0.1	23±9	M187T	8±2	23±8	N298H	9.4±0.4	700±100
P40L	3.8±0.2	39±16	M187V	5±1	16±1	N298K	5±2	38±18
P40S	3±1	3±1	L191P	2.0±0.3	7±2	N298S	2.8±0.1	1.4±0.2
T41I	1.3±0.1	0.3±0.1	L191Q	16±3	150±60	D299G	15±2	1500±140
M42L	1.5±0.1	7±2	T194I	12±2	19±1	L300F	6±1	3±1
M42R	5±1	12±5	V199M	1.2±0.1	4±2	L300P	12±1	6±2
M42T	18±1	42±16	S201F	8±2	2±1	R301G	1.8±0.2	2.5±0.4
M42V	14±2	120±20	S201Y	6.0±0.3	15±3	R301P	42±4	120±14
L45R	17±4	40±5	P205L	9±1	260±50	*R301Q*	6.2±0.3	3.8±0.2
W47L	5±1	11±3	P205R	4±1	70±30	I303N	14±1	70±20
E48D	7±2	100±37	P205S	5±2	4±1	K308N	7±1	24±8
E48K	6±1	4±2	P205T	8±2	2±0	A309P	26±5	33±10
R49G	3±1	4±1	Y207C	7±2	500±200	L310F	17±0	70±10
R49L	11±2	80±20	Y207S	3.2±0.4	67±5	Q312H	12±2	15±2
R49P	3±1	3±1	N215D	1.2±0.1	9±4	Q312R	2±0	10±1
R49S	4±1	5±2	N215S	3±0	4±1	D313G	1.4±0.1	8±2
M51I	1.5±0.1	3±1	Y216C	13±1	36±8	V316E	5±1	600±100
M51K	2.9±0.3	2±0	Y216D	16±1	350±150	I317N	9±1	80±10
C52R	4±1	53±23	I219N	13±1	167±67	I317T	5±1	10±2
L54P	16±2	8±2	N224D	13±3	190±40	N320I	23±3	40±10
D55V	15±2	3±1	N224S	2.6±0.1	6±2	N320Y	18±2	300±80
C56F	16±1	28±6	H225R	27±2	900±100	Q321E	21±3	90±30
C56G	7±1	400±100	A230T	4±1	27±12	Q321L	12±1	18±3
C56Y	14±3	50±18	D234E	14±3	340±50	Q321R	3±1	7±1
E59K	3±1	35±14	S235C	4.8±0.1	120±40	G325D	14±4	360±120
P60L	5±2	1.7±0.7	W236L	9±2	900±150	G325S	3±1	1.7±0.1
S65T	3±1	2.2±0.6	S238N	2.8±0.4	1.5±0.3	Q327E	2.4±0.2	11±2
E66G	2±1	4±1	I239T	1.7±0.1	3±1	G328A	19±5	14±2
E66K	4±2	11±4	I242N	12±1	9±1	E338K	4±0	16±4
E66Q	2±1	5±2	L243F	8±1	10±2	V339E	2±0	7±2
L68F	11±2	100±30	L243W	37±2	21±4	W340R	10±2	100±40
M72R	7±1	700±250	D244N	4±2	4±1	E341D	3±0	17±4
M72V	2.2±0.2	0.6±0.1	D244E	3±1	1.2±0.4	R342Q	4±2	16±7
A73V	1.4±0.1	0.9±0.3	S247C	2.0±0.3	8±1	S345P	8±1	76±5
M76R	3±1	6±2	S247P	16±3	350±120	A348P	2±0	5±2
M76T	9±1	11±3	Q250P	2.1±0.1	6±2	A352D	5±1	160±30
W81C	19±1	70±20	I253T	1.7±0.1	1.4±0.3	I354K	19±4	17±3
W81S	4±1	25±12	A257P	3.3±0.4	5±1	R356W	3±1	1.0±0.1
G85D	7±1	12±2	G258V	16±4	15±4	E358A	21±2	9±2
G85M	2.3±0.2	2.6±0.6	P259L	8±3	9±1	E358G	7±1	20±10
Y88D	3.4±0.4	52±17	P259R	3.3±0.4	2±1	E358K	3±1	400±100
I91T	12±1	6±2	G260A	9±3	12±1	I359T	1.5±0.1	4±2
C94Y	2.1±0.4	0.8±0.4	G261D	16±3	150±50	G360D	12±0	15±3
W95S	4±1	300±50	N263S	5±1	2.5±0.4	G360S	1.8±0.2	9±3
A97P	8±1	43±14	D264Y	13±3	18±4	G361R	10±1	7±2
A97V	3±1	0.8±0.2	P265L	2.7±0.2	1.1±0.1	P362L	7±2	3±1
R112C	15±2	300±60	P265R	13±1	97±27	R363C	2.3±0.3	2±1
R112H	5±1	2.5±0.5	M267I	1.6±0.1	8±2	R363H	1.7±0.1	1.0±0.4
R112S	8±2	90±38	L268S	1.5±0.1	0.7±0.3	R363P	21±5	120±40
F113L	2.3±0.2	2±1	V269A	13±2	22±9	G373D	3.2±0.4	5±2
I117S	3±1	2±1	V269M	4±1	2.0±0.6	G373S	2.6±0.4	2±1
R118C	1.4±0.1	6±2	I270T	11±2	10±0	E398K	1.3±0.1	7±2
L120P	6±2	20±9	G271S	22±8	24±2	L403S	1.6±0.1	16±5
A121T	3±1	0.3±0.1	N272K	3±1	17±7	P409A	10±2	5±1
A135V	14±2	350±120	N272S	5±1	228±88	P409S	15±2	3±1
D136H	5±1	23±5	S276G	22±1	9±1	P409T	5±1	1.3±0.5
A143T	1.3±0.1	4±1	S276N	9±2	22±7	T410A	19±3	2±1
G144V	21±6	38±14	Q279E	5±1	23±5	T410I	14±4	3.8±0.2
G147R	2.4±0.4	4±2	Q279H	5±1	61±26	T410P	20±5	1200±580
S148N	18±3	1400±400	Q279R	4±0	12±5	G411D	15±0	6±2
Y152C	4±1	26±11	Q280H	5±1	6±1	L414S	6±1	18±3
A156T	13±1	50±10	Q280K	1.7±0.1	1.1±0.3	254del1	1.6±0.1	3±1
A156V	19±2	44±9	T282A	15±5	24±3	247ins8	21±1	400±180
A156Y	5±1	50±10	M284T	20±5	28±8	D55V/Q57L	24±5	8±4
W162G	9±1	13±4	W287C	20±4	1000±100	401insT401S	4±1	11±3

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

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

FIG. 2B: <u>Mutaciones sensibles a DGJ descritas en la Figura 1B: Potencia y magnitud de respuesta</u>

Mutación	N.º de veces de aumento	CE_{50}(uM)	Mutación	N.º de veces de aumento	CE_{50}(uM)
L14P	2.50±0.44	2.59±0.75	M267I	1.59±0.08	5.66±2.38
A20P	1.47±0.10	0.34±0.16	V269M	3.81±0.90	2.60±0.62
L32P	6.85±1.04	2.24±0.34	I270T	10.99±1.62	10.02±0.31
N34K	18.53±2.32	100.89±30.83	G271S	22.10±8.22	24.17±1.96
G35R	5.40±1.59	6.98±1.51	S276N	9.04±2.33	21.54±7.07
P40L	3.75±0.24	39.03±15.93	S276G	22.16±0.61	8.99±0.97
P40S	3.10±0.61	2.57±0.75	Q279E	4.52±0.63	22.46±4.98
T41I	1.29±0.09	0.32±0.10	Q279H	4.69±0.70	61.31±26.33
L45R	17.04±3.88	38.70±5.30	Q279R	3.47±0.34	11.93±5.58
W47L	4.73±1.22	10.83±3.20	Q280H	4.69±1.05	5.45±0.85
E48K	6.00±1.12	4.44±2.08	Q280K	1.70±0.10	1.09±0.26
R49G	3.44±0.54	3.64±1.36	M284T	19.92±4.56	28.31±7.83
R49L	10.93±1.71	75.71±18.70	W287C	20.11±3.61	968.45±74.22
R49S	3.56±0.81	5.26±2.62	A288D	5.67±0.61	198.63±36.31
M51K	287±0.26	1.82±0.56	A288P	19.52±0.70	25.33±1.44
C52R	3.62±0.57	53.08±22.95	I289F	18.53±4.44	308.39±48.52
E59K	3.41±0.49	34.77±13.52	A292P	3.07±0.51	158.87±41.66
E66Q	2.29±0.68	5.33±2.26	P293A	20.56±2.58	474.88±96.29
M72V	2.19±0.15	0.59±0.14	P293S	18.73±2.32	562.60±218.18
A73V	1.39±0.14	0.94±0.34	F295C	14.85±2.54	18.44±4.69
M76R	2.98±0.71	6.18±2.02	M296I	2.56±0.07	0.69±0.17
I91T	12.15±1.20	5.93±2.36	M296V	1.94±0.05	0.70±0.32
C94Y	2.12±0.36	0.79±0.35	S297C	2.99±0.74	616.10±230.41
W95S	4.02±0.79	312.17±52.17	N298S	2.79±0.02	1.42±0.21
A97V	2.70±0.50	0.78±0.26	N298K	5.20±2.22	38.12±18.48
R112H	4.85±0.48	2.54±0.47	L300F	5.53±1.31	3.35±0.80
R112C	15.34±1.94	296.59±59.28	L300P	12.38±1.39	6.04±1.56
F113L	2.33±0.19	2.39±0.90	R301Q	6.54±0.33	3.85±0.35
A121T	2.62±0.48	0.33±0.05	R301P	41.85±4.24	118.30±13.89
A143T	1.34±0.06	4.26±1.30	I303N	13.46±1.24	68.23±22.49
G144V	38.32±13.72	2.5±0.76	L310F	17.39±0.15	71.46±10.68
A156V	19.06±2.33	44.42±8.94	Q312H	12.39±2.11	15.38±2.49
L166V	4.77±0.51	12.94±4.03	V316E	4.99±0.74	627.13±142.62
G183D	14.71±3.41	41.60±12.82	I317T	5.06±1.37	10.14±2.48
T194I	12.39±2.05	18.93±0.89	N320I	23.24±2.77	38.92±11.74
S201F	8.43±2.18	2.08±0.63	N320Y	18.34±1.47	295.33±76.01
S201Y	5.97±0.34	15.31±3.24	Q321E	20.65±2.84	89.80±34.91
P205R	4.09±0.66	69.75±30.16	Q321R	3.35±1.12	7.01±0.80
P205T	7.69±2.03	2.42±0.42	G325D	12.23±1.99	323.52±102.44
Y207S	3.24±0.44	66.62±5.11	Q327E	2.43±0.23	11.30±2.06
N215S	2.55±0.34	4.25±0.87	G328A	18.54±5.39	13.56±1.82
I219N	13.22±0.64	167.06±66.53	E338K	4.37±0.15	16.27±4.34
N224S	2.57±0.14	6.34±1.84	W340R	10.13±1.50	103.46±37.51
H225R	27.40±1.84	859.83±134.62	E341D	2.86±0.11	16.83±3.83
D234E	13.64±3.01	341.35±47.17	R342Q	4.03±1.45	15.70±6.79
I242N	12.02±0.70	9.29±1.05	S345P	8.15±0.61	76.21±4.89
L243F	8.36±0.67	9.86±1.51	A348P	1.60±0.03	4.75±2.29
D244N	4.05±1.47	3.50±1.26	I354K	18.89±3.89	17.20±2.91
D244H	3.17±0.97	1.24±0.42	R356W	2.78±0.57	0.95±0.09
P259R	3.31±0.42	2.10±0.49	E358K	2.81±0.57	400.63±117.46
P259L	8.40±2.98	9.04±0.51	R363H	1.71±0.13	0.98±0.39
G260A	8.47±2.58	12.29±1.04	R363C	2.33±0.28	2.08±0.92
N263S	4.77±1.19	2.49±0.35	G373D	3.22±0.42	5.43±2.58
D264Y	13.15±3.23	18.24±3.73	G373S	2.64±0.42	2.24±0.69
P265R	12.61±1.21	96.58±26.62	E398K	1.28±0.03	6.94±2.43
P265L	2.74±0.20	1.10±0.07	P409S	14.45±1.75	2.67±0.61

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

FIG. 3

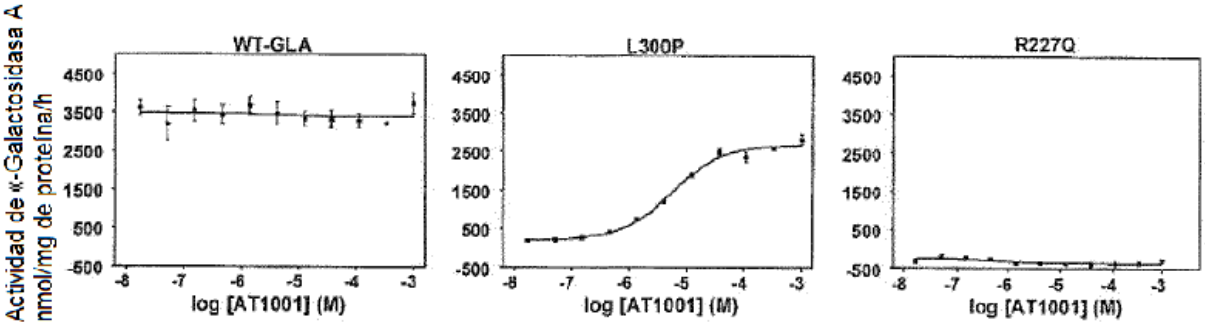

Actividad de α-Galactosidasa A
nmol/mg de proteína/h
WT-GLA
L300P
R227Q
4500
3500
2500
1500
500
-500
-8
-7
-6
-5
-4
-3
log [AT1001] (M)

FIG. 4

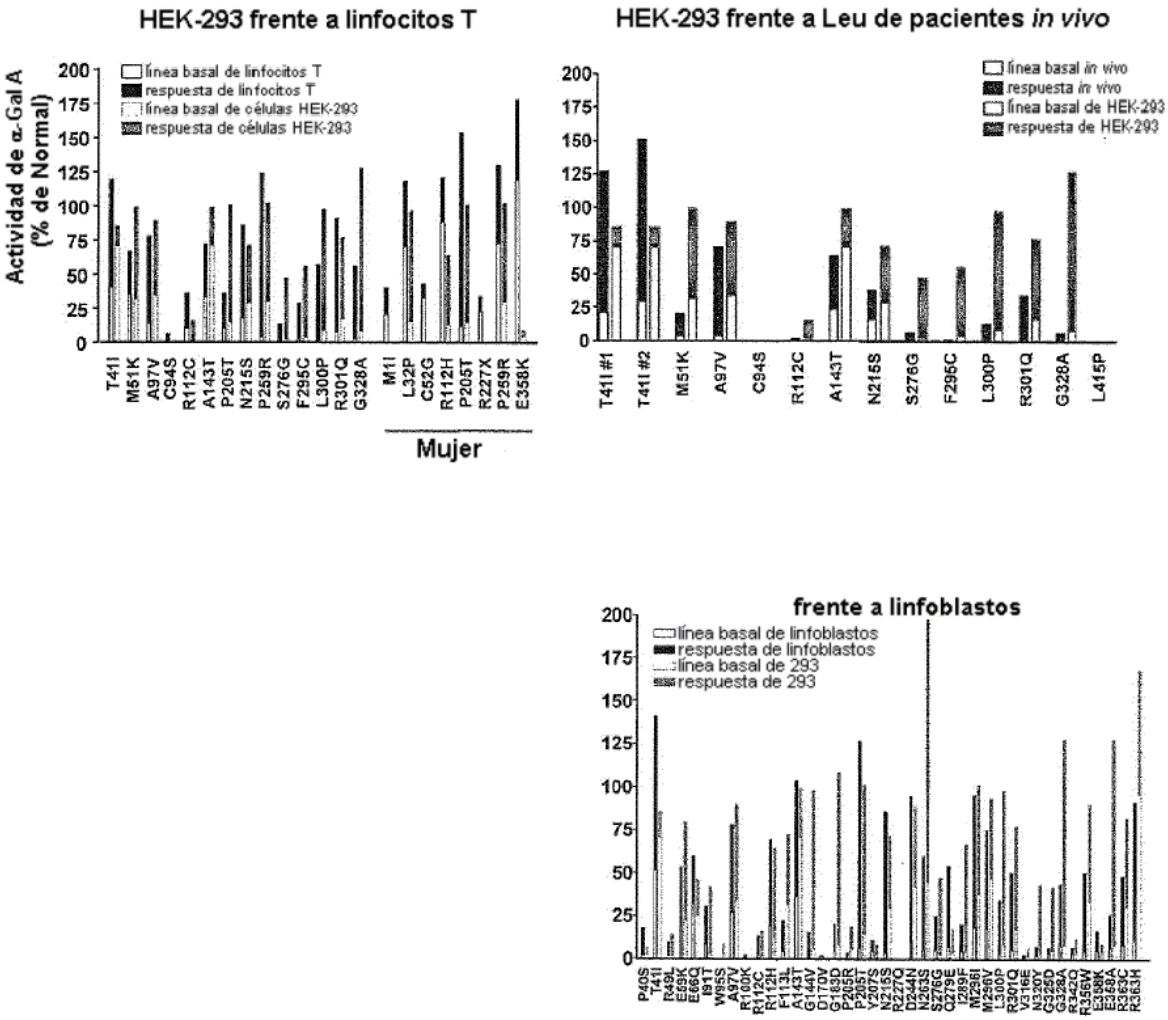

HEK-293 frente a linfocitos T
Actividad de α-Gal A (% de Normal)
línea basal de linfocitos T
respuesta de linfocitos T
línea basal de células HEK-293
respuesta de células HEK-293
T41I
M51K
A97V
C94S
R112C
A143T
P205T
N215S
P259R
S276G
F295C
L300P
R301Q
G328A
M1I
L32P
C52G
R112H
P205T
R227X
P259R
E358K
Mujer
HEK-293 frente a Leu de pacientes in vivo
línea basal in vivo
respuesta in vivo
línea basal de HEK-293
respuesta de HEK-293
T41I #1
T41I #2
M51K
A97V
C94S
R112C
A143T
N215S
S276G
F295C
L300P
R301Q
G328A
L415P
frente a linfoblastos
línea basal de linfoblastos
respuesta de linfoblastos
línea basal de 293
respuesta de 293

FIG. 5

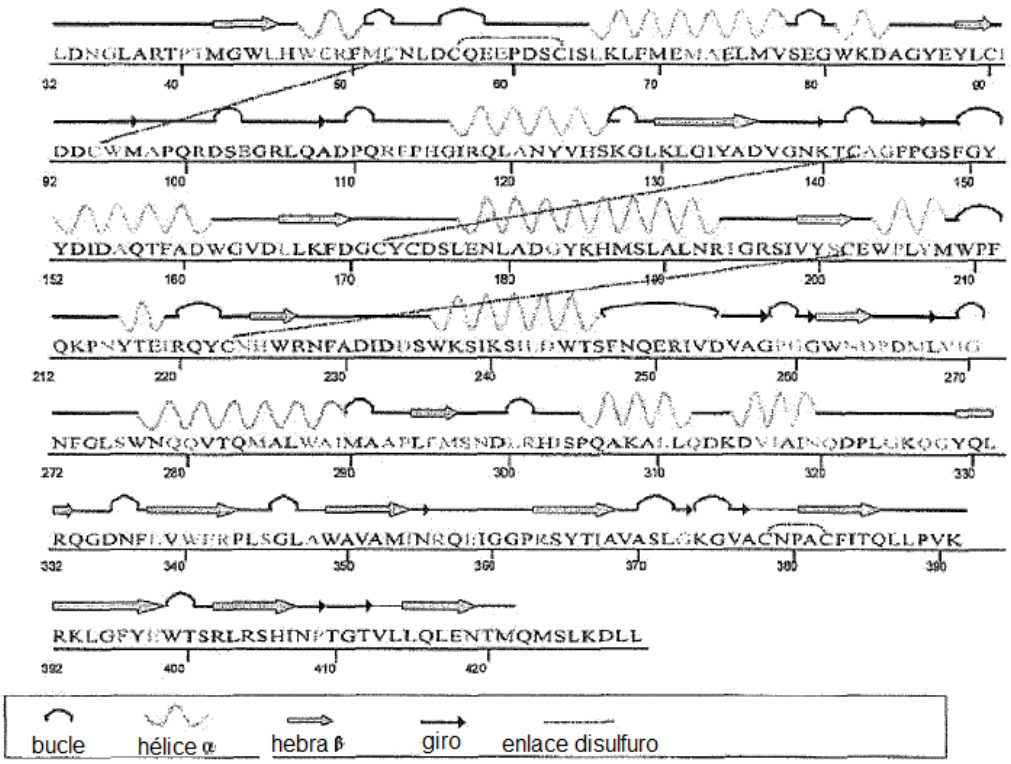


Fig. 6

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

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

GLA-V124D-3'	GTC CTT TGC TGT GAT CAT AAT TAG CTA GC	GLA-L300F-5'	GTCTAATGACTTCCGACACATC
GLA-G128E-5'	CACAGCAAAGaACTGAAGCTAG	GLA-L300F-3'	GATGTGTCGGAAGTCATTAGAC
GLA-G128E-3'	CTA GCT TCA GTT CTT TGC TGT G	GLA-L300H-5'	GTCTAATGACCACCGACACATC
GLA-L129P-5'	CAG CAA AGG ACC GAA GCT AGG	GLA-L300H-3'	GATGTGTCGGTGGTCATTAGAC
GLA-L129P-3'	ATC CCT AGC TTC GGT CCT TTG CTG	GLA-R301G-5'	CTAATGACCTCGGACACATCAGC
GLA-L131P-5'	AGGACTGAAGC C AGGGATTTATGC	GLA-R301G-3'	GCTGATGTGTCCGAGGTCATTAG
GLA-L131P-3'	GCA TAA ATC CCT GGC TTC AGT CCT	GLA-R301P-5'	CTAATGACCTCCCACACATCAGC
GLA-G132E-5'	GGACTGAAGCTA GaG ATTTATGCAGATG	GLA-R301P-3'	GCTGATGTGTGGGAGGTCATTAG
GLA-G132E-3'	CAT CTG CAT AAA TCT CTA GCT TCA GTC C	GLA-I303N-5'	CTCCGACACAACAGCCCTCAAGC
GLA-G132R-5'	GAC TGA AGC TAA GGA TTT ATG CAG ATG	GLA-I303N-3'	GCTTGAGGGCTGTTGTGTCGGAG
GLA-G132R-3'	CAT CTG CAT AAA TCC TTA GCT TCA GTC	GLA-L310F-5'	GCCAAAGCTTTCCTTCAGGA
GLA-Y134S-5'	GCT AGG GAT TTC TGC AGA TGT TGG	GLA-L310F-3'	TCCTGAAGGAAAGCTTTGGC
GLA-Y134S-3'	CCA ACA TCT GCA GAA ATC CCT AGC	GLA-Q312H-5'	GCTCTCCTTCACGATAAGGACG
GLA-A135V-5'	GCT AGG GAT TTA TGT AGA TGT TGG A	GLA-Q312H-3'	CGTCCTTATCGTGAAGGAGAGC
GLA-A135V-3'	TCC AAC ATC TAC ATA AAT CCC TAG C	GLA-D313Y-5'	CTCTCCTTCAGTATAAGGACG
GLA-D136H-5'	GGA TTT ATG CAC ATG TTG GAA	GLA-D313Y-3'	CGTCCTTATACTGAAGGAGAG
GLA-D136H-3'	TTC CAA CAT GTG CAT AAA TCC	GLA-V316E-5'	GATAAGGACGAAATTGCCATC
GLA-D136H-5	GGGATTTATGCA cAT GTTGGAAATAA AACC	GLA-V316E-3'	GATGGCAATTTCGTCCTTATC
GLA-D136H-3	GGT TTT ATT TCC AAC ATG TGC ATA AAT CCC	GLA-I317N/T-5'	AAGGACGTAAMTGCCATCAATC
GLA-G138E-5'	TGC AGA TGT TGA AAA TAA AAC CTG	GLA-I317N/T-3'	GATTGATGGCAKTTACGTCCTT
GLA-G138E-3'	CAG GTT TTA TTT TCA ACA TCT GCA	GLA-N320I-5'	AATTGCCATCATTCAGGACCCC
GLA-G138R-5'	TGC AGA TGT TAG AAA TAA AAC CTG	GLA-N320I-3'	GGGGTCCTGAATGATGGCAATT
GLA-G138R-3'	CAG GTT TTA TTT CTA ACA TCT GCA	GLA-N320K-5'	AATTGCCATCAAGCAGGACCCC
GLA-G138E-5	GGATTTATGCAGATGTT GaA AATAAAACCTGCGCAGC	GLA-N320K-3'	GGGGTCCTGCTTGATGGCAATT
GLA-G138E-3	GCT GCG CAG GTT TTA TTT TCA ACA TCT GCA TAA ATC C	GLA-N320Y-5'	AATTGCCATCTATCAGGACCCC

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

GLA-D155H-5'	CTACGACATT C ATGCCCAGAC	GLA-R342Q-3'	CTGAGAGAGGTTGTTCCCACAC
GLA-D155H-3'	GTC TGG GCA TGA ATG TCG TAG	GLA-L344P-5'	GAACGACCTCCCTCAGGCTTAG
GLA-A156T-5'	GACATTGAT ACC CAGACCTTtg	GLA-L344P-3'	CTAAGCCTGAGGGAGGTCGTTC
GLA-A156T-3'	CAA AGG TCT GGG TAT CAA TGT C	GLA-S345P-5'	CGACCTCTCCCAGGCTTAGCC
GLA-W162R-5'	CTTTGCTGACCGGGGAGTAGATC	GLA-S345P-3'	GGCTAAGCCTGGGAGAGGTCG
GLA-W162R-3'	GATCTACTCCCCGGTCAGCAAAG	GLA-A348P-5'	CTCAGGCTTACCCTGGGCTGTAG
GLA-W162C-5'	CTTTGCTGACTGCGGAGTAGATC	GLA-A348P-3'	CTACAGCCCAGGGTAAGCCTGAG
GLA-W162C-3'	GATCTACTCCGCAGTCAGCAAAG	GLA-A350P-5'	CTTAGCCTGGCCTGTAGCTATG
GLA-G163V-5'	GCTGACTGGGTAGTAGATCTG	GLA-A350P-3'	CATAGCTACAGGCCAGGCTAAG
GLA-G163V-3'	CAGATCTACTACCCAGTCAGC	GLA-A352D-5'	CTGGGCTGTAGATATGATAAAC
GLA-D165V-5'	CTGGGGAGTAGTTCTGCTAAAATTTG	GLA-A352D-3'	GTTTATCATATCTACAGCCCAG
GLA-D165V-3'	CAAATTTTAGCAGAACTACTCCCCAG	GLA-I354K-5'	GTAGCTATGAAAAACCGGCAGG
GLA-L167P-5'	GAGTAGATCTGC C AAAATTTGATGG	GLA-I354K-3'	CCTGCCGGTTTTTCATAGCTAC
GLA-L167P-3'	CCA TCA AAT TTT GGC AGA TCT ACT C	GLA-N355K-5'	GCTATGATAAAACGGCAGGAG
GLA-K168R-5'	GTAGATCTGCTA AGA TTTGATGGTTTG	GLA-N355K-3'	CTCCTGCCGTTTTATCATAGC
GLA-K168R-3'	CAA ACC ATC AAA TCT TAG CAG ATC TAC	GLA-R356W-5'	GCTATGATAAACTGGCAGGAGATT
GLA-F169S-5	gtaGATCTGCTAAAA TCT GATGGTTGTTACtg	GLA-R356W-3'	AATCTCCTGCCAGTTTATCATAGC
GLA-F169S-3	CAG TAA CAA CCA TCA GAT TTT AGC AGA TCT AC	GLA-E358G/A-5'	ACCGGCAGGSGATTGGTGGAC
GLA-D170V-5'	GCTAAAATTTG T TGGTTGTTACTG	GLA-E358G/A-3'	GTCCACCAATCSCCTGCCGGT
GLA-D170V-3'	CAG TAA CAA CCA ACA AAT TTT AGC	GLA-E358K-5'	GATAAACCGGCAGAAGATTGGTGG
GLA-D170H-5'	GCTAAAATTTC AT GGTTGTTACTG	GLA-E358K-3'	CCACCAATCTTCTGCCGGTTTATC
GLA-D170H-3'	CAG TAA CAA CCA TGA AAT TTT AGC	GLA-E358A-5	GATAAACCGGCAG GcG ATTGGTGGACCTC
GLA-G171D-5'	CTAAAATTTGAT GAT TGTTACTGTGAC	GLA-E358A-3	GAG GTC CAC CAA TCG CCT GCC GGT TTA TC
GLA-G171D-3'	GTC ACA GTA ACA ATC ATC AAA TTT TAG	GLA-I359T-5'	CCGGCAGGAGACTGGTGGACCTC
GLA-G171R-5'	CTAAAATTTGAT CGT TGTTACTGTGAC	GLA-I359T-3'	GAGGTCCACCAGTCTCCTGCCGG

Fig. 6 (Cont.)

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

Fig. 6 (Cont.)

GLA-S201F-5'	CATTGTGTACTTCTGTGAGTGG	GLA-Q386P-3'	ACA GGG AGG AGC GGT GTG ATG AAG
GLA-S201F-3'	CCACTCACAGAAGTACACAATG	GLA-P389R-5'	CACAGCTCCTC CGT GTGAAAAGGAAGCT
GLA-S201Y-5'	CATTGTGTACTACTGTGAGTGGC	GLA-P389R-3'	AGC TTC CTT TTC ACA CGG AGG AGC TGT G
GLA-S201Y-3'	GCC ACT CAC AGT AGT ACA CAA TG	GLA-F396Y-5'	GGAAGCTAGGGTACTATGAATGG
GLA-C202Y-5'	GTG TAC TCC TAT GAG TGG CCT C	GLA-F396Y-3'	CCATTCATAGTACCCTAGCTTCC
GLA-C202Y-3'	GAG GCC ACT CAT AGG AGT ACA C	GLA-E398K-5'	AGGGTTCTATAAATGGACTTCA
GLA-C202W-5'	GTGTACTCCTGG GAGTGGCCTCT	GLA-E398K-3'	TGAAGTCCATTTATAGAACCCT
GLA-C202W-3'	AGA GGC CAC TCC CAG GAG TAC AC	GLA-L403S-5'	GACTTCAAGGTCAAGAAGTCAC
GLA-P205T-5'	CTGTGAGTGGACTCTTTATATG	GLA-L403S-3'	GTGACTTCTTGACCTTGAAGTC
GLA-P205T-3'	CATATAAAGAGTCCACTCACAG	GLA-I407K-5'	GAAGTCACAAAAATCCCACAG
GLA-P205R/L-5'	CTGTGAGTGG CKT CTTTATATG	GLA-I407K-3'	CTGTGGGATTTTTGTGACTTC
GLA-P205R/L-3'	CAT ATA AAG AMG CCA CTC ACAG	GLA-P409T/A/S-5'	GTCACATAAATDCCACAGGCACTG
GLA-Y207S-5'	TGGCCTCTT TCT ATGTGGCCC	GLA-P409T/A/S-3'	CAGTGCCTGTGGHATTTATGTGAC
GLA-Y207S-3'	GGG CCA CAT AGA AAG AGG CCA	GLA-T410K-5'	CACATAAATCCCAAAGGCACTG
GLA-Y207C-5'	AGTGGCCTCTT TgT ATGTGGCCCTT	GLA-T410K-3'	CAGTGCCTTTGGGATTTATGTG
GLA-Y207C-3'	AAG GGC CAC ATA CAA AGA GGC CAC T	GLA-T410A-5'	CACATAAATCCCGCAGGCACTG
GLA-Y216D-5	CCTTTCAAAAGCCCAAT gAT ACAGAAATCCGACAG	GLA-T410A-3'	CAGTGCCTGCGGGATTTATGTG
GLA-Y216D-3	CTG TCG GAT TTC TGT ATC ATT GGG CTT TTG AAA GG	GLA-G411D-5'	ATCCCACAGACACTGTTTTGC
GLA-I219N-5'	CAATTATACAGAA AAC CGACAGTACTGC	GLA-G411D-3'	GCAAAACAGTGTCTGTGGGAT
GLA-I219N-3'	GCA GTA CTG TCG GTT TTC TGT ATA ATT G	GLA-L414S-5'	GGCACTGTTTCGCTTCAGCTAG
GLA-C223R/G-5'	CGACAGTAC SGC AATCACTGG	GLA-L414S-3'	CTAGCTGAAGCGAAACAGTGCC
GLA-C223R/G-3'	CCA GTG ATT GCS GTA CTG TCG	GLA-del20-24aa-5'	GCGCTTCGCTTCCTGGACATCCCTGGG GC
GLA-C223Y-5'	CGACAGTACTAC AATCACTGG	GLA-del20-24aa-3'	GCCCCAGGGATGTCCAGGAAGCGAAG CGC

Fig. 6 (Cont.)

GLA-C223Y-3'	CCA GTG ATT GTA GTA CTG TCG	GLA-del113-8aa-5'	GCAGACCCTCAGCGCCAGCTAGCTAATTATG
GLA-N224S-5'	CAGTACTGCAGTCACTGGCGA	GLA-del113-8aa-3'	CATAATTAGCTAGCTGGCGCTGAGGGTCTGC
GLA-N224S-3'	TCG CCA GTG ACT GCA GTA CTG	GLA-del153aa-5'	GTTTTGGATACTACATTGATGCCCAG
GLA-N224D-5'	CAGTACTGCGATCACTGGC	GLA-del153aa-3'	CTGGGCATCAATGTAGTATCCAAAAC
GLA-N224D-3'	GCC AGT GAT CGC AGT ACT G	GLA-del205-7aa-5'	CTCCTGTGAGTGGATGTGGCCCTT
GLA-H225R-5'	tactgcaat cgc tggcgaaat	GLA-del205-7aa-3'	AAGGGCCACATCCACTCACAGGAG
GLA-H225R-3'	ATT TCG CCA GCG ATT GCA GTA	GLA-del254aa-5'	CAGGAGAGAATTGATGTTGCTGG
GLA-W226R-5'	gcaatcac cgg cgaaat	GLA-del254aa-3'	CCAGCAACATCAATTCTCTCCTG
GLA-W226R-3'	ATT TCG CCG GTG ATT GC	GLA-del358aa-5'	GATAAACCGGCAGATTGGTGGACCT
GLA-W226C-5'	gcaatcactgtcgaaattttgc	GLA-del358aa-3'	AGGTCCACCAATCTGCCGGTTTATC
GLA-W226C-3'	GCA AAA TTT CGA CAG TGA TTG C	GLA-Ins247-8aa-5'	GACTGGACATCTTGGACATCTTTTAACCAGGAGAG
GLA-R227Q-5'	GCAATCACTGGCAAAATTTTGCTGAC	GLA-Ins247-8aa-3'	CTCTCCTGGTTAAAAGATGTCCAAGATGTCCAGTC

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

Fig. 7

GAATTCTCCGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACATCTGGGCTGCGCGC
TTGCGCTTCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATCCCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATG
GATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGAC
TGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCA
TGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATG
GCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGAT
TCGCCAGCTAGCTAATTATGTTCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTG
GAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACC
TTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAA
TTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGA
CAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATAAAGAG
TATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTT
GGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACT
CAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATC
AGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTT
GGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGAGACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTC
TCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTA
TACCATCGCAGTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACAC
AGCTCCTCCCTGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCAC
ATAAATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGA
CTTACTTTAA

Fig. 8

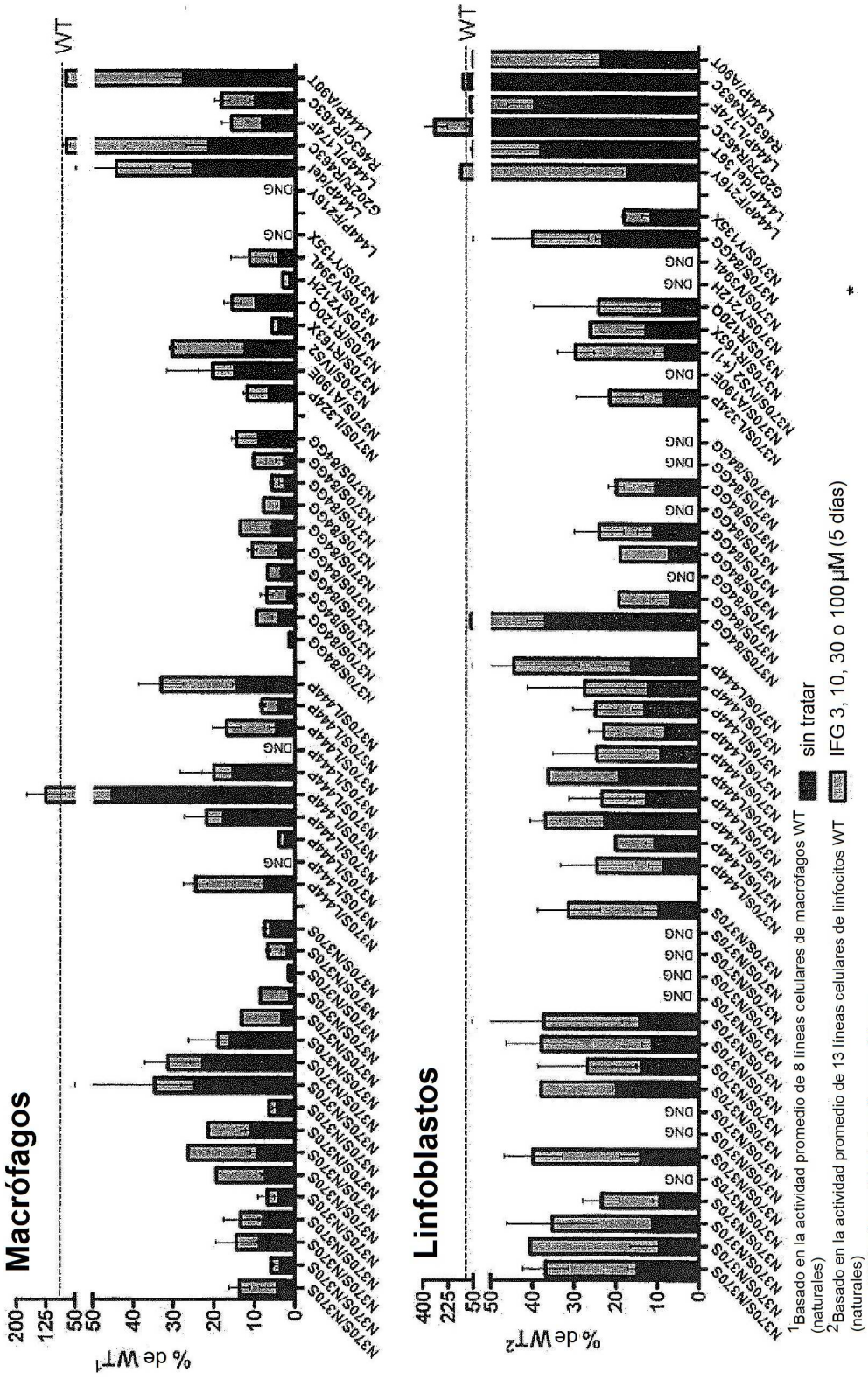

Macrófagos
% de WT¹
WT
Linfoblastos
% de WT²
sin tratar
IFG 3, 10, 30 o 100 µM (5 días)
¹Basado en la actividad promedio de 8 líneas celulares de macrófagos WT (naturales)
²Basado en la actividad promedio de 13 líneas celulares de linfocitos WT (naturales)
DNG = Imposible derivar líneas celulares
*

Fig. 9

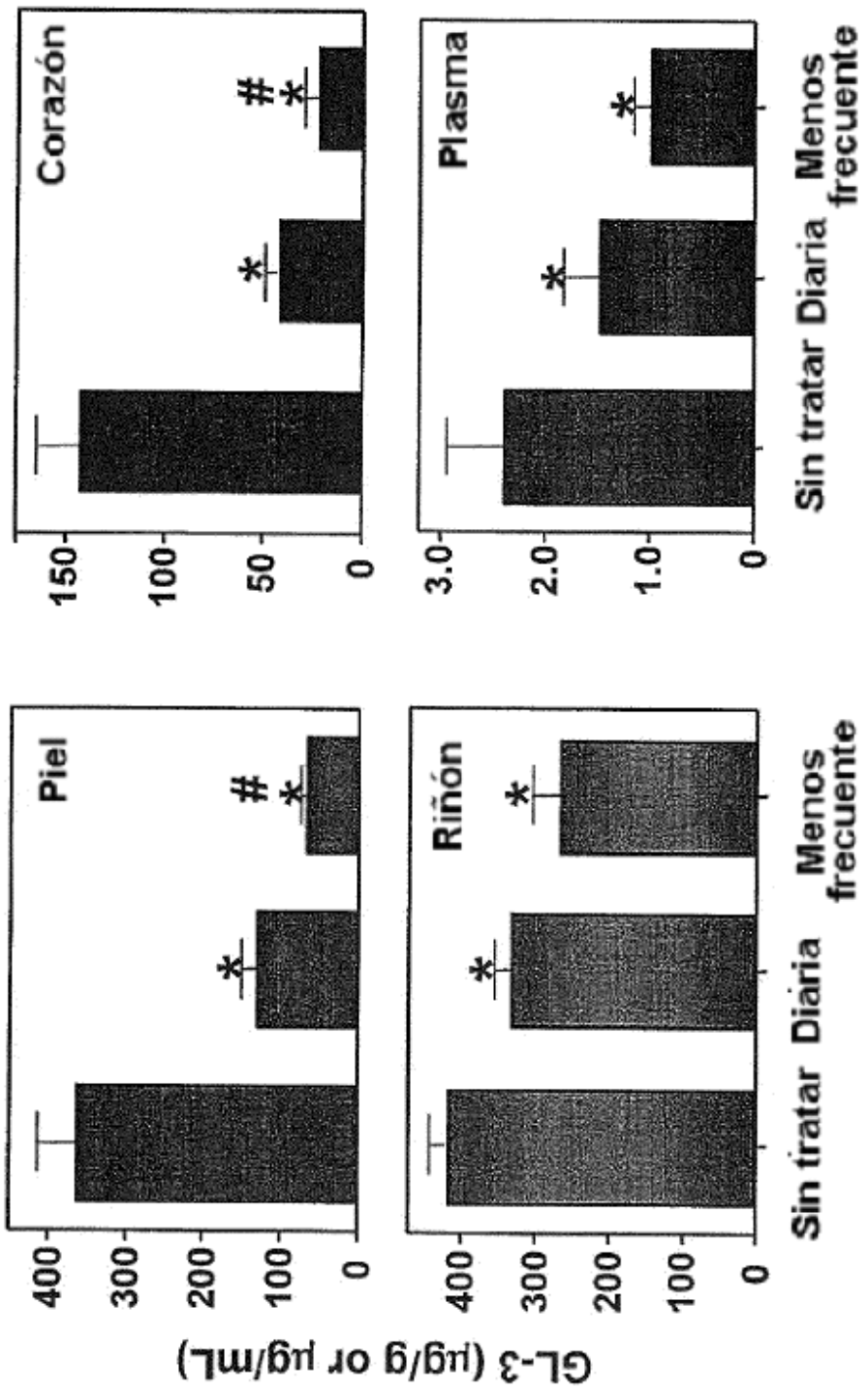

GL-3 (µg/g or µg/mL)
Piel
Riñón
Corazón
Plasma
Sin tratar
Diaria
Menos frecuente
0
100
200
300
400
50
150
1.0
2.0
3.0
*
#

Fig. 10

GAA en sentido erróneo sensible

		% de actividad de GAA natural	
mutación de GAA	n	Sin D.N.J	Con DNJ 100 µM
E262K	3	0.5 ± 0.3	1.8 ± 0.6
P266S	3	14.2 ± 0.3	22.4 ± 1.0
P285R	3	2.2 ± 0.4	4.8 ± 0.8
P285S	3	7.0 ± 0.9	11.8 ± 0.9
L291F	2	3.4 ± 0.9	4.4 ± 0.2
L291H	3	4.3 ± 0.7	6.0 ± 0.8
L291P	3	3.0 ± 0.5	6.8 ± 1.5
M318K	3	3.2 ± 0.9	11.2 ± 2.6
G377R	6	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1
A445P	6	1.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3
Y455C	1	3.1	8.6
Y455F	3	4.6 ± 0.5	11.0 ± 2.2
P457L	4	6.4 ± 0.8	13.5 ± 1.7
G483R	2	1.7 ± 0.6	8.6 ± 0.9
G483V	2	0.8 ± 0.3	6.5 ± 1.9
M519V	4	3.1 ± 0.3	5.1 ± 0.1
S529V	4	6.4 ± 0.7	14.6 ± 0.4
P545L	20	3.0 ± 0.2	13.0 ± 0.9
G549R	3	7.5 ± 1.1	13.5 ± 1.9
L552P	3	2.5 ± 0.8	9.6 ± 1.2
Y575S	7	0.4 ± 0.1	3.2 ± 0.4
E579K	7	3.8 ± 0.3	13.4 ± 1.1
A610V	3	0.5 ± 0.0	2.7 ± 0.3
H612Q	3	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.4
A644P	2	0.8 ± 0.1	2.1 ± 0.3
ΔN470	4	1.4 ± 0.2	3.8 ± 0.4

Fig. 11

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

cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggtgg aggtcgggga tgaggcagca 60
ggtaggacag tgacctcggt gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctcctcgtcc 120
gcccgttgtt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac 180
ggagcgggcc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacca tgggagtgag gcacccgccc 240
tgctcccacc ggctcctggc cgtctgcgcc ctcgtgtcct tggcaaccgc tgcactcctg 300
gggcacatcc tactccatga tttcctgctg gttccccgag agctgagtgg ctcctcccca 360
gtcctggagg agactcaccc agctcaccag cagggagcca gcagaccagg gccccgggat 420
gcccaggcac accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccaac 480
agccgcttcg attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc 540
tgctgctaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc 600
ttcttcccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc 660
tacacggcca ccctgacccg taccacccca accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg 720
cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct 780
aacaggcgct acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca 840
ctctacagcg tggagttctc cgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac 900
ggccgcgtgc tgctgaacac gacggtggcg ccctgttct ttgcggacca gttccttcag 960
ctgtccacct cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtccctg 1020
atgctcagca ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc 1080
ggtgcgaacc tctacgggtc tcaccctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca 1140
cacggggtgt tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc 1200
cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc 1260
aagagcgtgg tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg 1320
ggcctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg 1380
gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac 1440
atggactccc ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg 1500
gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc 1560
agctcgggcc ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc 1620
atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc 1680
cccgacttca ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat 1740
gaccaggtgc ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcaga 1800
ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg 1860
gttgggggga ccctccaggc ggccaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca 1920
cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg 1980
gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc 2040
cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc 2100
gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc 2160
ggcttcctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc 2220

tacccccttca tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc 2280
agcgagccgg cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc 2340
cacctctaca cactgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc 2400
ttcctggagt tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg 2460
gaggccctgc tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc 2520
cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca 2580
cccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg 2640
ccggcccccc tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag 2700
ggccctggcc tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg 2760
accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg 2820
ctggagcgag gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat 2880
gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg 2940
ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc 3000
tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt 3060
ctcgtcagct ggtgttagcc gggcggagtg tgttagtctc tccagaggga ggctggttcc 3120
ccagggaagc agagcctgtg tgcgggcagc agctgtgtgc gggcctgggg gttgcatgtg 3180
tcacctggag ctgggcacta accattccaa gccgccgcat cgcttgtttc cacctcctgg 3240
gccggggctc tggcccccaa cgtgtctagg agagctttct ccctagatcg cactgtgggc 3300
cggggcctgg agggctgctc tgtgttaata agattgtaag gtttgccctc ctcacctgtt 3360
gccggcatgc gggtagtatt agccaccccc ctccatctgt tcccagcacc ggagaagggg 3420
gtgctcaggt ggaggtgtgg ggtatgcacc tgagctcctg cttcgcgcct gctgctctgc 3480
cccaacgcga ccgcttcccg gctgcccaga gggctggatg cctgccggtc cccgagcaag 3540
cctgggaact caggaaaatt cacaggactt gggagattct aaatcttaag tgcaattatt 3600
ttaataaaag gggcatttgg aatc 3624

Fig. 12.

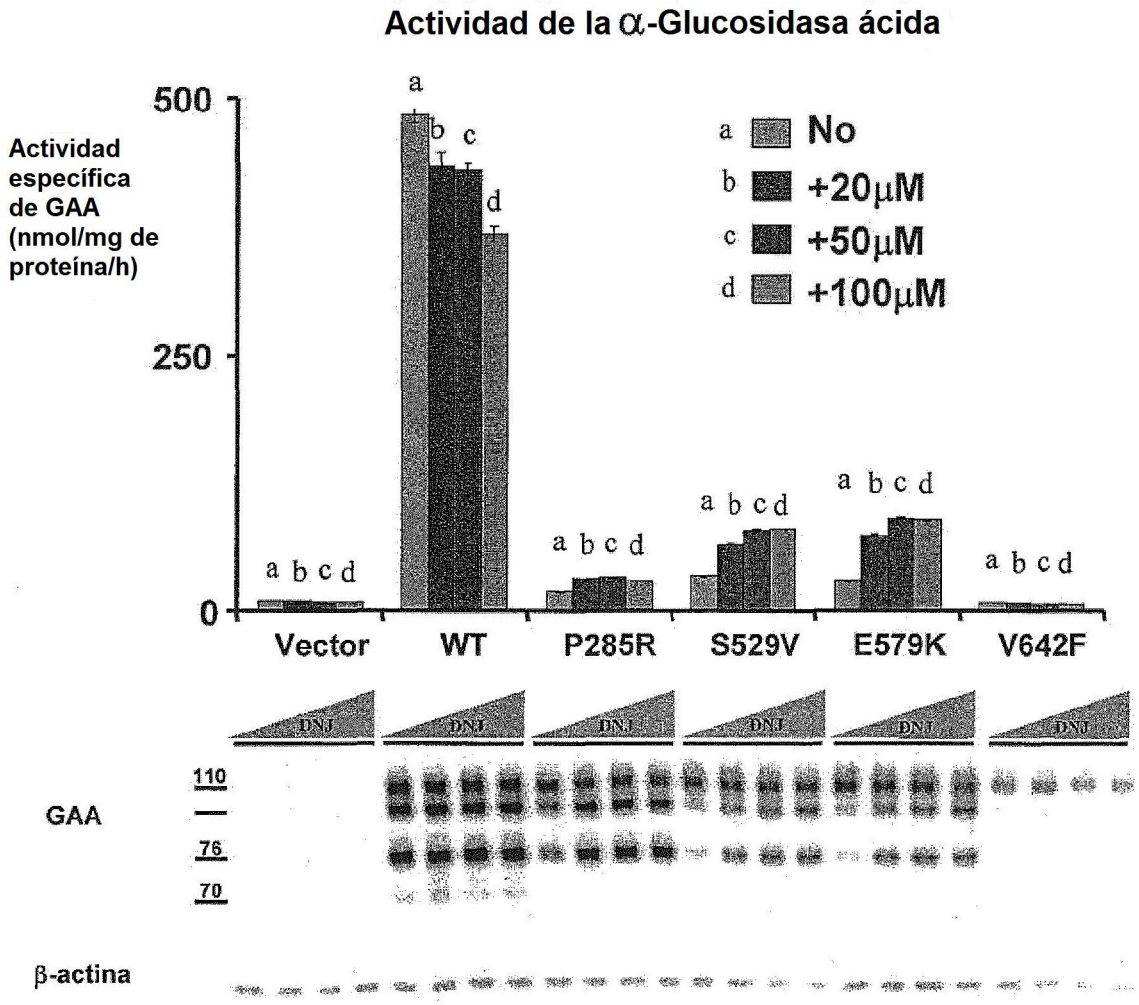

Actividad de la α-Glucosidasa ácida
Actividad específica de GAA (nmol/mg de proteína/h)
500
250
0
a No
b +20μM
c +50μM
d +100μM
a b c d
Vector
WT
P285R
S529V
E579K
V642F
DNJ
GAA
110
76
70
β-actina

Fig. 13

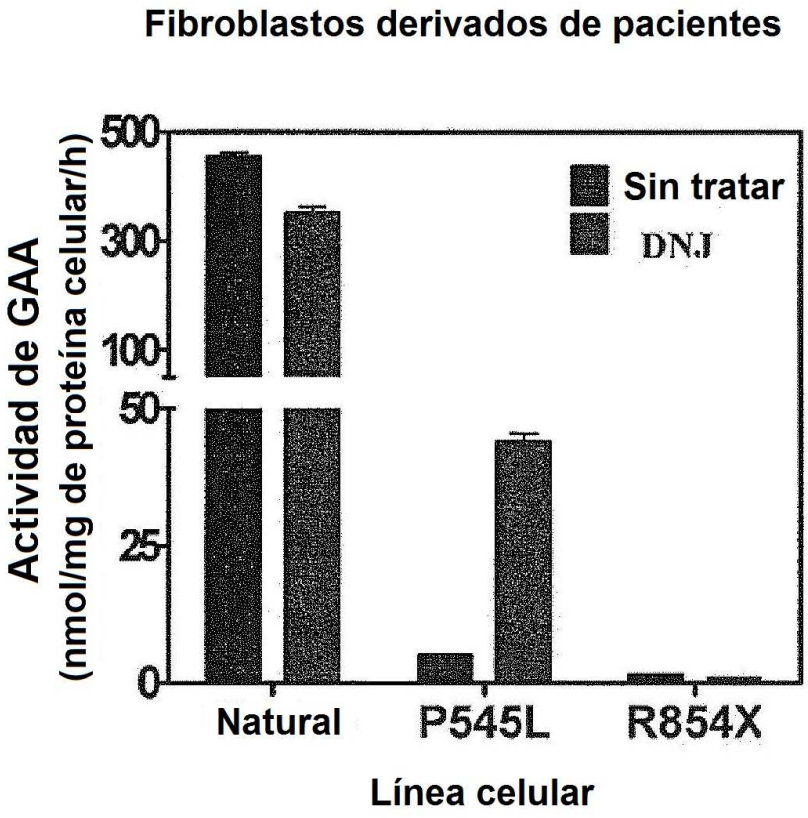

Fibroblastos derivados de pacientes
Actividad de GAA
(nmol/mg de proteína celular/h)
500
300
100
50
25
0
Sin tratar
DN.I
Natural
P545L
R854X
Línea celular

Fig. 14

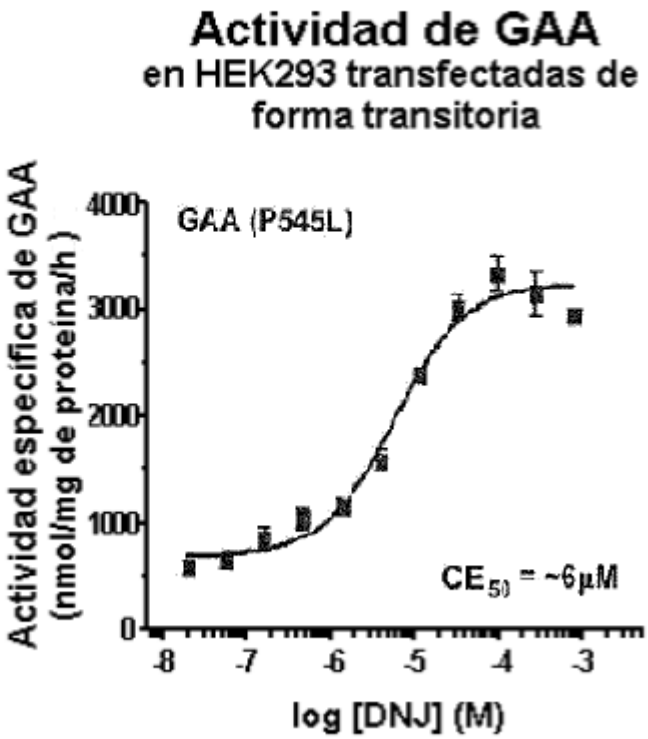

Actividad de GAA
en HEK293 transfectadas de forma transitoria
Actividad especifica de GAA (nmol/mg de proteina/h)
GAA (P545L)
4000
3000
2000
1000
0
CE50 = ~6µM
-8
-7
-6
-5
-4
-3
log [DNJ] (M)

Fig. 15

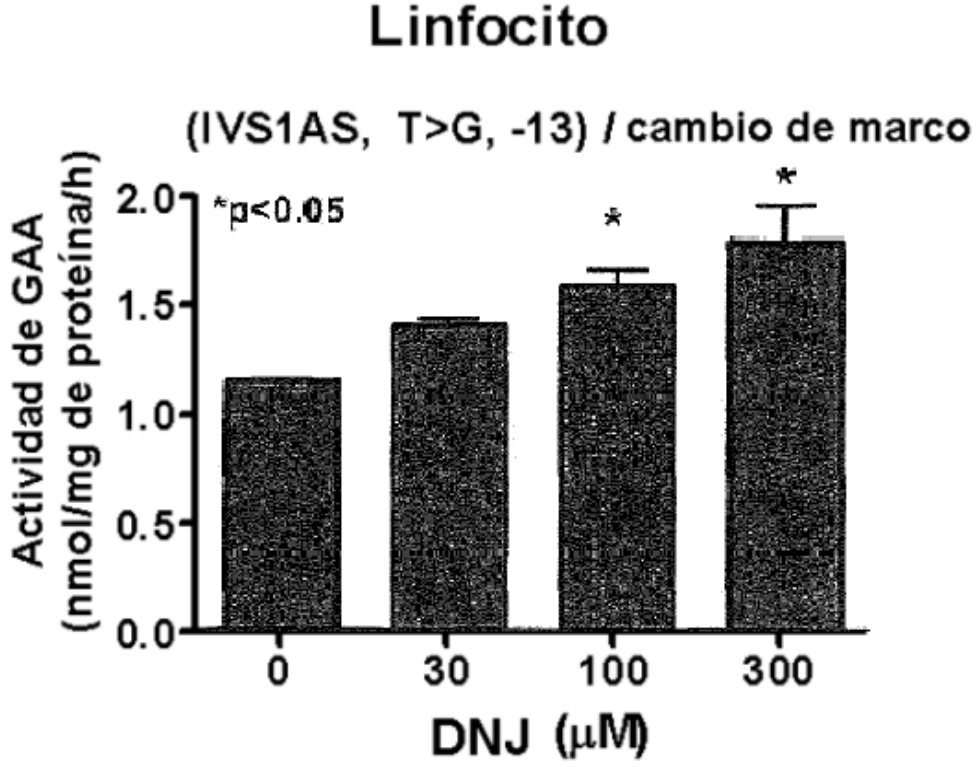

Linfocito
(IVS1AS, T>G, -13) / cambio de marco
Actividad de GAA
(nmol/mg de proteína/h)
*p<0.05
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
0
30
100
300
DNJ (μM)

Fig. 16

Secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la alfa-glucosidasa lisosomal humana (GAA) (N.º de acceso a GenBank: Y00839)

```
Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1               5                  10                  15
Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
            20                  25                  30
His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
        35                  40                  45
Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
    50                  55                  60
Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65                  70                  75                  80
Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
                85                  90                  95
Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
            100                 105                 110
Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
        115                 120                 125
Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
    130                 135                 140
Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145                 150                 155                 160
Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
                165                 170                 175
Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
            180                 185                 190
Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
        195                 200                 205
Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
    210                 215                 220
Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225                 230                 235                 240
Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
                245                 250                 255
Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
            260                 265                 270
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
        275                 280                 285
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
    290                 295                 300
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305                 310                 315                 320
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
                325                 330                 335
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
            340                 345                 350
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
        355                 360                 365
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
    370                 375                 380
```

```
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385                 390                 395                 400
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
                405                 410                 415
Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
            420                 425                 430
Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
        435                 440                 445
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
    450                 455                 460
Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465                 470                 475                 480
Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
                485                 490                 495
Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
            500                 505                 510
Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
        515                 520                 525
Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
    530                 535                 540
Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545                 550                 555                 560
Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
                565                 570                 575
Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
            580                 585                 590
Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
        595                 600                 605
Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
    610                 615                 620
Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625                 630                 635                 640
Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
                645                 650                 655
Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
            660                 665                 670
Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
        675                 680                 685
Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
    690                 695                 700
Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705                 710                 715                 720
Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
                725                 730                 735
Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
            740                 745                 750
Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
        755                 760                 765
Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
    770                 775                 780
Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785                 790                 795                 800
Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
                805                 810                 815
His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
            820                 825                 830
Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
```

```
        835                 840                 845
Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
    850                 855                 860
Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865                 870                 875                 880
Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
                885                 890                 895
Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
            900                 905                 910
Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
        915                 920                 925
Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
    930                 935                 940
Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945                 950
```