

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 481**

51 Int. Cl.:
C12N 9/40

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02763720 .6**
96 Fecha de presentación: **25.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1436387**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE GLÓBULOS ROJOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS A, B Y AB UTILIZANDO A-N-ACETILGALACTOSAMINIDASAS Y A-GALACTOSIDASAS CON ESPECIFICIDADES DE SUSTRATO Y PROPIEDADES CINÉTICAS ÚNICAS.**

30 Prioridad:
25.09.2001 US 324970 P
05.03.2002 US 361769 P
20.09.2002 US 251271

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2011

73 Titular/es:
VELICO MEDICAL, INC.
100 CUMMINGS CENTER, SUITE 436 H
BEVERLY MA 01915-6122, US

72 Inventor/es:
CLAUSEN, Henrik;
DE LA VEGA, Humberto;
HILL, Cheryl y
LIU, Qiyong, Peter

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

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).

ES 2 370 481 T3

DESCRIPCIÓN

Conversión enzimática de glóbulos rojos de los grupos sanguíneos A, B y AB utilizando α -N-acetilgalactosaminidasas y α -galactosidasas con especificidades de sustrato y propiedades cinéticas únicas

Campo de la invención

Esta invención se refiere a la eliminación enzimática de los antígenos tipo B de las células reactivas de la sangre de los grupos B y AB en los hemoderivados, y por consiguiente la conversión de éstas en células reactivas que no sean B. Específicamente esta invención se refiere a la eliminación enzimática de los monosacáridos inmunodominantes que especifican los antígenos del grupo sanguíneo B, es decir α 1,3-D-galactosa. Más particularmente, esta invención se refiere al uso de α -galactosidasas únicas con propiedades cinéticas superiores para la eliminación de los monosacáridos inmunodominantes de los antígenos del grupo sanguíneo B y para un mejor comportamiento en la conversión enzimática de glóbulos rojos. Esta invención se refiere además a métodos de uso de esas α -galactosidasas únicas para obtener la eliminación completa de los antígenos B de las células sanguíneas tipo B y AB determinados mediante la identificación serológica estándar del grupo sanguíneo del banco de sangre y por análisis de compatibilidad cruzada. Más particularmente, esta invención se refiere a métodos de conversión de células sanguíneas, que usan cantidades significativamente menores de proteínas enzimáticas glucosidasas recombinantes que las utilizadas previamente, y que obtienen una seroconversión completa de todos los glóbulos rojos del grupo sanguíneo B.

Antecedentes de la invención

Según se usa en este documento, el término "hemoderivados" incluye la sangre entera y los componentes celulares derivados de la sangre, comprendidos los eritrocitos (glóbulos rojos) y las plaquetas.

Hay más de 30 sistemas de grupos (o tipos) sanguíneos, uno de los más importantes de los cuales es el sistema ABO. Este sistema se basa en la presencia o ausencia de antígenos A y/o B. Estos antígenos se encuentran en la superficie de los eritrocitos y las plaquetas así como en la superficie de las células endoteliales y la mayoría de las epiteliales. El principal hemoderivado utilizado para transfusión consiste en eritrocitos, que son glóbulos rojos que contienen hemoglobina, cuya principal función es el transporte de oxígeno. La sangre del grupo A contiene antígenos A en sus eritrocitos. Análogamente, la sangre del grupo B contiene antígenos B en sus eritrocitos. La sangre del grupo AB contiene ambos antígenos, y la sangre del grupo O no contiene ninguno de los antígenos.

Las estructuras del grupo sanguíneo son glucoproteínas o glucolípidos y se ha realizado un importante trabajo para identificar las estructuras específicas que constituyen los determinantes o antígenos A y B. La especificidad del grupo sanguíneo ABH se determina por la naturaleza y la unión de los monosacáridos en los extremos de las cadenas de carbohidratos. Las cadenas de carbohidratos están unidas al esqueleto de un péptido (glucoproteína) o un lípido (glucoesfingolípido), los cuales están unidos a la membrana celular de las células sanguíneas. El monosacárido inmunodominante que determina la especificidad tipo A es una N-acetilgalactosamina (GalNAc) con unión α 1-3, en tanto el monosacárido correspondiente con especificidad tipo B es una galactosa (Gal) con unión α 1-3. Las células sanguíneas tipo O carecen de esos monosacáridos en los extremos terminales de las cadenas de oligosacáridos, las cuales en cambio terminan en residuos de fucosa (Fuc) con unión α 1-2.

Se encuentra una gran diversidad de estructuras de carbohidratos del grupo sanguíneo ABH debido a las variaciones estructurales en las cadenas de oligosacáridos que tienen sacáridos inmunodominantes ABH. La tabla 1 proporciona una lista de estructuras informadas en el hombre y las que han sido encontradas en glóbulos rojos humanos o en extractos de sangre. Por una reseña, véase, Clausen & Hakomori, Vox Sang 56(1): 1-20, 1989). Los glóbulos rojos contienen antígenos ABH en glucoproteínas y glucoesfingolípidos unidos por N, aunque generalmente se cree que los glucanos unidos por O en las glucoproteínas de los eritrocitos, principalmente glucoforinas, terminan en ácido siálico y no en antígenos ABH. Los glucoesfingolípidos de cadena tipo 1 no son productos endógenos de los glóbulos rojos, sino más bien adsorbidos del plasma.

Tabla I: Determinantes inmunorreactivos del grupo histosanguíneo ABH de células humanas ¹

Nombre	Estructura hapteno	Tipo de glucoconjugado	Encontrado en glóbulos rojos	Nº de estructura
A tipo 1, ALe ^d	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R	Glucolípidio	Glucolípidio	1
	2	unido por N		
	Fuc α 1	unido por O		
A tipo 1, Ale ^b	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R	Glucolípidio	Glucolípidio	2

Nombre	Estructura hapteno		Tipo de glucconjugado	Encontrado en glóbulos rojos	Nº de estructura
	2	4	unido por N		
	Fuca 1	Fuca 1	unido por O		
A tipo 2, A	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	3
	2		unido por N	unido por N	
	Fuca	1	unido por O		
A tipo 2, ALe ^y	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido?	4
	2	3	unido por N		
	Fuca 1	Fuca 1	unido por O		
A tipo 3, unido por O	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr		unido por O		5
	2				
	Fuca 1				
A tipo 3, Repetitivo	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	6
	2	2			
	Fuca 1	Fuca 1			
A tipo 4, Globo	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R		Glucolípido	Glucolípido?	7
	2				
	Fuca	1			
A tipo 4, Ganglio	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R		Glucolípido		8
	2				
	Fuca 1				
B tipo 1, BLe ^d	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	9
	2		unido por N		
	Fuca	1	unido por O		
B tipo 1, BLe ^b	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	10
	2	4	unido por N		
	Fuca 1	Fuca I	unido por O		
B tipo 2, B	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	11
	2		unido por N	unido por N	
	Fuca	1	unido por O		
B tipo 2, BLe ^y	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido?	12
	2	3	unido por N		
	Fuca 1	Fuca 1	unido por O		
B tipo 3, unido por O	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr		unido por O		13

Nombre	Estructura hapteno		Tipo de glucconjugado	Encontrado en glóbulos rojos	Nº de estructura
	2				
	Fuca 1				
B tipo 4, Globo	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R		Glucolípido?	Glucolípido?	14
	2				
	Fuca	1			
B tipo 4, Ganglio	Gal α 1-3Galp1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R		Glucolípido?		15
	2				
	Fuca	1			
H tipo 1, Le ^d	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	16
	2		unido por N		
	Fuca	1	unido por O		
H tipo 1, Le ^b	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	17
	2	4	unido por N		
	Fuca 1	Fuca 1	unido por O		
H tipo 2, H	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	18
	2		unido por N	unido por N	
	Fuca	1	unido por O		
H tipo 2, Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido?	19
	2	3	unido por N		
	Fuca 1	Fuca 1	unido por O		
H tipo 3, unido por O	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr		unido por O		20
	2				
	Fuca	1			
H tipo 3, H-A	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	21
	2	2		(glóbulo rojo A)	
	Fuca 1	Fuca 1			
H tipo 4, Globo	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R		Glucolípido	Glucolípido	22
	2				
	Fuca	1			
H tipo 4, Ganglio	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R		Glucolípido		23
	2				
	Fuca 1				
Thomsen-Friedenrich	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr		unido por O	unido por O	24
Tf, T				(+SA)	
Gal-A,	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R		Glucolípido	Glucolípido	25
T de reacción	2			(glóbulo rojo A)	

Nombre	Estructura hapteno		Tipo de glucoconjugado	Encontrado en glóbulos rojos	Nº de estructura
cruzada					
	Fuα	1			
Tn, A de reacción cruzada	GalNAcα1-O-Ser/Thr		unido por O	unido por O	26
				(+SA)	
¹ Adaptado de Clausen y Hakomori, Vox Sang 56(1): 1-20, 1989. Designaciones: "?" indica posibles estructuras glucolípidas que no han sido informados hasta la fecha.					

- Los grupos sanguíneos A y B existen en varios subtipos. Los subtipos del grupo sanguíneo A son los más frecuentes y se reconocen tres subtipos principales del grupo sanguíneo tipo A. Esos subtipos se conocen como A₁, A intermedio (A_{int}) y A₂. Existen diferencias tanto cuantitativas como cualitativas que distinguen esos tres subtipos. Cuantitativamente, los eritrocitos A₁ tienen más sitios antigénicos A, es decir, residuos terminales *N*-acetilgalactosamina, que los eritrocitos A_{int} los que a su vez tienen más sitios antigénicos A que los eritrocitos A₂. Cualitativamente, los eritrocitos A₁ tienen una estructura A dual repetida en un subconjunto de glucoesfingolípidos, mientras que los las células sanguíneas A₂ tienen una estructura H en una estructura A interna en un subconjunto similar de glucolípidos (Clausen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 1199-203, 1985, Clausen et al., J. Biol. Chem. 261(3): 1380-7, 1986). Se cree que estas diferencias entre los subtipos A₁ y A débil se relacionan con diferencias en las propiedades cinéticas de las variantes de isoenzimas del grupo sanguíneo A responsables de la formación de los antígenos A (Clausen et al., J. Biol. Chem. 261(3): 1388-92, 1986). Las diferencias en los subtipos del grupo B se cree que son sólo de naturaleza cuantitativa.
- La sangre del grupo A contiene anticuerpos contra el antígeno B. En cambio, la sangre del grupo B contiene anticuerpos contra el antígeno A. La sangre del grupo AB no tiene ningún anticuerpo, y la sangre del grupo O tiene ambos. Se cree que los anticuerpos para éstos y otros carbohidratos, antígenos definidos de grupos sanguíneos, son provocados como respuesta a la continua exposición a microorganismos que tienen estructuras de carbohidratos relacionadas. Un individuo cuya sangre contiene alguno (o ambos) de los anticuerpos anti-A o anti-B no puede recibir una transfusión de sangre que contenga el o los antígenos incompatibles correspondientes. Si un individuo recibe una transfusión de sangre de un grupo incompatible, los anticuerpos del receptor de la transfusión de sangre recubren los glóbulos rojos del grupo transfundido incompatible y causan la aglutinación de los glóbulos rojos transfundidos o su aglomeración. Como consecuencia se pueden producir reacciones a la transfusión y/o hemólisis (la destrucción de los glóbulos rojos).
- Para evitar la aglutinación de los glóbulos rojos, reacciones a la transfusión y hemólisis, se realiza un análisis de compatibilidad cruzada entre el tipo de sangre para la transfusión y el tipo de sangre del receptor de la transfusión. Por ejemplo, un receptor con sangre tipo A puede ser transfundido con seguridad con sangre tipo A, que contiene los antígenos compatibles. Debido a que la sangre tipo O no contiene antígenos A ni B, puede ser trasfundida a cualquier receptor con cualquier grupo sanguíneo, es decir, receptores con los grupos sanguíneos A, B, AB u O. Por lo tanto, la sangre del grupo O se considera "universal", y puede ser utilizada para todas las transfusiones. Por ende, es deseable que los bancos de sangre mantengan grandes cantidades de sangre del grupo O. No obstante, hay escasez de donantes de sangre del grupo O. Por consiguiente, es deseable y útil eliminar los antígenos inmunodominantes A y B de los grupos sanguíneos A, B y AB para mantener grandes cantidades de hemoderivados universales.
- En un intento por aumentar el suministro de sangre del grupo O, se desarrollaron métodos para convertir sangre de ciertos grupos A, B y AB en sangre del grupo O. La conversión de células sanguíneas B en células sanguíneas del grupo O fue realizada en el pasado. Sin embargo, la conversión de las células sanguíneas A más abundantes sólo se logró con las células sanguíneas del subgrupo A débil menos abundantes. El principal obstáculo para el desarrollo y la utilización de células sanguíneas O universales convertidas enzimáticamente, en el pasado, ha sido el fracaso en la conversión enzimática de las células A₁ fuertes. Este obstáculo ha permanecido. Como se explicará más adelante en detalle las enzimas y los métodos utilizados en el estado anterior de la técnica eran ineficaces, poco prácticos y/o demasiado costosos para ser utilizados en un proceso comercial para el suministro de células sanguíneas universales del grupo O.
- Conversión de células sanguíneas B:
- La conversión enzimática de sangre del grupo B usando α-galactosidasa del grano de café (*Coffea canephora*) purificada o recombinante se logró usando 100-200 U/ml (Patente de los Estados Unidos Nº 4,427, 777; Zhu et al., Arch Biochem Biophys 1996; 327(2): 324-9; Kruskall et al., Transfusion 2000; 40(11): 1290-8). Se informó que la actividad específica de la α-galactosidasa del grano de café era de 32 U/mg usando p-nitrofenil α-D-Gal con una unidad (U) definida como un μmol de sustrato hidrolizado por minuto (Zhu et al., Arch Biochem Biophys 1996; 327(2): 324-9). Las conversiones enzimáticas se realizaron a pH 5.5 con aproximadamente 6 mg/ml de enzima a 80-90% de hematocrito, y

las células sanguíneas O convertidas resultantes funcionaron normalmente en experimentos de transfusión y no se observaron parámetros clínicos significativamente adversos (Kruskall et al., Transfusion 2000; 40(11): 1290-8). Estos datos junto con publicaciones anteriores, demuestran claramente que la conversión enzimática de los glóbulos rojos es factible y que esas células sanguíneas O convertidas enzimáticamente del grupo B (B ECO), pueden funcionar en transfusiones médicas tan bien como células sanguíneas sin tratar del tipo correspondiente. No obstante, las cantidades de enzimas utilizadas en esos estudios, aún con la tecnología de expresión recombinante más eficaz de la actualidad, hace que las células sanguíneas ECO no sean prácticas fundamentalmente por razones económicas.

Se han comunicado reivindicaciones de protocolos mejorados para la conversión de células sanguíneas B usando α -galactosidasa recombinante de soja (Glycine max) con una actividad específica de aproximadamente 200 U/mg usando 5-10 unidades/ml con 16% de hematocrito (Patentes de los Estados Unidos N° 5,606,042; 5,633,130; 5,731,426; 6,184,017). La α -galactosidasa de soja se usó a una concentración de 25-50 μ g/ml, que representa una reducción significativa de las cantidades de proteína enzimática requeridas (50-200 veces) (Davis et al., Biochemistry and Molecular Biology International, 39(3): 471-485, 1996). Esta reducción se debe parcialmente a la mayor actividad específica de la α -galactosidasa de soja (aproximadamente 6 veces) así como a los diferentes métodos utilizados para la conversión y la evaluación. Las 200 U/ml de enzima utilizadas en el estudio de Kruskall et al., (Transfusion, 40(11): 1290-8, 2000) lograron las conversiones de unidades completas (aproximadamente 220 ml de células empacadas) a 80-90% de hematocrito que se analizaron minuciosamente mediante la determinación del grupo sanguíneo del banco de sangre así como por análisis más sensibles de compatibilidad cruzada. Además, la eficacia de la conversión fue evaluada mediante análisis de supervivencia e inmunidad inducida en pacientes que recibieron múltiples transfusiones de células convertidas. Las conversiones enzimáticas se hicieron en tubos de ensayo a escala de ml a un hematocrito de 16%, según se describe en la patente de los Estados Unidos N° 5,606,042 (y 5,633,130; 5,731,426; 6,184,017) con α -galactosidasa de soja, y la eficacia de la conversión no se evaluó por análisis de compatibilidad cruzada. Las conversiones de células sanguíneas a un hematocrito de 16% requirieron 10 U/ml, en tanto que las conversiones a un hematocrito de 8% requirieron 5 U/ml, lo que indica que la conversión a un hematocrito mayor requiere más enzima aunque no se analizaron concentraciones de células sanguíneas superiores. Por lo tanto, parte de la reducción en las cantidades requeridas de proteína enzimática en comparación con los protocolos comunicados por Kruskall et al., (Transfusion 2000; 40(11): 1290-8), se relaciona con la concentración (hematocrito) de células sanguíneas utilizadas en la conversión, y ésta puede representar más de 5-10 veces aunque no es posible la comparación directa sin experimentación. La patente de los Estados Unidos N° 5,606,042 (I 5,633,130; 5,731,426; 6,184,017) estipula además mejoras en el tampón de conversión usando citrato de Na y glicina a un pH menos ácido (preferentemente pH 5.8) e incluyendo más proteína en forma de BSA (albúmina de suero bovino) para la estabilización. Interesantemente, se encontró que el tampón de conversión desarrollado para la α -galactosidasa de soja no era aplicable a la α -galactosidasa del grano de café. Aunque, la patente de los Estados Unidos N° 5,606,042 (y 5,633,130; 5,731,426; 6,184,017) puede proporcionar algunas mejoras en la conversión de células sanguíneas B, es claro que se requiere al menos más de 0.5 mg de enzima por ml de glóbulos rojos tipo B empacados, usando el protocolo dado a conocer. Es probable que se requiera mucha más enzima que esto para obtener células sanguíneas completamente convertidas en células sanguíneas O por los procedimientos de determinación del grupo sanguíneo más sensibles utilizados en los protocolos del banco de sangre. Por otra parte, el protocolo requiere la introducción de otra proteína foránea (BSA o albúmina de suero humano) así como la exposición de las células sanguíneas a un pH ácido.

Es evidente a partir de lo anterior que son necesarias otras mejoras en la conversión de células sanguíneas B para que esta tecnología puede ser práctica y comercialmente aplicable. Las mejoras necesarias incluyen la obtención de enzimas α -galactosidasa más eficaces, que permitan que la conversión tenga lugar preferentemente a pH neutro y sin el agregado de proteína foránea.

Conversión de células sanguíneas A:

Levy y Animoff (J. Biol. Chem. 255: 1737-42, 1980) analizaron la capacidad de la α -N-acetilgalactosaminidasa de Clostridium perfringens purificada para convertir células sanguíneas A, y encontraron reducción en la expresión de antígenos pero se mantuvo una considerable actividad del grupo sanguíneo A. Otros estudios de esta enzima llevaron a la purificación hasta una aparente homogeneidad con una actividad específica, usando sustrato α GalNAc-p-nitrofenilo, de 43.92 U/mg (Hsieh et al., IUBMB Life, 50(2): 91-7, 2000; solicitud PCT N° WO 99/23210). La enzima purificada tuvo un pH óptimo neutro con el sustrato α GalNAc-p-nitrofenilo, pero no se presentaron estudios de la actividad de esta enzima con oligosacáridos. Se informó de cierta degradación del epítipo A₂ con la enzima purificada en un ensayo ELISA, pero la enzima no ha sido evaluada para la conversión enzimática de células sanguíneas A₂ con una determinación del grupo sanguíneo adecuada.

Goldstein (Prog Clin Biol Res 165: 139-57, 1984; Transfus Med Rev 3(3): 206-12, 1989) no tuvo éxito en la conversión de células sanguíneas A usando α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo. La patente de los Estados Unidos N° 4,609,627 titulada "Conversión enzimática de eritrocitos de ciertos subtipos A y AB", apunta a un proceso para convertir A_{int} y A₂ (que incluyen los eritrocitos A₂B) en eritrocitos del tipo de antígeno H, así como a composiciones de eritrocitos del tipo B que carezcan de antígenos A, las cuales, antes del tratamiento, contenían tanto antígenos A como B en la superficie de dichos eritrocitos. El proceso para convertir eritrocitos A_{int} y A₂ en eritrocitos del tipo de antígeno H, que se describe en la patente de los Estados Unidos N° 4,609,627, incluye los pasos de equilibrar los eritrocitos de ciertos subtipos A o AB, poner en contacto los eritrocitos equilibrados con la enzima α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de

pollo durante un período suficiente para convertir el antígeno A en antígeno H, extraer la enzima de los eritrocitos y volver a equilibrarlos. La patente de los Estados Unidos N° 6,228,631 titulada "Enzima α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante y ADNc que codifica dicha enzima" proporciona una fuente recombinante para la enzima de pollo. Se informó que las actividades específicas de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo purificada producida por *Pichia pastoris* era de aproximadamente 51-56 U/mg usando p-nitrofenil- α GalNAc como sustrato (Zhu et al., Protein Expression and Purification 8: 456-62, 1996). Las condiciones de conversión descritas para las células sanguíneas A_{int} y A₂ en la patente de los Estados Unidos N° 4,609,627 incluyeron 180 U/ml de células sanguíneas (no se especifica el hematocrito) a pH ácido 5.7, y las células sanguíneas tratadas no se aglutinaron con reactivo anti-A sin especificar. Este protocolo requiere más de 3 mg/ml de proteína enzimática y no se ha informado que convierta células sanguíneas tipo A₁.

Hata et al. (Biochem Int. 28(1): 77-86, 1992) también comunicaron la conversión de células sanguíneas A₂ usando α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo a pH ácido. La patente de los Estados Unidos N° 5,606,042 (y 5,633,130; 5,731,426; 6,184,017) da a conocer resultados semejantes.

Falk et al. (Arch Biochem Biophys 290(2): 312-91991, 1991) demostraron que una α -N-acetilgalactosaminidasa purificada de *Ruminococcus torques* cepa IX-70 podría destruir la aglutinabilidad de *Dolichus biflorus* indicando que la fuerza antigénica A de las células sanguíneas A₁ se redujo al nivel de las células sanguíneas A₂.

Izumi et al. (Biochem Biophys Acta 1116: 72-74, 1992) analizaron α -N-acetilgalactosaminidasa de *Acremonium* sp. purificada en células sanguíneas de tipo A₁. Aunque se observó algo de reducción en el título de aglutinación usando 7 000 U/ml (140 U/20, μ l) a 4% de hematocrito, la conversión no fue completa.

La enzima α -N-acetilgalactosaminidasa humana fue aislada, clonada y expresada (Tsuji et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163: 1498-1504, 1989; Wang et al., Clonación molecular de α -N-acetilgalactosaminidasa humana, secuencia de nucleótidos y expresión de un ADNc completo. La homología con la alfa-galactosidasa A humana sugiere la evolución desde un gen ancestral común. J Biol Chem. 265: 21859-66, 1990) (patente de los Estados Unidos N° 5,491,075). El pH óptimo de la α -N-acetilgalactosaminidasa humana es de 3.5 (Dean KJ, Sweeley CC. Estudios sobre las alfa-galactosidasas de hígado humano. II. Purificación y propiedades enzimáticas de la alfa-galactosidasa B (alfa-N-acetilgalactosaminidasa). Estudios sobre alfa-galactosidasas de hígado humano. I. Purificación de la alfa-galactosidasa A y sus propiedades enzimáticas con sustratos glucolípidos y oligosacáridos. J Biol Chem. 254: 9994-10000, 1979).

Es evidente a partir de lo anterior que la conversión enzimática de las células sanguíneas tipo A, y particularmente del subgrupo de células sanguíneas A₁ que constituyen hasta 80% del grupo A, no se ha llevado a cabo hasta la fecha. Por consiguiente, existe la necesidad en el estado anterior de la técnica de identificar enzimas adecuadas capaces de convertir las células sanguíneas del grupo A mediante eliminación de todos los antígenos inmunorreactivos A. Además, existe la necesidad de desarrollar condiciones de conversión adecuadas preferentemente a pH neutro y sin requerimiento de otras proteínas foráneas.

Ensayos de detección:

Los métodos previos para la búsqueda, identificación y caracterización de exoglucosidasas dependían generalmente del uso de derivados de monosacáridos simples como sustratos para identificar la especificidad por el sacárido y la posible unión. Los sustratos monosacáridos, o raramente oligosacáridos, derivatizados incluyen, pero no exclusivamente, p-nitrofenilo (pNP), bencilo (Bz), 4-metil-umbeliferilo (Umb) y 7-amino-4-metil-cumarina (AMC). El uso de dichos sustratos proporciona herramientas fáciles, rápidas y económicas para identificar actividades de glucosidasa y realizar una detección a gran escala de diversas fuentes de enzimas que se puedan aplicar prácticamente. Sin embargo, las propiedades cinéticas y las especificidades de sustrato finas de las enzimas glucosidasas pueden no necesariamente verse reflejadas en ensayos con estructuras tan simples. También es posible que existan enzimas nuevas con alto grado de especificidad y/o eficacia selectiva por estructuras de oligosacáridos complejos y glucoconjugados únicos, pero éstas pueden haber sido pasadas por alto y permanecer desconocidas debido a los métodos de análisis. Por lo tanto, para identificar y seleccionar la mejor exoglucosidasa para una estructura de oligosacárido complejo o glucoconjugado particular puede ser preferible usar dichas estructuras complejas en ensayos utilizados para la detección de fuentes de enzimas. Además, los ensayos utilizados para la detección pueden incluir la selección por propiedades cinéticas preferibles como requisitos de pH y comportamiento sobre los sustratos, por ejemplo, unidos a la membrana celular.

En el estado anterior de la técnica, todas las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y α -N-acetilgalactosaminidasas (EC 3.2.1.49) utilizadas para destruir los antígenos B y A de las células sanguíneas fueron identificadas y caracterizadas usando fundamentalmente derivados p-nitrofenilo de monosacáridos. Interesantemente, todas las enzimas α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas utilizadas en los estudios del pasado para intentar eliminar los antígenos A y B de las células sanguíneas son homólogos evolutivos como lo prueban las similitudes significativas en el ADN y la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la α -galactosidasa y la α -N-acetilgalactosaminidasa humanas son homólogos cercanos (Wang et al., J Biol Chem, 265: 21859-66, 1990), y otras enzimas utilizadas previamente en la conversión de células sanguíneas incluidas α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo, α -N-acetilgalactosaminidasa del hongo *accremonium*, y α -galactosidasas bacterianas todas presentan similitudes de secuencia significativas. No se han publicado en la bibliografía científica las estructuras primarias de las α -N-acetilgalactosaminidasas bacterianas. Debido

a que esas glucosidasas comparten similitudes de secuencia se puede prever que las enzimas tengan propiedades cinéticas relacionadas. Basándose en el análisis de la secuencia todas las O-glucósido hidrolasas conocidas han sido agrupadas en 85 familias diferentes, y las α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas mencionadas precedentemente se agrupan en las familias 27 y 36 (véase, por ejemplo, la página web titulada "CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes (Family GH32)" con la dirección http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/GH_32.html). Esas enzimas se caracterizan por tener un mecanismo de retención de la catálisis y el uso de ácido aspártico como el nucleófilo catalítico (Henrissat, Biochem Soc Trans, 26(2): 153-6, 1998; Rye & Withers, Curr Opin Chem Biol, 4(5): 573-80, 2000).

Por consiguiente, existe la necesidad de identificar nuevas actividades de α -galactosidasa y α -N-acetilgalactosaminidasa y las proteínas enzimáticas correspondientes. Si dichas enzimas existen, es probable que no puedan ser clasificadas en las familias 27 y 36 porque se seleccionarán por tener propiedades cinéticas significativamente diferentes.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona en general composiciones y métodos para la eliminación enzimática de antígenos tipo B de las células reactivas de los grupos sanguíneos B y AB en los hemoderivados, y la conversión de esas células en células reactivas que no sean B. Específicamente, esta invención proporciona composiciones y métodos para la eliminación enzimática de los monosacáridos inmunodominantes que especifican los antígenos del grupo sanguíneo B, es decir α 1,3-D-galactosa.

Las nuevas enzimas glucosidasa de la presente invención se seleccionaron específicamente para usar en la eliminación de los monosacáridos inmunodominantes, α Gal, de los oligosacáridos complejos diana semejantes a los antígenos carbohidratos de B de la superficie de las células sanguíneas en los hemoderivados. Las enzimas α -galactosidasas de esta invención son las definidas en la reivindicación 1

En otro aspecto, esta invención proporciona métodos para la seroconversión completa de todos los glóbulos rojos del grupo sanguíneo B, que resulta en la eliminación completa de los antígenos B de las células sanguíneas tipo B y AB. La eliminación de los antígenos B se puede determinar mediante la determinación serológica estándar del grupo sanguíneo del banco de sangre o por análisis de compatibilidad cruzada. De acuerdo con los métodos de esta invención, los antígenos B son eliminados de acuerdo con el método de las reivindicaciones 2 y 3. Estos métodos de seroconversión usan cantidades significativamente menores de proteínas enzimáticas glucosidasas recombinantes que los métodos conocidos previamente en el área.

Los métodos de la presente invención proporcionan eritrocitos seroconvertidos que se pueden caracterizar por: (i) haber sido convertidos de un eritrocito tipo B o tipo AB en un eritrocito que no es B mediante una α -galactosidasa; (ii) haber retenido la antigenicidad P_1 si eran del grupo sanguíneo P_1 ; y (iii) no tener antígenos B detectables, según se determina mediante la determinación serológica estándar del grupo sanguíneo del banco de sangre o por análisis de compatibilidad cruzada. Los eritrocitos seroconvertidos se caracterizan por: (i) haber sido convertidos de un eritrocito tipo AB en un eritrocito que no es B mediante una α -galactosidasa; (ii) tener estructuras H asociadas a A (iii) haber retenido la antigenicidad P_1 si eran del grupo sanguíneo P_1 ; y (iv) no tener antígenos B detectables, según se determina mediante la determinación serológica estándar del grupo sanguíneo del banco de sangre o por análisis de compatibilidad cruzada.

La presente invención se puede usar para la detección y la selección de enzimas con las características únicas preferidas descritas antes y métodos de purificación y secuenciación de aminoácidos útiles para la clonación y la expresión de los genes que codifican esas enzimas. Esos métodos proporcionan aislados bacterianos que producen dichas enzimas.

El método para detectar y seleccionar una enzima α -galactosidasa útil para eliminar los antígenos tipo B de las células reactivas de los grupos sanguíneos B y AB en los hemoderivados, en condiciones de pH neutro, puede comprender los pasos de (a) poner en contacto una enzima α -galactosidasa candidata, en condiciones de pH neutro, con un sustrato oligosacárido del grupo B y medir la actividad de la enzima candidata con el sustrato oligosacárido del grupo B; (b) poner en contacto dicha enzima α -galactosidasa candidata, en condiciones de pH neutro, con un derivado del monosacárido α -Gal y medir la actividad de la enzima candidata con el derivado del monosacárido del grupo B; y (c) comparar la actividad relativa de la enzima candidata con el sustrato oligosacárido del grupo B y el derivado del monosacárido α -Gal. Las candidatas que tengan no menos de 10% de actividad con los oligosacáridos del grupo sanguíneo B (tetrasacárido o superior) en comparación con los derivados del monosacárido α -Gal simple se seleccionan como útiles para eliminar los antígenos B de las células reactivas de los grupos sanguíneos B y AB en los hemoderivados, en condiciones de pH neutro.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1: ilustra la actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con Gal α -pNP a diferentes pH. Los análisis se realizaron en volúmenes de reacción de 0.5 ml que contenían 1.25 μ mol (2.5 mM) de sustrato. Las

reacciones se incubaron 20 min a 26 °C, y se detuvieron por adición de un volumen igual de tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 9.8). La liberación de p-nitrofenilo se cuantificó a una DO de 405 nm y se graficó en función del pH. Tampones utilizados: pH 5.0 y 5.5: NaOAc 20 mM; pH 6.0-8.0: NaPO₄ 20 mM.

5 FIG. 2: ilustra la actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B a diferentes pH. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de sustrato en tampones de citrato de Na-NaPO₄, pH 2.6-7.4 y tampón de NaPO₄, pH 8.0. Las reacciones se incubaron durante 40 min a 26 °C, se sembraron 3 μ l de la mezcla de reacción en una HPTLC, se desarrollaron en CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8) y se fotografiaron. El Panel A describe el análisis por HPTLC, Std indica migración del sustrato sin enzima; el Panel B describe la escisión del sustrato cuantificada mediante escaneo y graficada en función del pH.

15 FIG. 3: ilustra la actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con el sustrato pentasacárido de Galili a diferentes pH. Los análisis se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 5 nmol del sustrato en tampones citrato de Na-NaPO₄. Las reacciones se incubaron durante 20 min a 26 °C, se sembraron 2 μ l de cada mezcla de reacción en una HPTLC, se desarrollaron en CHCl₃:metanol:H₂O (30:60:20) y se visualizaron mediante pulverización de orcinol. El Panel A describe el análisis por HPTLC, el Panel B describe la escisión del sustrato cuantificada mediante escaneo y graficada en función del pH.

20 FIG. 4: es un análisis por HPTLC de cinco actividades seleccionadas de la α -galactosidasa de Streptomyces con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B. Los números de cepa designados son los mismos que los de la tabla V. El ensayo se realizó como una cronología con los tiempos de toma de muestra 20, 100 y 1000 min evaluados por HPTLC. La migración de los derivados AMC del disacárido estándar, trisacárido (H) y tetrasacárido (B) se indica mediante flechas. NE, sin control con la enzima; origen, posición de aplicación de la muestra. La aparición de un producto disacárido-AMC más pronunciado en N° 2075 se debe a actividad de α -fucosidasa contaminante.

25 FIG. 5: es un análisis por HPTLC de cinco actividades seleccionadas de la α -galactosidasa de Streptomyces con el sustrato Gal α -pNP. Los ensayos se realizaron durante 4 días a 30 °C. Sólo la cepa N° 2260 mostró una actividad significativa con el sustrato pNP, y no se detectó ninguna liberación de galactosa en el extracto de la cepa N° 2357.

30 FIG. 5b: es un análisis por HPTLC de cinco actividades seleccionadas de la α -N-acetilgalactosaminidasa de Streptomyces con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo A (Panel A) y heptasacárido-AMC del grupo sanguíneo A (Panel B). Las cepas de Streptomyces están identificadas con números como en la tabla VII. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de sustratos-AMC, 5.0 μ l de las fracciones seleccionadas de la enzima, y el tampón Citrato de Na 0.05 M de pH 6.0. Las reacciones se incubaron durante 180 min a 30 °C, se sembraron 2.5 μ l de la mezcla de reacción en una HPTLC, se desarrollaron en CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8) y se fotografiaron. La migración de los derivados AMC del trisacárido (H), tetrasacárido (A), heptasacárido y hexasacárido (H-A) se indica mediante flechas. NE, sin control con la enzima; rCHI-Az, enzima α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo; origen, posición de aplicación de la muestra. La aparición de un disacárido-AMC se debe a la actividad de α -fucosidasa contaminante.

35 FIG. 6: es un análisis de la enzima α -galactosidasa de Streptomyces N° 2357 separada por cromatografía S 12. Pre: muestra antes de la cromatografía. Panel A: análisis por HPTLC de la actividad con el sustrato tetrasacárido-AMC de B. Las reacciones se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de sustrato, 2 μ l de las fracciones S12 indicadas, en citrato de sodio 50 mM (pH 6.0) a 30 °C durante 80 minutos. La HPTLC se realizó con 2.5 μ l, se desarrolló en CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8), se secó y se fotografió. Se combinaron las áreas de actividad máxima que contenían actividad de α -fucosidasa contaminante en las fracciones 7-9. Designaciones: Std, sustrato tetrasacárido-AMC de B sin enzima; Co, reacción de control con α -galactosidasa del grano de café. Panel B: análisis SDS-NuPAGE de las fracciones. Designaciones como en el Panel A.

40 FIG. 7: es un análisis SDS-NuPAGE de las fracciones combinadas de la cromatografía S12 de la actividad de la enzima de N° 2357 purificada. Membrana de PVDF teñida con R-250 de SDS-NuPAGE. La banda de proteína escindida para secuenciación se indica mediante una flecha.

45 FIG. 8: es un análisis por HPTLC de especificidades de sustrato de la α -galactosidasa recombinante del grano del café y la α -galactosidasa purificada de N° 2357. La α -galactosidasa del grano de café (carril 1) escindió eficazmente todos los sustratos ensayados, en tanto la α -galactosidasa purificada de N° 2357 escindió selectivamente sólo el tetrasacárido del grupo sanguíneo B. Panel A: sustrato de Galili (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc); Panel B: sustrato P^k (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc-OG_r); Panel C: sustrato P₁ (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-OG_r); y Panel D: sustrato B (Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-4GlcNAc β -OG_r). Las HPTLC en los Paneles A, B y C se desarrollaron usando CHCl₃:metanol:H₂O (60: 35: 8), y en el Panel D con CHCl₃:metanol:H₂O (30:60:10).

50 FIG. 9: ilustra la actividad de la α -galactosidasa purificada de N° 2357 con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B a diferentes pH. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol del sustrato en NaOAc 20 mM (pH 5.0-5.5) o NaPO₄ (pH 6.0-8.0). Las reacciones se incubaron durante 40 min a 26 °C, 3 μ l de la mezcla de reacción se sembraron en una HPTLC, se desarrollaron en CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8) y se

fotografiaron. El Panel A describe el análisis por HPTLC, Std indica migración del sustrato sin enzima; el Panel B describe la escisión del sustrato cuantificada mediante escaneo y graficada en función del pH.

FIG. 9B: ilustra el análisis de la α -galactosidasa purificada de N° 2357 con agregado de cantidades conocidas de BSA separada por cromatografía S12. Panel A: análisis SDS-NuPAGE de las fracciones 26-36. Designaciones: PM: marcadores de peso molecular; Pre: muestra antes de la cromatografía. Panel B: análisis por HPTLC de la actividad con el sustrato tetrasacárido-AMC de B. Las reacciones se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de sustrato, 2 μ l de las fracciones S12 indicadas, en NaPO₄ 50 mM, pH 7.0. La HPTLC se realizó con 2 μ l, se desarrolló en CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8), se secó y se fotografió. Designaciones: Std, sustrato tetrasacárido-AMC de B sin enzima; Co, reacción de control con α -galactosidasa del grano de café; D-AMC, disacárido-AMC; Tri-AMC, trisacárido-AMC; Tetr-AMC, tetrasacárido-AMC.

FIG. 10: ilustra la actividad de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo A a diferentes pH. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de A-tetra, 0.05 μ g de enzima, y el tampón citrato de Na-NaPO₄ a pH variable entre 2.6-8.0. Las reacciones se incubaron durante 40 min a 26 °C, y se analizaron 3 μ l de las muestras por HPTLC. El Panel A describe el análisis por HPTLC, el Panel B describe la escisión del sustrato cuantificada mediante escaneo y graficada en función del pH.

FIG. 11: ilustra la influencia del sistema de tampón sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₂ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos A₂ lavados con 5-20 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en los tampones designados a 25 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 30 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 12: ilustra la influencia del pH usando tampón de glicina 250 mM sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 7.5 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 250 mM de pH 6.0-8.0, a 25 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 30 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 13: ilustra la influencia de la concentración del tampón de glicina sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 7.5 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 100-400 mM de pH 7.0, a 25 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 30 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 14: ilustra la influencia de la concentración de α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 5-50 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 250 mM de pH 7.0, a 25 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 30 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 15: ilustra la influencia de la concentración de células (hematocrito) sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 20 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 250 mM de pH 7.0 a concentraciones variables 20-90%, a 25 °C, y la conversión se evaluó a los 30 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 16: ilustra la influencia del tiempo de reacción sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 5-50 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 150 mM de pH 7.0, a 25 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 20, 40, 60 y 120 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

FIG. 17: ilustra la influencia de la temperatura sobre la conversión enzimática de células sanguíneas A₂ usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*. Se incubaron glóbulos rojos lavados con 1-10 mU/ml de α -N-acetilgalactosaminidasa en tampón de glicina 200 mM de pH 5.5 a 15 °C, 25 °C y 37 °C (suspensión celular al 30%), y la conversión se evaluó a los 20, 40 y 60 min mediante aglutinación con Orto anti-A.

Descripción detallada de la invención

Esta invención apunta al desarrollo y la aplicación de una estrategia de detección y selección de nuevas α -galactosidasas con especificidades preferenciales por las estructuras del grupo sanguíneo B y con el comportamiento preferido en la conversión enzimática de células sanguíneas a pH neutro. Aunque no es parte de la presente invención, la presente especificación también incluye la referencia a estructuras del grupo sanguíneo A. La tabla 1 presenta una lista de las estructuras complejas de los antígenos A y B encontradas en las células sanguíneas. No se han comunicado estudios cuantitativos de las propiedades cinéticas de las glucosidasas existentes con estas estructuras complejas. Esto se debe parcialmente a las dificultades para obtener esos compuestos a partir de fuentes naturales y parcialmente debido a la dificultad y a los esfuerzos que demandan mucho tiempo implicados en la síntesis química orgánica de dichos oligosacáridos complejos.

- Se sintetizaron derivados oligosacárido-AMC activos de los grupos sanguíneos A y B (estructuras 3, 6, 11, 25), y sus variantes H fueron o bien sintetizadas o bien producidas mediante eliminación enzimática de α Gal o α GalNAc de las estructuras anteriores. Además, se purificaron glucoesfingolípidos con estructuras 3, 6, 21 y 25 a partir de eritrocitos humanos o se produjeron a partir de ellos mediante tratamientos con glucosidasas como se describió previamente (Clausen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 1199-203, 1985, Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen et al., Biochemistry 25(22): 7075-85, 1986, Clausen et al., J Biol Chem. 262(29): 14228-34, 1987). Se desarrollaron ensayos de cromatografía en capa delgada para determinar cuantitativamente la eliminación de α Gal o α GalNAc de los derivados AMC o glucoesfingolípidos.
- Nuestro análisis inicial de las actividades específicas relativas de la α -galactosidasa recombinante del grano de café comparando las actividades con p-nitrofenil- α -galactósido y un sustrato hapteno tetrasacárido del grupo B (estructura 11 derivado-AMC) como representante de los antígenos del grupo sanguíneo B, reveló una llamativa diferencia de casi 2000 veces. Por lo tanto, la α -galactosidasa del grano de café tuvo una actividad específica de aproximadamente 30-40 U/mg a pH 6.5 con p-nitrofenil- α -galactósido, según se informó previamente (Zhu et al., Arch Biochem Biophys 324: 65-70, 1995), pero sólo de 17 mU/mg con el sustrato tetrasacárido del grupo B. Por consiguiente, esta enzima es relativamente ineficaz para destruir los antígenos del grupo B, y es probable que una enzima con preferencia por el tetrasacárido de B tenga una eficacia cinética mucho mayor con las estructuras del grupo B.
- Nuestro análisis inicial de las actividades específicas relativas de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo comparando las actividades con p-nitrofenil- α -N-acetilgalactosamina y un sustrato hapteno tetrasacárido del grupo A (estructura 3 derivado AMC) como representante de los antígenos del grupo sanguíneo A, reveló una llamativa diferencia de casi 100 veces. Por lo tanto, la α -N-acetilgalactosaminidasa según se informó previamente tiene una actividad específica de aproximadamente 50 U/mg a pH 3.65 con p-nitrofenil α -N-acetilgalactosamina (Zhu et al., Protein Exp and Purification 8: 456-462, 1996), pero sólo de 0.2 U/mg a pH 5. 5 (0.3 U/mg a pH 3.65) con el sustrato tetrasacárido del grupo A. Por consiguiente, esta enzima es relativamente muy ineficiente en la destrucción de antígenos del grupo A.
- Puesto que estas dos enzimas constituyen los últimos adelantos en la conversión enzimática de células sanguíneas, y o bien éstas han fracasado en convertir las células sanguíneas (grupo A) o no son prácticas debido a las cantidades de enzima requeridas (grupo B), además de que ambas enzimas sólo funcionan en la conversión de células sanguíneas a pH ácido, es claro que se necesitan mejores propiedades cinéticas de las enzimas para usar en la conversión sanguínea, y que una estrategia probable para la identificación inicial es analizar la relación de las actividades con los sustratos p-nitrofenilo y complejos de A/B. Las enzimas con actividades preferenciales o exclusivas por los sustratos complejos de los grupos A o B es probable que actúen más eficazmente en la conversión de células sanguíneas.
- Las dificultades del pasado en la conversión de células sanguíneas del grupo A se debieron principalmente a la incapacidad para convertir el subgrupo fuerte A₁. Según se describió antes el subgrupo A₁ tiene más antígenos A que los otros subgrupos, pero también contiene una estructura A repetida en forma de glucoesfingolípidos (Tabla 1, estructura 6). A₂ y los subgrupos más débiles posibles también contienen una serie extendida A de glucoesfingolípidos designados H-A y Gal-A (Tabla 1, estructuras 21 y 25), pero éstos no reaccionan con los anticuerpos anti-A como describieron originalmente Clausen et al., (Clausen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 1199-203, 1985, Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen et al., Biochemistry 25(22): 7075-85, 1986, Clausen et al., J Biol Chem. 262 (29): 14228-34, 1987). Esto se confirmó además por los hallazgos de que células sanguíneas del subgrupo A₂ tratadas exhaustivamente con α -N- acetilgalactosaminidasa fueron tipificadas como O con reactivos de determinación del grupo sanguíneo como los descritos antes. La dificultad para convertir el subgrupo A₁ en comparación con el subgrupo A₂ puede deberse por consiguiente a la diferencia cuantitativa en la cantidad de antígenos A, la presencia de glucoesfingolípidos A repetitivos sólo en células sanguíneas A₁, o a una combinación de ambas. Un importante parámetro de las α -N-acetilgalactosaminidasas preferidas para usar en la conversión del grupo A es la capacidad para escindir eficazmente el residuo α GalNAc terminal en los glucoesfingolípidos A repetitivos. El análisis de la eficacia de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo reveló actividades específicas equiparables (aproximadamente 0.3 U/mg) con el derivado tetrasacárido-AMC tipo 2 de A (estructura 3) y el derivado-AMC repetitivo tipo 3 de A (estructura 6). De esto se puede concluir que el fracaso de la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo en la conversión de todas las células sanguíneas del grupo A no se debe a las estructuras A₁ únicas. Por otra parte, estos datos pueden indicar que los tetrasacáridos de A contienen suficiente estructura de los antígenos del grupo A (y B) para ser utilizados en la determinación de las propiedades cinéticas y las especificidades de las α -N-acetilgalactosaminidasas, así como para predecir su comportamiento en la conversión de células sanguíneas.
- Las α -N-acetilgalactosaminidasas y las α -galactosidasas preferidas tienen un pH óptimo neutro y se pueden producir de manera redituable como proteínas recombinantes en organismos unicelulares como bacterias y levaduras. El presente ejercicio desarrolló un ensayo de detección de actividades enzimáticas usando sustratos derivados tetrasacárido-AMC de A y B y midiendo actividades a pH neutro. Además, las actividades se compararon con actividades usando derivados p-nitrofenil-monosacárido para identificar actividades con preferencia o exclusividad por los sustratos complejos. La aplicación de este ensayo de detección en un gran grupo de aislados de hongos y bacterias (3100) identificó varios aislados bacterianos que expresan actividades de α -N-acetilgalactosaminidasa o α -galactosidasa medidas con sustratos tetrasacárido-AMC de A o B, pero no niveles de actividad o niveles de actividad insignificantes con los sustratos p-

- nitrofenil-monosacárido correspondientes. Una de cada una de las actividades se analizó posteriormente después de haber determinado serológicamente y genotípicamente éstas como cepas de *Streptomyces*. El análisis de la cepa N° 8 que se determinó que expresaba actividad de α -N-acetilgalactosaminidasa reveló que la actividad era insoluble y estaba asociada con la masa celular. La cepa N° 8 se depositó el 14 febrero de 2002 en la American Type Culture Collection (ATCC) y se le asignó el N° de depósito ATCC PTA-4076. Por contraposición, la cepa N° 2357 que se determinó que expresaba actividad de α -galactosidasa reveló que la actividad era soluble y se encontró en el sobrenadante de una prensa francesa. La cepa N° 2357 se depositó el 14 febrero de 2002 en la American Type Culture Collection y se le asignó el N° de depósito ATCC PTA-4077. Debido a que es considerablemente más simple purificar una proteína soluble, elegimos purificar y secuenciar inicialmente la proteína enzimática de N° 2357. La actividad de N° 2357 se purificó hasta una actividad específica de más de 10 U/mg con el sustrato tetrasacárido de B, en tanto no se pudo detectar ninguna actividad con p-nitrofenil- α -galactósido. El análisis SDS-PAGE de la preparación resultante reveló 3-4 bandas de proteína en la región de 40-80 kD. El análisis de filtración en gel de la preparación mostró una actividad migratoria equiparable a la de BSA lo que indica un peso molecular de 40-80 kD. Se obtuvo una única secuencia corta:
- Phe-Ala-Asn-Gly-Leu-Leu-Leu-Thr SEC. ID N°: 1.
- El análisis detallado de la especificidad de sustrato de la actividad de α -galactosidasa parcialmente purificada demostró una especificidad fina sin precedentes por la estructura ramificada del grupo sanguíneo B, y no se escindió ninguna estructura lineal cubierta por residuos de α 1-3 o α 1-4 galactosa. El análisis del pH óptimo demostró que éste era de 5.5 a 7.0. Por consiguiente se prefiere mucho la actividad de α -galactosidasa identificada, frente a las enzimas del estado anterior de la técnica, con respecto a la especificidad de sustrato restringida, la actividad altamente específica por estructuras del grupo B y el pH óptimo.
- Los análisis preliminares de la actividad de α -N-acetilgalactosaminidasa de N° 8 revelaron propiedades similares, pero también se escindieron estructuras lineales. Debido a las dificultades en la purificación no fue posible evaluar la actividad específica de esta enzima, pero incluso preparaciones parcialmente purificadas a 0.1 U/mg, no demostraron actividad detectable con el derivado p-nitrofenil-monosacárido.
- El hallazgo de que dos actividades identificadas y parcialmente caracterizadas eran similares en naturaleza y totalmente diferentes de cualquier otra actividad de α -galactosidasa y α -N-acetilgalactosaminidasa previamente informada, sugirió contundentemente que se había identificado una única nueva familia de glucosidasas homólogas mediante la estrategia de detección empleada.
- A continuación nos embarcamos en ensayar todas las α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas comerciales usando nuestro ensayo de selección para determinar si había disponibles enzimas con la especificidad preferida. Se identificó una α -N-acetilgalactosaminidasa (NEB α -N-acetilgalactosaminidasa) que presentaba una elevada especificidad de sustrato relativa por los derivados tetra y heptasacárido-AMC de A en comparación con los derivados del monosacárido α GalNAc simple. El proveedor de esta enzima (New England BioLabs Inc, catalog no. P0734B) manifiesta que deriva de una cepa patentada y expresada en *E. coli*, y su especificidad de sustrato se describe como catalizadora de la hidrólisis de los enlaces α -GalNAc terminales de los oligosacáridos. Específicamente, se manifiesta en el material suministrado con la enzima, que la especificidad de sustrato incluye p-nitrofenil- α -D-N-acetilgalactosaminopiranosido (p-nitrofenil- α -GalNAc) y un sustrato tetrasacárido-AMC de A (estructuras 3-8). No hemos encontrado información adicional en la bibliografía científica ni en ninguna otra parte con respecto a esta enzima. El análisis de las propiedades cinéticas de esta enzima con nuestro grupo de sustratos reveló que la enzima tiene una actividad específica de aproximadamente 0.25 U/mg con el sustrato tetrasacárido-AMC de A, y menos de 2.5 U/mg con p-nitrofenil- α GalNAc. Además, la enzima tiene un pH óptimo amplio de 6.0-8.0. A pesar de que esta enzima sólo presenta una especificidad de sustrato moderadamente preferencial por el sustrato tetrasacárido-AMC de A y la actividad específica con este sustrato es relativamente baja, esta enzima tiene parcialmente las propiedades propuestas de una enzima óptima para ser utilizada en las conversiones de células sanguíneas y se puede expresar en bacterias.
- Según se describió antes la α -galactosidasa de *Streptomyces* identificada, tiene una actividad específica con el sustrato tetrasacárido de B que excede las 10 U/mg y funciona a velocidad máxima a pH neutro. Sin embargo, la enzima no estuvo disponible en las cantidades y la pureza requeridas para la evaluación de su comportamiento en la conversión de células sanguíneas. Similarmente, tampoco se dispuso de la α -N-acetilgalactosaminidasa de *Streptomyces*. Puesto que la NEB α -N-acetilgalactosaminidasa tiene las mismas características identificatorias que las dos actividades identificadas de *Streptomyces*, aunque la actividad específica es sólo de aproximadamente 0.25 U/mg con el sustrato tetrasacárido de A, la disponibilidad de ésta en forma recombinante pura permitió la evaluación de esta nueva clase de glucosidasas en la conversión de células sanguíneas.
- Por consiguiente analizamos el comportamiento de la NEB α -N-acetilgalactosaminidasa en la conversión de células sanguíneas del grupo A, para confirmar que las propiedades preferidas propuestas de α -N-acetilgalactosaminidasas utilizadas en la estrategia de detección y selección precedente, realmente seleccionaban enzimas con características mejoradas en la conversión enzimática de glóbulos rojos. La NEB α -N-acetilgalactosaminidasa mostró una eficacia destacable en la conversión de células sanguíneas tanto A₁ como A₂ a pH neutro. Utilizando un hematocrito fijo de 30% en las reacciones enzimáticas, se analizaron una serie de parámetros del proceso de conversión. El sistema de tampón

preferible es glicina 200-300 mM a un pH de 6.5 a 7.5. Se pueden agregar varios aditivos a éste incluidos, pero no exclusivamente, NaCl 1-5 mM, CaCl₂ 1-5 mM, citrato amortiguado con fosfato 1-10 mM, citrato trisódico 0.25 mM y polietilenglicol (PEG) de 0.1 a 10%, de peso molecular variable entre 300 y 10 000. Aproximadamente 5 mU/ml de NEB α -N-acetilgalactosaminidasa convirtieron células sanguíneas A₂ y aproximadamente 20 mU/ml convirtieron células sanguíneas A₁ en 60 minutos (30% de hematocrito) en células tipificadas como O con los reactivos y procedimientos de rutina de un banco de sangre. El uso de una mayor cantidad de enzima produjo una disminución en el tiempo requerido para la conversión. Las células convertidas reaccionaron con reactivos anti-H como células sanguíneas O y el análisis de los parámetros físicos de las células sanguíneas convertidas no reveló cambios de las células sanguíneas sin tratar (metahemoglobina, 2,3DPG, ATP y fragilidad osmótica). A nuestro leal saber y entender, este es el primer ejemplo de conversión enzimática de células sanguíneas intactas del grupo A₁ en células sanguíneas tipificadas como O.

La cantidad de α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* requerida para la conversión de células sanguíneas del grupo A (5-20 mU/ml) es equivalente a 20-80 μ g/ml de proteína enzimática. Esto es una mejora considerable respecto a las cantidades de α -N-acetilgalactosaminidasa utilizada en el estado anterior de la técnica para convertir células sanguíneas A₂ (3 mg/ml). También es una mejora en comparación con las cantidades de α -galactosidasa utilizadas para convertir células sanguíneas B, ya sea la α -galactosidasa del grano de café (6 mg/ml a un hematocrito de 80%) o la α -galactosidasa de soja (50 μ g/ml a un hematocrito de 16%). Además, las conversiones con NEB α -N-acetilgalactosaminidasa se realizaron a pH neutro, mientras que todas las otras conversiones en el pasado se realizaron a pH ácido de 4.5-5.8.

El comportamiento de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* confirma claramente, por consiguiente, que las propiedades de esta nueva clase propuesta de exoglucosidasas, definida por los criterios establecidos antes, mejoró el comportamiento en la conversión de células sanguíneas de los grupos A y B. Además, la identificación y caracterización de la α -galactosidasa de *Streptomyces* con una actividad específica más de 40 veces mayor por el sustrato tetrasacárido del grupo sanguíneo B en comparación con la actividad específica de la NEB α -N-acetilgalactosaminidasa por el tetrasacárido del grupo A, indica que la enzima del *Streptomyces* puede requerir más de 40 veces menos proteína en las conversiones, es decir, 0.5-2 μ g/ml a un hematocrito de 30% en las reacciones. La conversión de una unidad de células sanguíneas empacadas (aproximadamente 220 ml) requeriría por lo tanto menos de 0.35-1.4 mg/unidad. Con las tecnologías actuales de expresión en bacterias, hongos y levaduras es posible producir enzimas recombinantes a un costo de 5-10 US\$/mg. Por consiguiente es evidente que la conversión enzimática de células sanguíneas requiere enzimas con las características y el comportamiento de las proporcionadas por esta invención.

Las cepas 8 y 2357 fueron depositadas ambas el 14 febrero de 2002 en la American Type Culture Collection y se les asignaron los N° de depósito ATCC PTA-4076 y PTA-4077, respectivamente. Estos depósitos en la ATCC se hicieron bajo los términos del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes. Los solicitantes reconocen su obligación de reemplazar el depósito si el depositario fuera incapaz de proporcionar una muestra cuando se le solicite debido a la condición del depósito antes de que finalice el plazo de vigencia de una patente otorgada acerca de esto. Los solicitantes también reconocen su responsabilidad de notificar a la ATCC de la emisión de dicha patente, momento en el cual el depósito estará disponible al público.

Antes de ese momento, el depósito estará disponible para el comisario de patentes bajo los términos de 37 C. F. R. § 1.14 y 35 U.S.C. § 112.

Ejemplos

Métodos generales utilizados:

Varias estructuras de oligosacáridos complejos del grupo sanguíneo ABH como derivados 7-amino-4-metil-cumarina fueron sintetizadas de manera personalizada por Alberta Chemical Research Council según se lista en las tablas II, III y IV. Otras estructuras se obtuvieron de distintos proveedores (Sigma, CalbioChem, New England Biolabs). Las enzimas se prepararon según se informó previamente (Zhu et al., Protein Expr Purif. 8(4): 456-62, 1996, Zhu et al., Arch Biochem Biophys. 324(1): 65-70, 1995), o se adquirieron a los proveedores según se indica. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad técnica o superior. Los ensayos enzimáticos estándar se realizaron de la manera siguiente con las diferentes glucosidasas:

α -galactosidasa recombinante del grano de café expresada en *P. pastoris*:

Los ensayos con derivados p-nitrofenil-monosacárido se realizaron por dos procedimientos:

- i) Se incubaron 1.25 μ mol de sustrato en mezclas de reacción de un volumen total de 0.5 ml que contenían citrato de sodio 50 mM y fosfato de sodio 20 mM (pH 5.5) a 26 °C durante 10 min. Las reacciones se detuvieron agregando un volumen igual de tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 9.8). La cantidad de p-nitrofenol liberado

se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm en comparación con una curva estándar de p-nitrofenol (0.01-0.15 μ mol);

- 5 ii) Se incubaron 1.25 μ mol de sustrato en mezclas de reacción de un volumen total de 0.5 ml que contenían citrato de sodio 50 mM y fosfato de sodio 20 mM (pH 5.5) a 26 °C. Se tomaron alícuotas de 5 μ l en diferentes momentos (0', 5', 15', 30', 60') para seguir el desarrollo del producto. El desarrollo del producto se analizó por cromatografía en capa delgada de alto rendimiento (HPTLC) en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8) y se visualizó mediante tinción con orcinol.

10 Los ensayos con sustratos oligosacáridos derivatizados (AMC, OGr) se realizaron mediante el procedimiento siguiente:

- 15 iii) Se incubaron 1 nmol de sustrato (AMC) o 5 nmol de (OGr) en mezclas de reacción de un volumen total de 10 μ l que contenían citrato de sodio 50 mM (pH 6.0) a 26 °C. Se tomaron alícuotas de 2.5-3.0 μ l en diferentes momentos (0', 15', 30', 60') para seguir el desarrollo del producto. El desarrollo del producto se analizó por HPTLC en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8) y se visualizó mediante luz UV o tinción con orcinol.

Los ensayos con sustratos oligosacáridos libres se realizaron mediante el procedimiento siguiente:

- 20 iv) Se incubaron 5 nmol del sustrato en un volumen de reacción de 10 μ l que contenía citrato de sodio 50 mM (pH 6.0) a 26 °C o 30 °C durante 30-180 min. El desarrollo del producto se analizó por HPTLC en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 30/60/10) y se visualizó mediante tinción con orcinol.

Los ensayos para determinar la K_m para los sustratos se modificaron de la manera siguiente:

- 25 v) La concentración del sustrato α Gal-p-nitrofenilo se varió de 5.0 mM a 0.04 mM (5 pmol/10 μ l) usando 0.1-0.5 μ g de enzima.

α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo expresada en *P. pastoris*:

30 Los ensayos con derivados p-nitrofenil-monosacárido se realizarán por dos procedimientos:

- 35 vi) Se incubaron 1.25 μ mol del monosacárido α GalNAc-p-nitrofenilo en un tubo que contenía citrato de sodio 50 mM y fosfato de sodio 20 mM a pH 2.8, a 37 °C durante 60 min. Se tomaron alícuotas de 5.0 μ l en diferentes momentos (0', 15', 30', 60') para seguir la cinética del desarrollo del producto. El desarrollo del producto se analizó por cromatografía en capa delgada de alto rendimiento (HPTLC) en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8) se tiñó con p-anisaldehído y se visualizó con luz UV.

α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante comercial (New England Biolabs):

- 40 vii) Una concentración inicial 0.5 mM del derivado del monosacárido α GalNAc-p-nitrofenilo en un tubo que contenía tampón de fosfato de sodio 0.05 M de pH 7.0 se diluyó secuencialmente 2 veces mezclándolo con un volumen igual de tampón. Se agregó 0.5 μ g de la enzima a cada tubo y se incubó durante 10 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante agregado de un volumen igual de tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 9.8). La cantidad de p-nitrofenol liberado se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm.

45 Ejemplo 1: Caracterización de las especificidades de sustrato finas de α -N-acetilgalactosaminidasas y α -galactosidasas utilizadas previamente en la conversión de células sanguíneas A/B

50 Para eliminar las actividades antigénicas B y A de los glóbulos rojos, las exoglucosidasas más eficaces utilizadas en el pasado fueron la α -galactosidasa del grano de café y la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo, respectivamente. Estas enzimas fueron estudiadas exhaustivamente y sus características y comportamiento en la conversión de glóbulos rojos se describió en la bibliografía y en las solicitudes de patente a las que se hace referencia precedentemente.

55 (i) Actividad específica con diferentes sustratos (U/mg).

60 La tabla II presenta una lista de actividades específicas comunicadas de estas enzimas con derivados p-nitrofenil-monosacárido. Una unidad se define como la actividad que convierte un micromol de sustrato en un minuto en las condiciones de ensayo óptimas definidas. Los ensayos con sustratos p-nitrofenilo se evaluaron a la velocidad inicial con menos de 10% de los sustratos utilizados.

Tabla II: Actividades específicas de α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas con derivados de monosacáridos.

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -galactosidasa recombinante del grano de café pH 6.5	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo pH 3.65	α -galactosidasa de soja pH 6.5
Gal α 1-pNP	-	32 U/mg ¹	-	295.6 U/mg ²
GalNAc α 1-pNP	-	-	50 U/mg ³	-

¹Zhu et al., (1995) Arch Biochem Biophys 324: 65-70, ²Davis et al., (1996) Biochem Mol Biol Int 39: 471-85, ³Zhu et al., (1996) Protein Exp and Purification 8: 456-462.

En los presentes ejemplos, se obtuvieron resultados similares para la α -galactosidasa recombinante purificada del grano de café y la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo. No se ha comunicado información de las actividades específicas con sustratos oligosacáridos que se asemejen a los antígenos A y B. Esto es probablemente debido a la limitada disponibilidad de dichos compuestos. En los presentes ejemplos, se sintetizaron estructuras complejas de A y B y se predijo que el análisis de los parámetros cinéticos de las enzimas con sustratos que imitan los antígenos que se encuentran en los glóbulos rojos, ayudaría a definir los criterios para seleccionar nuevas enzimas con mejores propiedades para la conversión de glóbulos rojos.

Como se muestra en la tabla III el análisis de las actividades específicas de las dos enzimas con los derivados tetrasacárido-AMC fueron dramáticamente inferiores que las actividades obtenidas con los derivados p-nitrofenil-monosacárido.

Tabla III: Actividades específicas de α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas con derivados de oligosacáridos activos del grupo sanguíneo¹.

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -galactosidasa recombinante del grano de café	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo	
		pH 5.5	pH 3.65	pH 5.5
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-GlcNAc-AMC	B	0.017 U/mg	-	-
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	A	-	0.5 U/mg	0.4 U/mg
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	A	-	0.5 U/mg	0.4 U/mg

¹ Las actividades específicas se determinaron según se describe en los ejemplos usando ensayos con aproximadamente 50% y 100% de conversión final de los sustratos evaluados a tres tiempos (20, 40 y 60 min).

La actividad específica de la α -galactosidasa recombinante del grano de café expresada en levadura y purificada hasta homogeneidad mostró 32 U/mg con Gal α 1-pNP (a pH óptimo de 6.5). Sin embargo, la actividad específica de la α -galactosidasa recombinante del grano de café fue sólo de 17 mU/mg (aproximadamente 2000 veces menos) cuando se midió con un sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B al pH óptimo utilizado para la conversión enzimática de glóbulos rojos con esta enzima (pH 5.5) (Tabla III).

De manera similar, las α -N-acetilgalactosaminidasas recombinantes de hígado de pollo revelaron una fuerte preferencia por estructuras que no fueran del grupo sanguíneo A donde la actividad más alta se midió con el sustrato que no es natural GalNAc α 1-pNP. La actividad específica de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de pollo expresada en levadura y purificada hasta homogeneidad, mostró aproximadamente 50 U/mg con GalNAc α 1-pNP al pH óptimo de 3.65 (Tabla II), mientras que sólo se midió 0.3 U/mg (166 veces menos) con un sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo A a pH 3.65 (Tabla III). La actividad específica a pH 5.5 fue inferior a solo 0.2 U/mg.

Se encontraron resultados similares para las α -N-acetilgalactosaminidasas de *Acremonium sp.*, y *Patella vulgata* (que no se muestran).

(ii) K_m para diferentes sustratos.

Las constantes informadas K_m y V_{max} de Michaelis-Menten (determinadas de gráficos Lineweaver-Burk) de la α -galactosidasa del grano de café y la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo con diferentes sustratos se muestran en la tabla IV.

5 Tabla IV: K_m y V_{max} aparentes de α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas con derivados de monosacáridos.

Estructura del sustrato (derivado)	α -galactosidasa recombinante del grano de café pH 5.5, 26 °C		α -galactosidasa de soja pH 5.6, 26 °C		α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo pH 3.65, 37 °C	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Gal α 1-pNP GalNAc α 1-pNP	363 μ M ¹ -	46.9 U/mg ¹ -	n.d. ² -	n.d. ² -	- 827 μ M ³	- 60.9 U/mg ³

¹ Zhu et al., (1995) Arch Biochem Biophys 324: 65-70), ²Vosnidou et al., Biochem Mol Biol Int 46(1): 175-186, 1998, ³ Zhu et al., (1996) Protein Exp and Purification 8: 456-462. Designación: n.d., no se determinó.

10 En la presente invención se obtuvieron resultados similares de K_m para la α -galactosidasa recombinante del grano de café purificada y la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo. Estos valores de K_m son relativamente altos y enzimas con K_m 10 a 100 veces menores constituirían candidatas preferidas para la conversión de glóbulos rojos puesto que se prevé que la eliminación casi completa de los antígenos sea importante.

15 Por lo tanto, las K_m elevadas observadas en estas enzimas con todos los sustratos parecen representar otra razón para el mal comportamiento de esas enzimas en la conversión de glóbulos rojos.

20 Se informó que una α -N-acetilgalactosaminidasa aislada hasta aparente homogeneidad de *R. torques* tenía una actividad específica de 50 U/mg con GalNAc α -pNP y una K_m de 2-8 mM (Hoskins et al., J Biol Chem. 272(12): 7932-9, 1997). A pesar de que esta enzima parece tener un pH óptimo neutro los estudios hasta el momento no han podido demostrar una conversión enzimática eficaz de células sanguíneas del grupo A (Hoskins et al., Transfusion. 41(7): 908-16, 2001). Es probable que el mal comportamiento de esta enzima esté vinculado a la K_m extremadamente alta.

(iii) pH óptimo para diferentes sustratos.

25 Se informó que el pH óptimo para las α -galactosidasas del grano de café y de soja es amplio e incluye el pH neutro. Se realizaron ensayos para medir el pH óptimo con el derivado p-nitrofenilo artificial del monosacárido α -Gal simple. No obstante, ninguna de esas enzimas llevó a cabo conversiones de células sanguíneas a pH neutro y sólo se obtuvieron conversiones exitosas a pH de 5.5 a 6.4 (véase discusión precedentemente). Para proporcionar un entendimiento profundo de este fenómeno, analizamos el pH óptimo de la enzima del grano de café con la p-nitrofenil-galactosa y los sustratos oligosacáridos tetrasacárido de B y el pentasacárido de Galili. Como se muestra en la FIG. 1, el pH óptimo con el sustrato monosacárido simple fue amplio, según se informó previamente, con actividad máxima a 6.4. En contraposición, el pH óptimo con el sustrato tetrasacárido de B fue ácido con máximo entre 3.5 y 5.0 como se muestra en la FIG. 2. Además, se encontró un pH óptimo bajo similar para la escisión del oligosacárido de Galili como se muestra en la FIG. 3.

35 Se informó que el pH óptimo de la enzima del grano de café con melibiosa, rafinosa y estaquiosa era bajo (entre 3.6-4) (Zhu et al., (1995) Arch Biochem Biophys 324: 65-70, Courtois y Petek (1966) Methods Enzymol 3: 565-571). Esto está de acuerdo con nuestros hallazgos para los oligosacáridos de B y de Galili, y sugiere que la enzima tiene generalmente un pH óptimo bajo con disacáridos y oligosacáridos naturales.

40 Es probable que el pH óptimo de la enzima con el sustrato p-nitrofenilo sea artificial y esté vinculado a las propiedades físicas del aglucano en vez de reflejar las propiedades de la enzima con los sustratos naturales. Los datos presentados en este documento pueden por consiguiente proporcionar una explicación para la incapacidad de esta enzima para realizar una conversión de glóbulos rojos a pH neutro.

45 Se informó que la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo tenía un pH óptimo de 3.65 usando GalNAc α -pNP según se describió antes. El análisis de la influencia del pH sobre la actividad de esta enzima con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo A estuvo de acuerdo con los datos informados y mostró un pH óptimo de 3.5-4.5 (que no se muestra).

50 Según se describió antes las enzimas α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo y la α -galactosidasa del grano de café integran una gran familia de genes de glucosidasa homólogos que incluyen las enzimas lisosómicas humanas. Las enzimas lisosómicas generalmente actúan a pH ácido y se ha informado que todas ellas tienen un pH óptimo ácido. Por lo tanto es probable que otras enzimas homólogas con similitudes de secuencia con este grupo, compartan este rasgo

característico de un pH óptimo ácido. Por consiguiente elegimos detectar nuevas fuentes de actividades de α -N-acetilgalactosaminidasa y α -galactosidasa utilizando los sustratos adecuados y pH neutro.

Ejemplo 2: Identificación de α -N-acetilgalactosaminidasas y α -galactosidasas con especificidad de sustrato altamente preferencial o exclusiva por las estructuras del grupo sanguíneo A y/o del grupo sanguíneo B, a pH neutro.

Para identificar las posibles enzimas con especificidad preferencial y/o exclusiva por las estructuras de los grupos sanguíneos A y B, se analizó un gran grupo de aislados fúngicos y bacterianos. Se desarrolló un protocolo para la detección inicial con los derivados tetrasacárido-AMC así como con los derivados Gal/GalNAc α -pNP de los grupos sanguíneos A/B. En resumen, se inocularon caldos de cultivo conservados en congelador en cultivos inclinados de YM (tamaño del tubo 1.8 x 18 cm), se incubaron a 27 °C durante 8 días, y se recogieron los cultivos (esporas) lavando por arrastre con 5 ml de cryogen (10% de glicerol + 5% de lactosa), seguido de maceración (haciendo girar con fuerza perlas de vidrio en el tubo con tapa de rosca, 1.3 x 13 cm). Un ml de los cultivos inclinados se inoculó en el medio específico adecuado para fermentación aeróbica (25 °C para cultivo de hongos y 28 °C para cultivo de actinomicete) durante 72-96 horas. Se maceraron muestras de 2.5 ml de cada cultivo crecido en un tubo con tapa de rosca (1.3 x 13 cm) que contenía aproximadamente 8-10 perlas de vidrio (tamaño = 3 mm de diámetro) colocándolas en un equipo de tipo vortex durante 15 minutos, después de lo cual el pH se ajustó a 6.5 con tampón de citrato y los cultivos macerados se congelaron en tubos a -20 °C. Se descongelaron los cultivos congelados y se volvieron a macerar de la misma manera y se centrifugaron a 2100 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes sirvieron como fuente de enzimas para el ensayo inicial. Se analizaron muestras de 10 μ l de la manera siguiente:

Ensayos con sustratos tetrasacárido-AMC del grupo A o B:

Se incubaron a 30 °C mezclas de reacción de 10 μ l que contenían citrato de sodio 50 mM (pH 6.5), 0.25 nmol de sustrato oligosacárido-AMC y 10 μ l de fuente de enzima según se describió antes, y el desarrollo del producto se controló diferentes intervalos de tiempo (20 min a 48 horas) por HPTLC.

Ensayos con sustratos p-nitrofenil-monosacárido:

Se incubaron a 30 °C mezclas de reacción de 20 μ l que contenían citrato de sodio 50 mM (pH 6.5), sustrato monosacárido-pNP 2-5 mM y 10 μ l de fuente de enzima según se describió antes, y el desarrollo del producto se controló a diferentes intervalos de tiempo (20 min a 24 horas) mediante DO a 405 nm o HPTLC.

Detección de actividades de α -galactosidasa:

Se ensayaron un total de 2400 aislados y se identificaron cinco cepas con actividades significativas con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo B. Esas cepas se seleccionaron para una fermentación a escala pequeña, que se procesó con una prensa francesa, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y separación en Q-sefarosa. El análisis posterior de los picos de actividad combinados encontrados en las fracciones de Q-sefarosa reveló actividades específicas con los dos sustratos según se indica en la (Tabla VI).

Tabla VI: Especificidad de sustrato de las cinco actividades identificadas de α -galactosidasa de *Streptomyces*.

Fuente de enzima (cepa)	Actividades específicas de las fracciones pico ¹ en Q-sefarosa U/mg	
	Gal α 1-pNP	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc-AMC
Cepa N° 2075	<0.02	0.004
Cepa N° 2110	<0.03	0.0007
Cepa N° 2260	0.0009	< 0.00003
Cepa N° 2357	n.d.	0.075
Cepa N° 2371	<0.005	0.0001

¹ El análisis de las actividades específicas se determinó en fracciones activas combinadas de la cromatografía en Q-sefarosa. La purificación se hizo a partir de 60 ml de caldo con inhibidores de proteasa (PMSF, leupeptina, pepstaina, EDTA) sometidos a prensa francesa a 10 000 psi. Esta preparación se centrifugó a 13 000 x g durante 30 minutos, y el sobrenadante se fraccionó por precipitación con sulfato de amonio al 15% y 50%. El sedimento al 15-50% se disolvió en Tris 20 mM (pH 7.5), y se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m. El filtrado clarificado se cargó en una columna de 5 ml Pharmacia Hi-trap Q y las proteínas se eluyeron con un gradiente de NaCl de 0-0.15 M. Designación: n.d., no se determinó.

El análisis por HPTLC con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo B de las cinco cepas candidatas se muestra en la FIG. 4. Las actividades de las cinco cepas escindieron el sustrato tetrasacárido-AMC de B en diversos grados hasta un

producto que migraba como trisacárido-AMC de H así como en algunos casos a un derivado disacárido-AMC. El último se debe a actividad de α -fucosidasa contaminante.

Las cepas 2075 y 2357 expresaron las actividades más altas con el sustrato tetrasacárido de B. Las actividades con el sustrato α Gal-p-nitrofenilo no se correlacionaron con las actividades con el sustrato tetrasacárido de B. Durante la purificación, se confirmó además que las dos actividades se podían separar lo que indica que derivan de proteínas diferentes. Sólo la cepa 2357 careció completamente de actividad con el sustrato α Gal- p-nitrofenilo, lo que hizo más simple el análisis posterior y esta actividad se eligió para la purificación y caracterización posterior. Se realizó una fermentación a escala pequeña de N° 2357 y se encontró la actividad de la enzima en la fracción soluble después de pasar por la prensa francesa (véase la leyenda de la Tabla VI).

La tipificación serológica de la cepa N° 2357 fue realizada mediante morfología de la colonia por Accugenix, Newark, DE, confirmando como un actinomicete. La tipificación genotípica mediante repeticiones cortas en tándem de 500 pares de bases colocaron la cepa N° 2357 en el género de *Streptomyces griseoplanus* con 1.60% de diferencia.

Detección de actividades de α -N- acetilgalactosaminidasa:

Se identificaron un total de cuatro cepas con actividades significativas con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo A (Tabla IV).

Tabla VIII: Especificidad de sustrato de las cuatro actividades identificadas de α -N-acetilgalactosaminidasa de *Streptomyces*.

Fuente de enzima (cepa)	Actividades específicas de las fracciones pico ¹ en Q-sefariosa U/mg		
	GalNAc α 1-pNP	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2) Gal β 1-3GalNAc-AMC	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α 1-(Fuc α 1-2)Gal β -4GlcNAc-AMC
Cepa N° 8	n.d.	0.0037	0.0037
Cepa N° 1488	<0.00005	0.016	0.016
Cepa N° 1647	n.d.	0.0055	0.0055
Cepa N° 2233	<0.00005	0.00028	0.00028
¹ Purificación y ensayo según se describió en la leyenda de la tabla VI.			

El análisis por HPTLC con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo A de las cuatro cepas candidatas se muestra en la FIG. 5b.

Todas las cepas identificadas con actividades significativas con el sustrato tetrasacárido de A no mostraron niveles detectables o mostraron niveles apenas detectables de actividades con el derivado p-nitrofenilo.

Las cepas 8, 1488 y 1647 expresaron las actividades más altas con el sustrato tetrasacárido de A, pero sólo en N° 8 la actividad fue estable y se pudo recuperar para caracterización posterior. Este aislado se eligió para análisis posterior. Se realizó una pequeña fermentación y se encontró que la actividad de la enzima era insoluble y estaba asociada con la fracción comprimida después de pasar por la prensa francesa.

La tipificación serológica de la cepa N° 8 fue realizada mediante morfología de la colonia por Accugenix, Newark, DE, confirmando como un actinomicete. La tipificación genotípica mediante repeticiones cortas en tándem de 500 pares de bases colocaron la cepa N° 8 en el género de *Streptomyces chattanoogensis* con 0.00% de diferencia.

Los datos anteriores demostraron que la bacteria contiene las exoglucosidasas α -galactosidasa y α -N-acetilgalactosaminidasa con especificidades de sustrato únicas por los residuos inmunodominantes α GalNAc o α Gal de los antígenos complejos de los grupos sanguíneos A y B. Dichas enzimas se proponen como preferidas para usar en las conversiones enzimáticas de células sanguíneas debido a sus especificidades altamente preferenciales o exclusivas por el sustrato que se encuentra en los glóbulos rojos.

Ejemplo 3: Aislamiento y caracterización de una nueva α -galactosidasa identificada de la cepa N° 2357 de *Streptomyces*, que tiene especificidad de sustrato exclusiva por los antígenos ramificados del grupo sanguíneo B y con una elevada actividad específica sin precedentes con dichos sustratos.

Se procesó un cultivo de fermentación de 20 litros por el método de la prensa francesa. Se determinó que la principal actividad de α -galactosidasa estaba presente en el sobrenadante después de la centrifugación a 10 000 x g. El sobrenadante se fraccionó por precipitación con sulfato de amonio y se encontró aproximadamente 70% de actividad en

la fracción de 20-60%. El precipitado del corte 20-60% se disolvió en Tris 20 mM (pH 7.5) y se clarificó por centrifugación. El sobrenadante se fraccionó secuencialmente por cromatografía en Q-sefarosa (tampón Tris 20 mM, pH 7.5, con un gradiente de NaCl de 0-1.5 M), S-sefarosa (tampón de NaOAc 20 mM, pH 5.3, con un gradiente de NaCl 0-1.0 M), y por cromatografía de filtración en gel S12 (tampón de NaOAc 20 mM, pH 5.3, con NaCl 0.5 M o NaPO₄ 20 mM, pH 6.5, con NaCl 0.5 M). La actividad enzimática con el sustrato tetrasacárido-AMC de B se controló en las fracciones recogidas durante todo este esquema de purificación. Se confirmó la falta de actividad con el Gal α -pNP en todos los pasos de separación. Se recuperó la actividad enzimática purificada final en las fracciones eluyentes de la cromatografía con S12 correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 70000 similar a la elución de la albúmina de suero bovino corrida como un estándar (FIG. 6, panel A). El análisis SDS-NuPAGE de las fracciones de la cromatografía con S12 reveló bandas múltiples en las fracciones que contenían actividad de α -galactosidasa, pero la fracción con la actividad máxima sólo contenía unas pocas bandas que migraban en la región de 40-80 kD (FIG. 6, panel B).

La actividad específica del pico enzimático combinado de los últimos pasos de la cromatografía con S12 fue de aproximadamente 10 U/mg (proteína determinada con tinción con plata de SDS-NuPAGE y comparando la banda de proteína deseada con la cantidad de proteína en las bandas de proteína en el marcador de peso molecular). Comparando la elución de actividad con la de la albúmina de suero bovino reveló que la actividad eluía después de BSA, lo que proporciona evidencia de que la proteína activa tiene un tamaño molecular inferior al de BSA, es decir, menor de 65 kd, según se evalúa por cromatografía de filtración en gel (FIG. 9b).

Las fracciones combinadas de la cromatografía con S12 que contenían la actividad máxima se purificaron posteriormente por cromatografía en fase reversa usando una columna C4 (BioRad) (tampón: 0.1 % de TFA con un gradiente de acetonitrilo de 0-100%). Las proteínas eluidas se analizaron por SDS-NuPAGE y las fracciones que contenían la mayor parte de la banda de proteína deseada que migraba a 70 kD se combinaron y se secaron al vacío. La fracción combinada se volvió a analizar por SDS-NuPAGE y se transfirió a una membrana de PVDF y se tiñó con R-250 (FIG. 7). La banda de proteína deseada se escindió y sometió a secuenciación N-terminal usando un secuenciador de proteínas Applied Biosystems Precise Protein Sequencer Modelo 494 con un sistema administrador de microgradiente Microgradient Delivery System Modelo 140C y un detector de absorbancia Programmable Absorbance Detector Modelo 785A. Se obtuvo una única secuencia corta:

Phe-Ala-Asn-Gly-Leu-Leu-Leu-Thr (SEC. ID N°: 1).

Puesto que la actividad de α -galactosidasa aislada no se purificó hasta homogeneidad es posible que la secuencia obtenida se origine de otra proteína. Se requiere purificación adicional para aislar y caracterizar la nueva proteína enzimática y el gen que la codifica, y esto está en progreso.

No obstante, la nueva actividad de α -galactosidasa fue altamente purificada y tuvo una actividad específica de más de 10 U/mg con el tetrasacárido de B. La preparación enzimática permitió estudios detallados de la especificidad de sustrato y de las propiedades cinéticas de la nueva enzima. La especificidad de sustrato de la α -galactosidasa de N° 2357 purificada se caracterizó usando un gran grupo de oligosacáridos y derivados con residuos α -Gal terminales. El ensayo se llevó a cabo según se describió antes usando 1-4 nmol de sustrato y la cantidad de enzima requerida para escindir esta cantidad de la estructura tetrasacárido-AMC de B en 60 min. Se realizó un análisis por HPTLC a diferentes tiempos. Un ejemplo del análisis se muestra en la FIG. 8. La especificidad de sustrato de la actividad de α -galactosidasa de N° 2357 purificada se resume en la tabla VIII.

Tabla VIII: Especificidad de sustrato de las α -galactosidasas

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -galactosidasa recombinante del grano de café	α -galactosidasa purificada de <i>Streptomyces</i> N° 2357
Gal α -Mu	-	+	-
Gala-pNP	-	+	-
GalNAc α -pNP	-	-	-
Gal α 1-3Gal β -OGr	-	+	-
Gal α 1-4Gal	P	+	-
Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -OGr	P _i	+	-
Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -OGr	P ^k	+	-
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β -OGr	B	+	+
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal-AMC	B	+	-

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -galactosidasa recombinante del grano de café	α -galactosidasa purificada de <i>Streptomyces</i> N° 2357
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -3GlcNAc β -OGr	B	+	+
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -OGr	B	+	+
Gala 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -OGr	B	+	+
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	B	+	+
Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-AMC	T β	-	
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	A	-	-
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	Galili B	+	-
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -OGr	B	+	+
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-4)GlcNAc β -OGr	B	+	+

¹Designaciones: "+": La escisión se detectó en el transcurso de 60 minutos, "-": No se detectó escisión durante la incubación de toda la noche. Las reacciones de escisión del trisacárido lineal al igual que del Galili de B se evaluaron por HPTLC usando CHCl₃:metanol:H₂O (30:60:10). Todas las otras reacciones de escisión se analizaron usando CHCl₃:metanol:H₂O (60:35:8).

Se incluyó la α -galactosidasa recombinante del grano de café en todos los análisis a efectos de comparar. De acuerdo con nuestros estudios descritos en el ejemplo 1, la α -galactosidasa del grano de café mostró actividad con todas las estructuras que contenían un residuo de α -Gal terminal. Tanto α 1-3 (grupo sanguíneo B y el "epítipo Galili" sin fucosa) como α 1-4 (grupo sanguíneo P₁ y P^k) fueron sustratos y la longitud o ramificación de la estructura del oligosacárido sólo tuvo efecto sobre la actividad relativa, es decir, las cantidades de enzimas requeridas para alcanzar la finalización (las actividades específicas sólo fueron determinadas para Gal α -p-nitrofenilo y tetrasacárido-AMC de B).

En llamativo contraste, la actividad identificada y purificada de *Streptomyces* cepa N° 2357 sólo presenta actividad con las estructuras del grupo sanguíneo B y cuando se presentan como tetrasacáridos o más largos. La incapacidad de esta enzima para escindir derivados p-nitrofenilo o metil-umbeliferilo del monosacárido α Gal demostró que la falta de actividad con los monosacáridos no se debía simplemente al aglucano y la conjugación. La estructura del trisacárido, Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal-AMC, fue inactiva lo cual puede estar relacionado con la química de conjugación puesto que la estructura correspondiente, Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -OGr, sirvió como sustrato. Excepto por esto la α -galactosidasa de *Streptomyces* utilizó eficazmente todas las estructuras ramificadas del grupo B relacionadas, lo cual representa todas las estructuras B conocidas encontradas en los glóbulos rojos (Tabla I). Esta es la primera α -galactosidasa que presenta especificidad de sustrato única por las estructuras del grupo sanguíneo B y que no muestra actividad con el antígeno P₁ del grupo sanguíneo humano ni con el antígeno raro P^k. Por consiguiente, la conversión enzimática de glóbulos rojos con la α -galactosidasa de *Streptomyces* dará como resultado una antigenicidad P₁ intacta en contraste con los tratamientos con α -galactosidasas conocidas incluida la α -galactosidasa del grano de café (Kruskall et al. Transfusion 2000; 40(11): 1290-8). De manera similar, se espera que el antígeno raro P^k permanezca intacto después de la conversión enzimática. Aproximadamente el 80% de la población caucásica expresa el antígeno P₁ en los glóbulos rojos y, aunque la función de este antígeno es desconocida, se considera una mejora importante en las conversiones enzimáticas el limitar la eliminación de antígenos exclusivamente a los antígenos de los grupos sanguíneos A y B.

El pH óptimo de la α -galactosidasa de *Streptomyces* purificada, se analizó como se muestra en la FIG. 9. La actividad enzimática con el sustrato tetrasacárido-AMC de B tuvo un pH óptimo amplio alrededor de 5.5-7.0. Por lo tanto se espera que esta enzima funcione en conversiones de glóbulos rojos a pH neutro en contraposición a las enzimas utilizadas en el pasado.

Esta es la primera actividad de α -galactosidasa o α -N-acetilgalactosaminidasa identificada que tiene especificidad de sustrato exclusiva o incluso preferencial por las estructuras de los grupos sanguíneos B o A frente a los derivados de monosacáridos simples. La enzima α -galactosidasa tiene una actividad específica con las estructuras del grupo sanguíneo B superior a 10 U/mg, que es más de 500 veces mayor que la medida para la α -galactosidasa del grano de

café, como se describió en el ejemplo 1. Aunque esta información no está disponible para todas las otras α -galactosidasas identificadas y caracterizadas, es probable que estas muestren las mismas pobres propiedades que la α -galactosidasa del grano de café, porque generalmente actúan eficazmente con el derivado α Gal-p-nitrofenilo y porque los genes que las codifican son homólogos. La α -galactosidasa de *Streptomyces* identificada en la presente invención es por lo tanto única y sin precedentes en el estado anterior de la técnica, y las propiedades cinéticas identificadas para esta enzima son muy promisorias en cuanto a su comportamiento en la conversión enzimática de células sanguíneas B.

Ejemplo 4: Caracterización de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante expresada en *E. coli*.

New England BioLabs Inc. comercializó recientemente una α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante (N° de catálogo P0734B) que se dio a conocer que se expresa en *E. coli*. Esta enzima deriva de una cepa patentada, y según se dice cataliza la hidrólisis de las uniones α -GalNAc terminales de los oligosacáridos y α GalNAc- p-nitrofenilo (Información del catálogo de New England BioLabs Inc.). En una detección de exoglucosidasas comerciales encontramos que esta α -N-acetilgalactosaminidasa exhibe parcialmente las características preferidas de tener una actividad específica relativamente alta con derivados tetra- y heptasacárido-AMC de A en comparación con los derivados monosacáridos α GalNAc (Tabla IX). Es de destacar que la actividad específica absoluta de esta enzima con los derivados del grupo sanguíneo A no es considerablemente diferente de la de, por ejemplo, la enzima de hígado de pollo. Sin embargo, la actividad relativa comparada con el sustrato monosacárido es considerablemente diferente. Por lo tanto, los datos sugieren que la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* tiene una mejor especificidad relativa por el antígeno del grupo sanguíneo A.

Tabla IX: Actividad específica de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*.

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante	
		pH 5.5	pH 7.0
Gal α 1-pNP	-	-	-
GalNAc α 1-pNP	-	2.3 U/mg ¹	2.5 U/mg
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -AMC	B	-	-
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -AMC	A	0.27 U/mg	0.27 U/mg
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 14GlcNAc β -AM C	A	0.26 U/mg	0.27 U/mg

¹Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: Los ensayos con p-nitrofenilo se hicieron en volúmenes de reacción de 0.5 ml que contenían 0.05 μ mol (100 μ M), fosfato de sodio 50 mM (pH 5.5 o 7.0), y 0.5 μ g de enzima. Las reacciones se incubaron 10 min a 37 °C, y se detuvieron por adición de un volumen igual de tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 9.8). Los ensayos con sustratos AMC se hicieron en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 1 nmol de sustrato (100 μ M), fosfato de sodio 50 mM o glicina 0.25 M (pH 5.5 o 7.0), y 0.05-0.1 μ g de enzima. Las reacciones se incubaron a 26 °C o 37 °C y se analizaron por HPTLC a los tiempos 0, 15, 30 y 60 min. La cuantificación de la proteína se realizó por semicuantificación usando análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie y BSA pesado como comparador.

El análisis de la especificidad de sustrato fina de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* reveló que similarmente a la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo utilizó las estructuras del grupo sanguíneo A y las estructuras repetitivas de A con la misma eficacia (Tabla IX).

El análisis posterior con un grupo de estructuras oligosacáridas no fucosiladas con residuos α GalNAc terminales mostró que la enzima tiene aproximadamente la misma eficacia con esos sustratos en comparación con las estructuras ramificadas del grupo A (Tabla X).

Tabla X: Especificidad de sustrato de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*.

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante pH 6.0 y pH 7.0
GalNAc α 1-2Gal β 1-OGr	-	+
GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-OGr	-	+
GalNAc α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-OGr	-	+

Estructura del sustrato (derivado)	Especificidad del grupo sanguíneo	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante pH 6.0 y pH 7.0
GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-OG _r	-	+
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-GalNAc α 1-OG _r	A	+

¹Los ensayos se realizaron en mezclas de reacción de 10 μ l que contenían 1-4 nmol de sustrato (100-400 μ M), citrato de sodio 50 mM (pH 6.0), y 0.125 μ g de enzima. Las reacciones se incubaron a 31 °C y se analizaron por HPTLC a los tiempos 0, 30, 60 y 120 min.

La α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* mostró un pH óptimo amplio que incluía pH 6.0-7.0 con ambos sustratos monosacárido y oligosacárido FIG. 10. A pH ácido por debajo de 5.5 la actividad decae rápidamente y a pH 4.4 y menor, la actividad es apenas detectable. Esta es la primera α -N-acetilgalactosaminidasa identificada con el pH óptimo neutro preferido, característico para la conversión de los glóbulos rojos.

La actividad de α -N-acetilgalactosaminidasa no fue afectada en absoluto por tampones del tipo: glicina 50-250 mM, glicilglicina 0.1 M, fosfato de sodio 20-50 mM, citrato de sodio 12.5-25.0 mM, citrato de sodio 12.5-25.0 y fosfato de sodio 5.0-10.0, solución McIlvaine de pH 5.5, PBS y MES. La enzima tampoco fue afectada por NaCl (0-150 mM), glutatión y n-octil- β -D-glucopiranosida.

Finalmente, la evaluación de la constante cinética K_m para el derivado del monosacárido reveló que la enzima tiene una K_m aparente significativamente menor (Tabla XI), en comparación con la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo o las α -galactosidasas descritas en el ejemplo 1 (Tabla IV).

Tabla XI: K_m aparente y V_{max} de α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* con derivados del monosacárido.

Estructura del sustrato (derivado)	α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante pH 7.0, 37 °C	
	K_m	V_{max}
Gal α 1-pNP	-	-
GalNAc α 1-pNP	10-50 μ M	33 U/mg ³

¹Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: Los ensayos con p-nitrofenilo se hicieron en volúmenes de reacción de 0.5 ml que contenían 3.9-50 nmol (1.5-100 μ M), fosfato de sodio 50 mM (pH 5.5 o 7.0), y 0.5 μ g de enzima. Las reacciones se incubaron 10 min a 37 °C, y se detuvieron por adición de un volumen igual de tampón de borato de sodio 20 mM (pH 9.8). La cantidad de p-nitrofenol liberado se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm en comparación con una curva estándar de p-nitrofenol. Las constantes K_m y V_{max} de Michaelis-Menten se determinaron de gráficos Lineweaver-Burk.

³ Zhu et al., (1996) Protein Exp and Purification 8: 456-462.

Además, los resultados preliminares indican que la K_m para los sustratos oligosacáridos del grupo sanguíneo A es similarmente aproximadamente 20 μ M. El ensayo utilizado para esta determinación involucró barridos densitométricos de la relación sustrato/producto usando el sustrato tetrasacárido-AMC (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GalNAc-AMC). Este ensayo no es confiable a bajas concentraciones, y por lo tanto es posible que la K_m sea incluso menor a 20 μ M.

En resumen, la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* presenta una preferencia relativamente alta por los sustratos del grupo sanguíneo A, actividad máxima con sustratos del grupo sanguíneo A a pH neutro y propiedades cinética favorables definidas por una baja K_m .

Ejemplo 5: Conversión enzimática de glóbulos rojos A₁ y A₂ en células sanguíneas con el fenotipo O usando α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*, evaluada por protocolos de determinación del grupo sanguíneo de rutina.

La eliminación completa de los epítomos inmunodominantes A en glóbulos rojos humanos del grupo A no ha sido comunicada previamente como se describe en detalle precedentemente. Se ha informado de la conversión enzimática de células sanguíneas del grupo sanguíneo A del subgrupo débil A₂ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo a pH ácido, pero los resultados de las conversiones no se verificaron mediante reactivos y métodos de determinación del grupo sanguíneo sensibles utilizados en los procedimientos de determinación estándar. Como se detalla en la tabla XII a continuación, los intentos iniciales por mejorar el comportamiento de la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo usando diferentes condiciones de reacción fracasó en producir células sanguíneas completamente convertidas. Si bien la reactividad con un anticuerpo monoclonal anti-A de Dako pudo ser

abolida para las células sanguíneas A₂, la determinación del grupo sanguíneo con reactivos más sensibles reveló claramente que la degradación enzimática de los epítomos del grupo A fue incompleta.

Tabla XII: Conversión¹ de glóbulos rojos A₁ y A₂ con α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo

	Tratamiento pre enzima				Tratamiento post enzima			
	Orto Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus	Dako Anti-A	Orto Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus	Dako Anti-A
A1 donante N° 1	4+	4+	0	3+	4+	0	4+	3+
A1 donante N° 2	4+	4+	0	4+	4+	0	4+	w+
A2 donante N° 1	4+				4+			
A2 donante N° 2	4+	0	3+	3+	4+	0	4+	1+
A2 donante N° 3	4+	0	4+	4+	4+	0	4+	0

¹Protocolos utilizados para la conversión con α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo: Se evaluaron tres protocolos de conversión para la conversión de glóbulos rojos A₁ y A₂ con α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo.

Protocolo de conversión- A Se extrajeron glóbulos rojos A₂ (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos de EDTA y se almacenaron a 4 °C por un máximo de siete días, se lavaron tres veces en PBS (solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.4), y se resuspendieron a 10% en una solución de PBS y 7.5% de PEG (pH 7.4). Las células sanguíneas se trataron con α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo (100U/ml) a 30 °C durante 180 min mientras se agitaba. Las células se lavaron tres veces en solución salina al 0.9% y se resuspendieron a 3-5% en solución salina para determinación del grupo sanguíneo.

Protocolo de conversión- B Se extrajeron glóbulos rojos A₁ (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos de EDTA y se congelaron glóbulos rojos A₂ leucorreducidos (American Red Cross, New England Region, Dedham, MA) en Glycerolyte 57, (Baxter Healthcare Corporation, Fenwal Division: Deerfield, IL) de acuerdo con el manual técnico AABB, 13ª edición, método 6.6 y se almacenaron a -70 °C. Antes del tratamiento con la enzima las células sanguíneas se desgllicerolizaron usando solución salina al 9.0%, solución salina al 2.5% y solución salina al 0.9% (se siguió el método 125 de los métodos de inmunohematología de la Cruz roja norteamericana), se resuspendieron a un hematocrito de 50% en una solución de PBS y PEG al 7.5% (pH 7.4) y se agregó α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo (200 U/ml). Las reacciones se incubaron a 37 °C con agitación durante 4 horas, seguida de tres lavados en solución salina al 0.9% y suspensión final hasta 3-5% en solución salina para determinación del grupo sanguíneo.

Protocolo de conversión- C Origen y almacenamiento de las células sanguíneas igual que el descrito en el protocolo B. Los glóbulos rojos desgllicerolizados se lavaron 2 veces en PCI (pH 5.5) con NaCl 150 mM y se resuspendieron a un hematocrito de 50% en PCI (pH 5.5) con NaCl 150 mM. Las células sanguíneas se trataron con α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante de hígado de pollo (200U/ml) a 37 °C, con agitación, durante 4 horas, seguida de tres lavados con solución salina al 0.9% y suspensión final hasta 3-5% en solución salina para determinación del grupo sanguíneo.

A partir de los datos de la tabla XII es evidente que se logra la eliminación aparente de antígenos A, cuando es definida por un anticuerpo monoclonal específico particular anti-grupo sanguíneo A que no está aprobado para los procedimientos de determinación del grupo sanguíneo (DAKO). Existe una gran cantidad de dichos anticuerpos y, debido a la especificidad y baja afinidad de unión, son inadecuados para determinación serológica del grupo sanguíneo. El desarrollo de cócteles monoclonales para tipificación de rutina ABO para sustituir los reactivos de anticuerpos policlonales usados previamente, fue un gran logro para la industria del banco de sangre en la década de 1990. El análisis de eliminación de antígenos A por estos reactivos de determinación del grupo sanguíneo altamente sensibles y aprobados para rutina mostró, en contraposición con el anticuerpo DAKO, que se había producido una pequeña conversión, definida mediante título de aglutinación. Los detalles del ensayo de determinación del grupo sanguíneo utilizado en este ejemplo son los siguientes:

Los reactivos de determinación del grupo sanguíneo aprobados utilizados en ensayos de hemaglutinación fueron anticuerpos monoclonales de murino y lectinas vegetales obtenidas de Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ; Gamma Biologicals/Immucor, Norcross, GA. Los reactivos no aprobados incluyeron anticuerpo monoclonal anti-A de murino de Dako y un grupo de anticuerpos monoclonales para variantes del grupo sanguíneo A producidos por H. Clausen

(Clausen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 1199-203, 1985, Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen et al., Biochemistry 25(22): 7075-85, 1986, Clausen et al., J Biol Chem. 262(29): 14228-34, 1987). Los reactivos de determinación del grupo sanguíneo se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y otros anticuerpos monoclonales según se determinaron por titulaciones.

Ensayo de hemaglutinación (temperatura ambiente)

1. Se preparó una suspensión al 3-5% de glóbulos rojos lavados en solución salina isotónica de banco de sangre.

2. Se agregó una gota (aprox. 50 µl) de reactivo anticuerpo/lectina.

3. Se agregó una gota (aprox. 50 µl) de la suspensión de glóbulos rojos.

4. Se mezclaron los tubos y se centrifugaron durante 15 segundos a 3500 rpm.

5. Se resuspendieron los glóbulos mediante agitación suave y se examinaron macroscópicamente en busca de aglutinación.

6. La aglutinación se calificó de acuerdo con el método 1.8 del manual técnico AABB, 13ª edición.

Se obtuvieron resultados similares con una α -N-acetilgalactosaminidasa fúngica de *acremonium* sp. purificada (Calbiochem) (no se muestra).

Según se describe en los ejemplos anteriores, es probable que las enzimas preferidas para usar en la eliminación de epítomos de los grupos sanguíneos A o B de los glóbulos rojos tengan propiedades cinéticas particularmente buenas con sustratos oligosacáridos que se asemejen a los antígenos de los grupos sanguíneos A o B. Dichas propiedades cinéticas preferidas podrían representarse por especificidades de sustrato preferenciales o exclusivas por los oligosacáridos de los grupos sanguíneos A o B, y sin actividad o con baja actividad con los derivados de monosacáridos simples como los sustratos monosacárido-PNP. Las propiedades cinéticas preferidas también podrían ser representadas por una K_m particularmente baja para los sustratos pertinentes. Otras propiedades cinéticas preferidas consisten en un pH óptimo neutro de las reacciones con sustratos activos del grupo sanguíneo pertinente, y otras condiciones de reacción que sean compatibles con la integridad y las funciones de los glóbulos rojos. Otras propiedades preferidas de la enzima como el tamaño, la carga, la solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas también se pueden relacionar con el comportamiento en la conversión enzimática de glóbulos rojos.

Se identificaron nuevas α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas con mejores propiedades cinéticas de diversas cepas bacterianas como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4. La α -N-acetilgalactosaminidasa (New England Biolabs) descrita en el ejemplo 4 representó un ejemplo de dicha α -N-acetilgalactosaminidasa y estuvo disponible en forma recombinante de suficiente pureza para ensayar nuestra hipótesis de que las enzimas con las características preferidas mencionadas antes tendrían un comportamiento superior en las conversiones de glóbulos rojos.

En la tabla XIII se muestra el comportamiento de esta α -N-acetilgalactosaminidasa en la conversión de glóbulos rojos a pH neutro. La α -N-acetilgalactosaminidasa fue capaz de convertir completamente tanto los glóbulos rojos A₁ como A₂ en células tipificadas como O, según se define mediante los protocolos de determinación del grupo sanguíneo de rutina del banco de sangre.

Tabla XIII Conversión de glóbulos rojos A₁ y A₂ con NEB α -N-acetilgalactosaminidasa

	Tratamiento pre enzima			Tratamiento post enzima			
	Orto Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus	Orto Anti-A	Dako Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus
A1 donante N° 1	4+	4+	0	0	0	0	4+
A1 donante N° 2	4+	4+	0	0	0	0	4+
A1 donante N° 3	4+	4+	0	0	0	0	4+
A2 donante N° 1	4+	0	3+	0	0	0	4+
A2 donante N° 2	4+	0	3+	0	0	0	4+

	Tratamiento pre enzima			Tratamiento post enzima			
	Orto Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus	Orto Anti-A	Dako Anti-A	Dolichos biflorus	Ulex europaeus
A2 donante N° 3	4+	0	2+	0	0	0	4+
A2 donante N° 4	4+	0	3+	0	0	0	4+
A2 donante N° 5	4+	0	2+	0	0	0	4+
A2 donante N° 6	4+	0	3+	0	0	0	4+

Protocolo: Glóbulos rojos leucorreducidos (Oklahoma Blood Institute) o glóbulos rojos obtenidos de voluntarios (ACD), se lavaron una vez en solución salina al 0.9% y se resuspendieron en el tampón de conversión hasta 30% de hematocrito. Las células sanguíneas se trataron con 10 a 20 mU/ml (una unidad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de tetrasacárido-AMC A en 1 min utilizando las condiciones de reacción estándar descritas en otra parte) de α -N-acetilgalactosaminidasa (New England Biolabs) y se incubaron a 25 °C durante 60 min con mezcla. Las células sanguíneas tratadas se lavaron una vez con solución salina al 0.9%, se resuspendieron hasta 3-5% en solución salina y se les determinó el grupo sanguíneo como se describió antes.

5

Los glóbulos rojos de ambos subtipos A₁ y A₂ tratados con 10-20 mU de α -N-acetilgalactosaminidasa a pH neutro fueron totalmente no reactivos con los reactivos de determinación del grupo sanguíneo anti-A en los ensayos de aglutinación directa. En cambio las células sanguíneas A tratadas con enzima se volvieron igualmente reactivas que las células sanguíneas de control O con la lectina de Ulex Europaeus, que generalmente se utiliza como un reactivo anti-H. La reactividad con Dolichus Biflorus que es generalmente utilizado como un reactivo anti-A₁ fue destruida en los primeros minutos de tratamiento (no se muestra).

10

Los análisis de compatibilidad cruzada de células sanguíneas tratadas con α -N-acetilgalactosaminidasa que se muestran en la tabla XIV confirmaron que tanto las células sanguíneas A₁ como A₂ convertidas enzimáticamente se comportaron como las células O de control.

Tabla XIV: Análisis de compatibilidad cruzada (IS, spin inmediato) de glóbulos rojos A₁ y A₂ convertidos con NEB α -N-acetilgalactosaminidasa

IS de tratamiento post enzima de glóbulos rojos							
	A ₁ donante N° 1	A ₁ donante N° 2	A ₁ donante N° 3	A ₂ donante N° 1	A ₂ donante N° 2	A ₂ donante N° 3	O donante N° 1
Plasma							
Control de solución salina	0	0	0	0	0	0	0
A ₁ plasma (n = 2)	0	0	0	0	0	0	0
A ₂ plasma (n = 2)	0	0	0	0	0	0	0
O plasma (n = 7)	0	0	0	0	0	0	0

15

20

25

Este resultado muestra que los individuos O y B, que tienen títulos variables de anticuerpos dirigidos contra los antígenos del grupo sanguíneo A de los glóbulos rojos A, no los reconocen cuando el residuo inmunodominante α GalNAc fue suficientemente eliminado. Como se describe en los Antecedentes de la invención y se ilustra además en la tabla I, este resultado indica que las cantidades menores de glucoesfingolípidos que contienen la estructura repetitiva del grupo sanguíneo A de acuerdo con nuestro análisis en el ejemplo 4, se convierten totalmente en la estructura H asociada a A (Tabla I, estructura 21). Además, indica que esta estructura H asociada a A es percibida como un antígeno H normal por el sistema inmunitario. Esto está de acuerdo con nuestros estudios previos de la inmunogenicidad de este antígeno glucolípido en ratón (Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1388-92, 1986). El descubrimiento de que la digestión enzimática con una única enzima α -N-acetilgalactosaminidasa torna los glóbulos rojos tanto A₁ como A₂ no reactivos con los reactivos de determinación del grupo sanguíneo anti-A y el plasma de los individuos de los grupos O y B es nuevo, y un gran avance en el desarrollo de una tecnología comercialmente viable para proporcionar células sanguíneas O convertidas enzimáticamente universalmente aceptables. Si bien se prevé que las células sanguíneas B convertidas enzimáticamente sean químicamente idénticas a las células sanguíneas O, las células sanguíneas A convertidas enzimáticamente tendrán el fenotipo de O pero tendrán

dos tipos diferentes de antígenos H. Siendo la mayoría de estos dos tipos la estructura H tipo 2 (Tabla I, estructura 18) encontrada en las células sanguíneas O, pero también está presente una cantidad menor de glucolípidos H con una estructura interna que consiste en un trisacárido de A enmascarado (Tabla I, estructura 21). Las células sanguíneas A convertidas enzimáticamente con una única α -N-acetilgalactosaminidasa son por lo tanto diferentes de las células sanguíneas O y de todos los glóbulos rojos preparados previamente y utilizados en medicina de transfusión, sin embargo, se espera que actúen de manera idéntica a las células sanguíneas O.

Se llevaron a cabo estudios detallados de los parámetros de conversión enzimática de glóbulos rojos con la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* para optimización. Si bien el pH influyó en la actividad enzimática con el sustrato tetrasacárido-AMC de A, ninguno de los parámetros ensayados y descritos a continuación influyó significativamente en esta actividad.

Sistema de tampón:

Como se muestra en la FIG. 11, el sistema de tampón óptimo parece ser glicina 250 mM. Las reacciones en los tampones NaP y PCI, que se usan generalmente para la conversión enzimática de células sanguíneas B, no produjeron una conversión significativa.

pH del tampón de glicina:

Se encontró en el ejemplo 4 que la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* tenía un pH óptimo amplio alrededor del pH neutro. El análisis del pH óptimo en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ reveló un pH óptimo más definido de 7 (FIG. 12). La conversión de las células sanguíneas débiles A₂ se logró a un rango de pH más amplio de 6-8 con 7.5 mU/ml de enzima, pero cuando se usó menos enzima el pH óptimo fue de 7 (no se muestra).

pH del tampón de glicina:

Se encontró en el ejemplo 4 que la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* tenía un pH óptimo amplio alrededor del pH neutro. El análisis del pH óptimo en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ reveló un pH óptimo más definido de 7 (FIG. 12). La conversión de las células sanguíneas débiles A₂ se logró a un rango de pH más amplio de 6-8 con 7.5 mU/ml de enzima, pero cuando se usó menos enzima el pH óptimo fue de 7 (no se muestra).

Molaridad del tampón de glicina:

Se encontró que la concentración de glicina era un parámetro importante para la conversión enzimática de células sanguíneas del grupo A con la α -N-de acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* (FIG. 13). La conversión óptima se logró a 250-300 mM.

Concentración de enzima:

La FIG. 14 ilustra la titulación de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* de 5-50 mU/ml con células sanguíneas A₁ y A₂. De acuerdo con el hecho de que A₁ tiene más epítomos antigénicos A que A₂, se requiere más enzima para convertir células sanguíneas A₁. La titulación de la enzima en las células sanguíneas A₂ de 1-10 mU reveló que se requirieron 3 mU/ml para la conversión completa en las condiciones utilizadas (no se muestra).

Influencia de la concentración de células (hematocrito) durante el tratamiento:

El tratamiento de células sanguíneas A₁ a concentraciones de 20-90% con cantidad de enzima constante (20 mU) mostró que la eficacia de la conversión disminuía al aumentar la concentración de células sanguíneas (FIG. 15). A mayores concentraciones de enzima, la conversión se producía más rápido, pero la eficacia de la conversión a concentraciones de células sanguíneas por encima de 50% no mejoraba proporcionalmente lo que sugiere que las condiciones de conversión óptimas son 20-50%.

Influencia del tiempo de tratamiento:

La FIG. 16 ilustra que la conversión es proporcional a la cantidad de enzima y al tiempo.

Influencia de la temperatura:

Se encontró que la actividad de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* con el derivado del sacárido al intervalo de temperatura 20-40 °C era similar, y que el comportamiento de la enzima en la conversión de células sanguíneas del grupo A ilustrada en la FIG. 17 confirmaba esto.

Estos resultados demuestran claramente que una α -N-acetilgalactosaminidasa, ejemplificada por la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* utilizada en este ejemplo que tiene las propiedades cinéticas únicas

5 preferidas definidas en este documento, tiene un mejor comportamiento en la conversión enzimática de células sanguíneas A. La conversión de células sanguíneas A₁, que no se había logrado previamente, se obtuvo con la enzima preferida a pH neutro y a concentraciones de proteína enzimática mucho menores que las usadas previamente para convertir células sanguíneas A₂ y B. La cantidad de enzima utilizada (10-20 mU/ml equivalente a 30-60 µg/ml) para la conversión de una suspensión de células sanguíneas al 30% (hematocrito), es menor que cualquier cantidad de enzima informada en el estado anterior de la técnica para convertir enzimáticamente células sanguíneas rojas A y B.

10 Las células sanguíneas A₁ y A₂ tratadas con una exo-N-acetilgalactosaminidasa como la α-N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* utilizada en este ejemplo capaz de escindir GalNAc de todas las estructuras del grupo sanguíneo A expondrán los antígenos clásicos H de cadena tipo 2 (estructura 18, Tabla 1) como los encontrados en las células sanguíneas del grupo sanguíneo O, pero también dejarán una pequeña cantidad de glucolípidos con la estructura H asociada a A (estructura 21, Tabla 1). Estudios con anticuerpos monoclonales específicamente reactivos con H tipo 2 (BE2) y H tipo 3 (HH14, MBr-1) (véase Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986) revelaron, como se esperaba, que las células sanguíneas A tratadas con exo-N-acetilgalactosaminidasa reaccionaron fuertemente con BE2 y débilmente con HH14 y MBr-1 (no se muestra). Puesto que ninguno de los anticuerpos anti-A, inclusive los utilizados en determinación del grupo sanguíneo de rutina, reaccionaron con células sanguíneas tratadas (Tabla XIII), la estructura glucolípido H asociada con A no es reconocida como un antígeno A. Esto se confirmó adicionalmente mediante análisis de compatibilidad cruzada (Tabla XIV). Esto está de acuerdo con el hecho de que los anticuerpos anti-H de cadena tipo 3 no pueden distinguir entre el glucolípido anterior y las estructuras denominadas H-Globo y H tipo mucina (estructuras 22 y 21, respectivamente, Tabla 1) (Clausen et al., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986). Por lo tanto, aunque las células sanguíneas A tratadas con exo-N-acetilgalactosaminidasa se comportan fenotípicamente como células sanguíneas O, difieren estructuralmente de las células sanguíneas O porque tienen menores cantidades de los antígenos glucolípidos H únicos. Las células sanguíneas del grupo A convertidas enzimáticamente, tipificadas como grupo O, constituyen por consiguiente una nueva entidad que es muy útil como un tipo de sangre para transfusión universal.

25 Las nuevas enzimas de *Streptomyces* definidas en el ejemplo 3 tienen propiedades 30 veces mejores que la α-N-acetilgalactosaminidasa utilizada en este ejemplo, y se prevé que ésta y otras enzimas con propiedades similares se comporten correspondientemente mejor en las conversiones enzimáticas de glóbulos rojos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymeQuest, Inc.

- 5 Clausen, Henrik
de la Vega, Humberto
Hill, Cheryl
Liu, Qiyong Peter
- 10 <120> CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE GLÓBULOS ROJOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS A, B Y AB USANDO
ALFA N-ACETILGALACTOSAMINIDASAS Y ALFA-GALACTOSIDASAS CON ESPECIFICIDADES DE SUSTRATO Y
PROPIEDADES CINÉTICAS ÚNICAS
- <130> 18405-118-061
- 15 <140> PCT/US0230403 <141> 2002-09-25
- <150> US 60/324,970 <151> 2001-09-25
- 20 <150> US 60/361,769 <151> 2002-03-05
- <150> US 10/251,271 <151> 2002-09-20
- <160> 1
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 30 <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Enzima alfa galactosidasa
- 40 <400> 1
- Phe Ala Asn Gly Leu Leu Leu Thr
- 1 5

REIVINDICACIONES

1. Una α -galactosidasa para eliminar antígenos tipo B de las células reactivas de los grupos sanguíneos B o AB en los hemoderivados, donde dicha α -galactosidasa tiene las características siguientes:
 - (i) no tiene actividad detectable con un antígeno P₁,
 - (ii) es activa para escindir uniones α 1,3-D-galactosa en un antígeno ramificado tipo B a pH 6-8, y
 - (iii) se puede aislar por un método que comprende los pasos de:
 - (1) proporcionar un cultivo de fermentación de una cepa de *Streptomyces griseoplanus* N° 2357, que produce una α -galactosidasa, depositada como ATCC N° de depósito PTA-4077;
 - (2) desestabilizar la cepa de *Streptomyces griseoplanus* cultivada del paso (1) mediante el método de prensa francesa;
 - (3) aislar una fracción de sobrenadante que contenga la α -galactosidasa de la cepa desestabilizada de *Streptomyces griseoplanus*, del paso (2) mediante centrifugación a 10 000 x g;
 - (4) fraccionar la fracción de sobrenadante que contiene la α -galactosidasa del paso (3) con sulfato de amonio para producir una fracción de 20 a 60 por ciento de sulfato de amonio enriquecida en la α -galactosidasa;
 - (5) disolver el precipitado de la α -galactosidasa de la fracción de 20 a 60 por ciento de sulfato de amonio del paso (4) en Tris 20 mM (pH 7.5) y clarificar mediante centrifugación,
 - (6) fraccionar secuencialmente mediante cromatografía en Q-sefarosa (tampón Tris 20 mM, pH 7.5 con un gradiente de NaCl 0-1.5 M), S-sefarosa (tampón de NaOAc 20 mM, pH 5.3 con un gradiente de NaCl 0-1.0 M) y mediante cromatografía de filtración en gel S12 (tampón de NaOAc 20 mM, pH 5.3, con NaCl 0.5 M o NaPO₄ 20 mM, pH 6.5, con NaCl 0-5 M) para producir una α -galactosidasa purificada, que eluya con un peso molecular de 40-80 kilodalton.
2. Un método para eliminar antígenos tipo B de las células reactivas de los grupos sanguíneos B o AB en un hemoderivado, donde dicho método comprende los pasos de:
 - (a) poner en contacto dicho hemoderivado con una enzima α -galactosidasa de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones de pH 6-8, durante un período suficiente para eliminar los antígenos B, y
 - (b) extraer dicha enzima de dicho hemoderivado.
3. Un método para convertir eritrocitos tipo B o AB en eritrocitos que no sean B, donde dicho método comprende los pasos de:
 - (a) poner en contacto dichos eritrocitos con una enzima α -galactosidasa de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones de pH 6-8, durante un período suficiente para eliminar los antígenos B, y
 - (b) extraer dicha enzima de dichos eritrocitos.

Figura 1.

Actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con Gal α -pNP a diferentes pH.

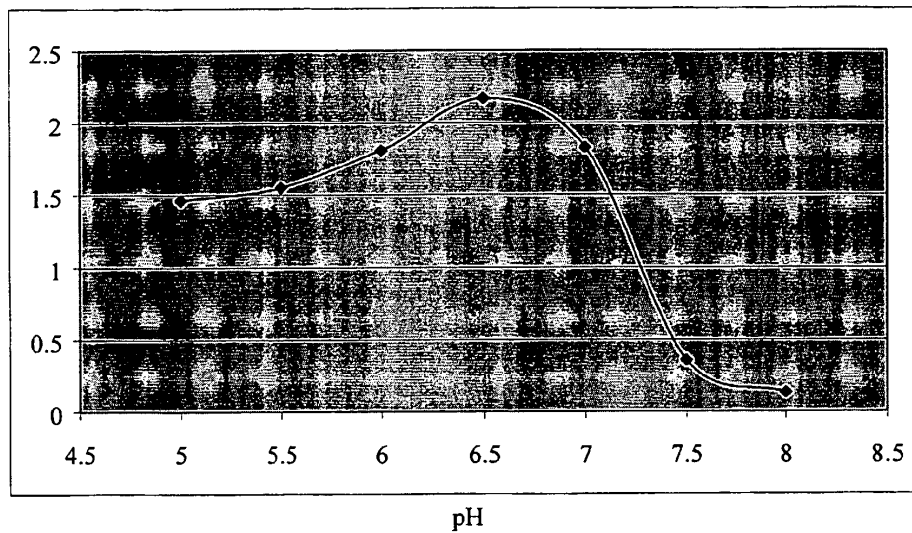


Figura 2.

Actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B a diferentes pH.

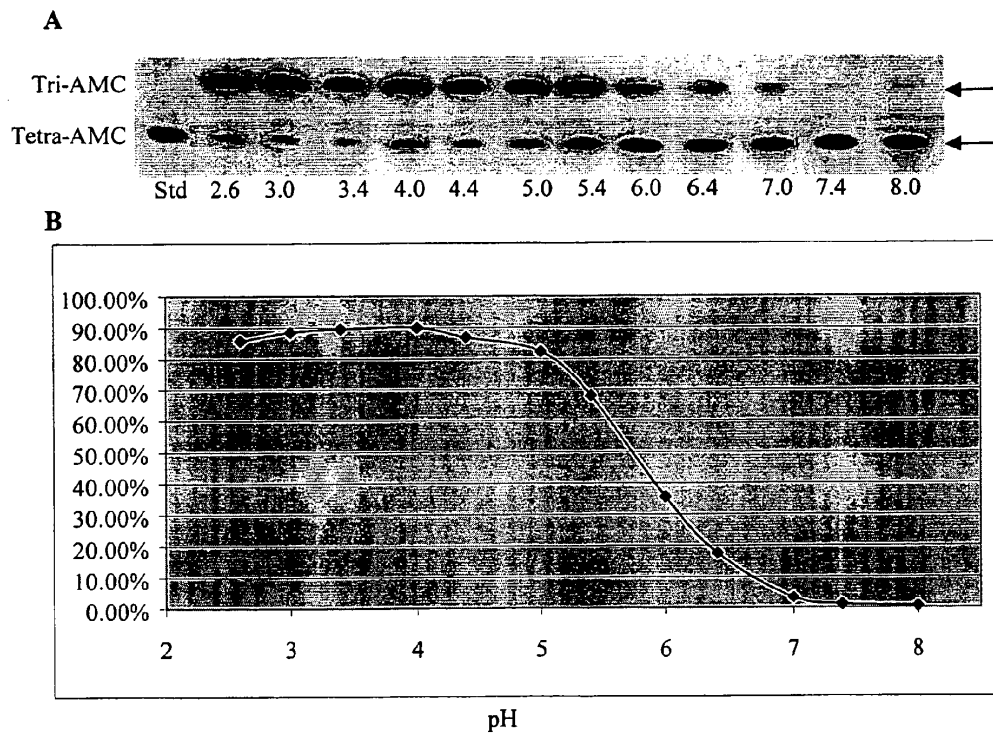


Figura 3.

Actividad de la α -galactosidasa recombinante del grano de café con el sustrato pentasacárido de Galili-AMC a diferentes pH.

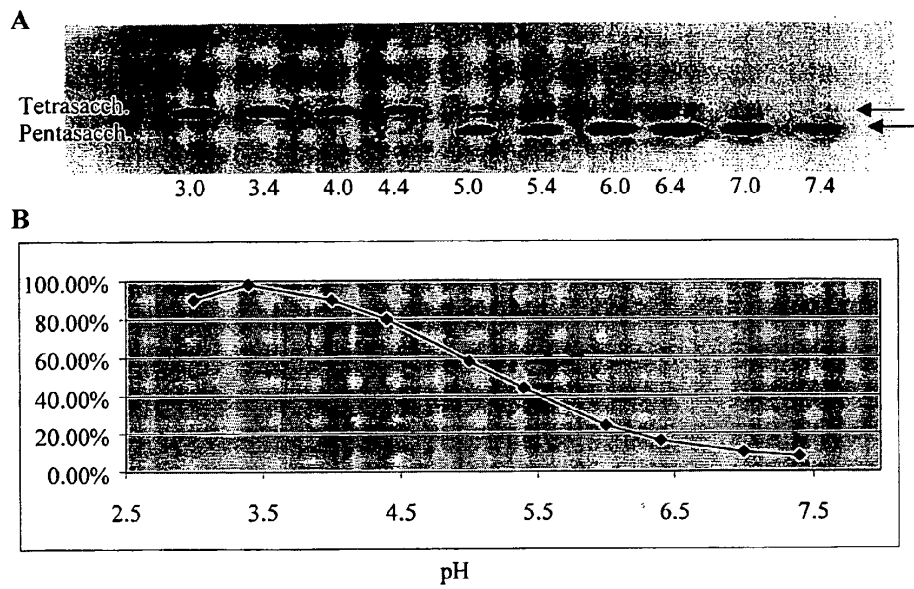


Figura 4.

Análisis por HPTLC de cinco actividades de α -galactosidasa de *Streptomyces* con el sustrato tetrasacárido-AMC de B

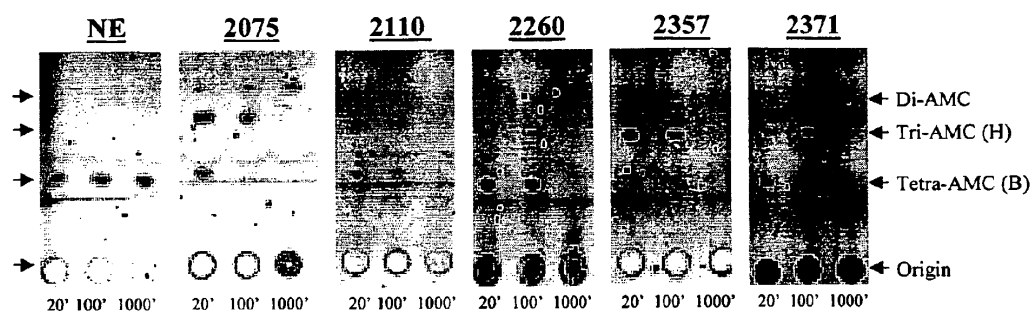


Figura 5.

Análisis por HPTLC de cinco actividades de α -galactosidasa de *Streptomyces* con el sustrato Gal α .pNP.

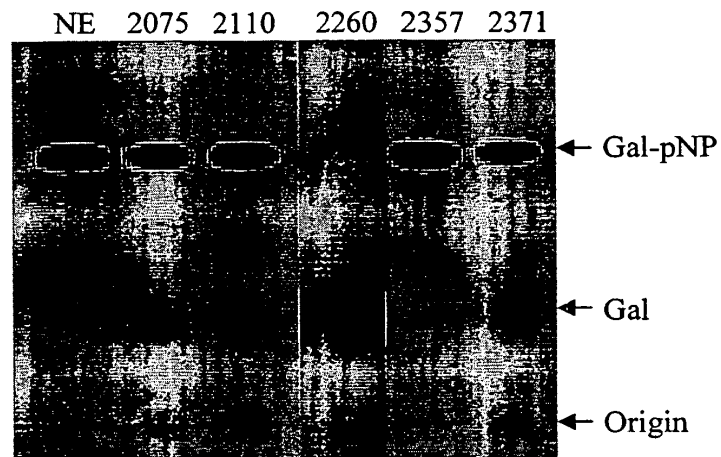


Figura 5b.

Análisis por HPTLC de cinco actividades de α -N-acetilgalactosaminidasa de *Streptomyces* con los sustratos tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo A (Panel A) heptasacáridos-AMC de A (Panel B)

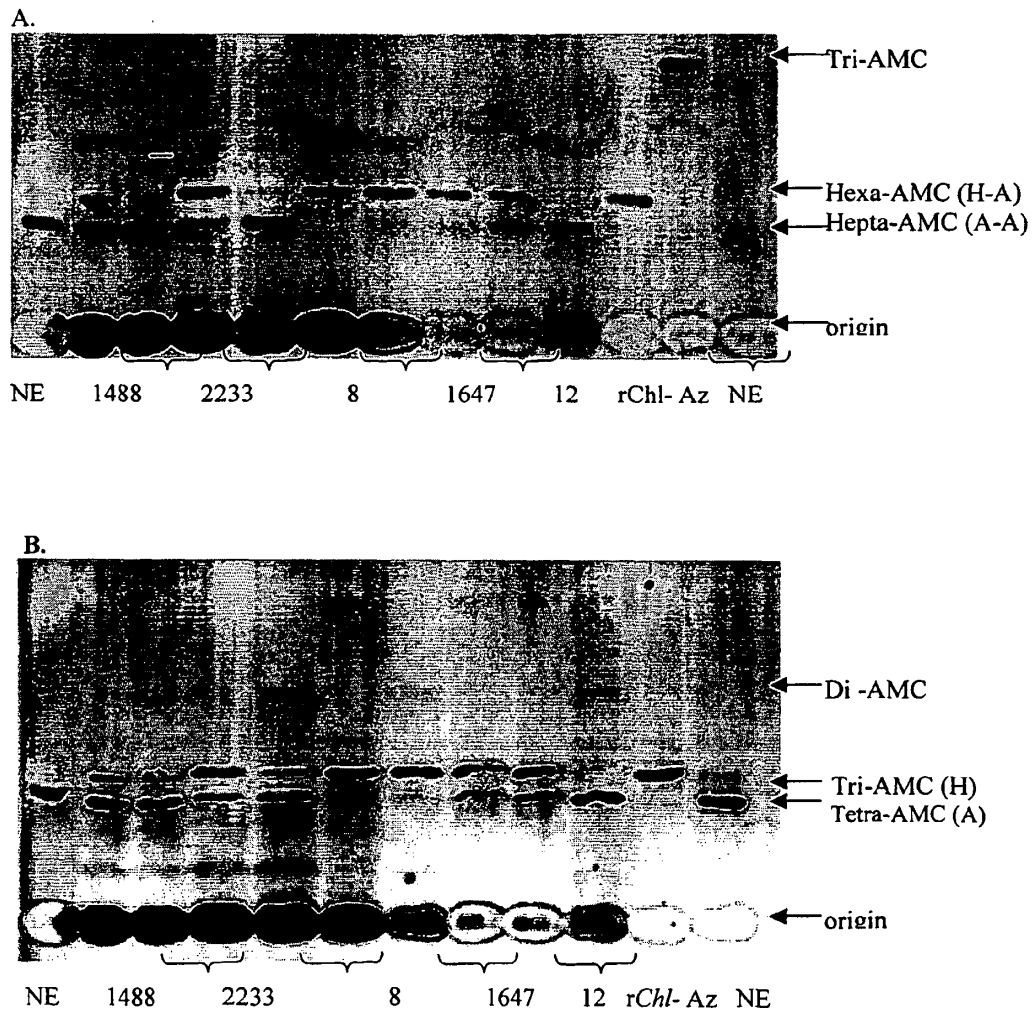


Figura 6.

Análisis de la enzima α -galactosidasa de *Streptomyces* N° 2357 separada por cromatografía en S12

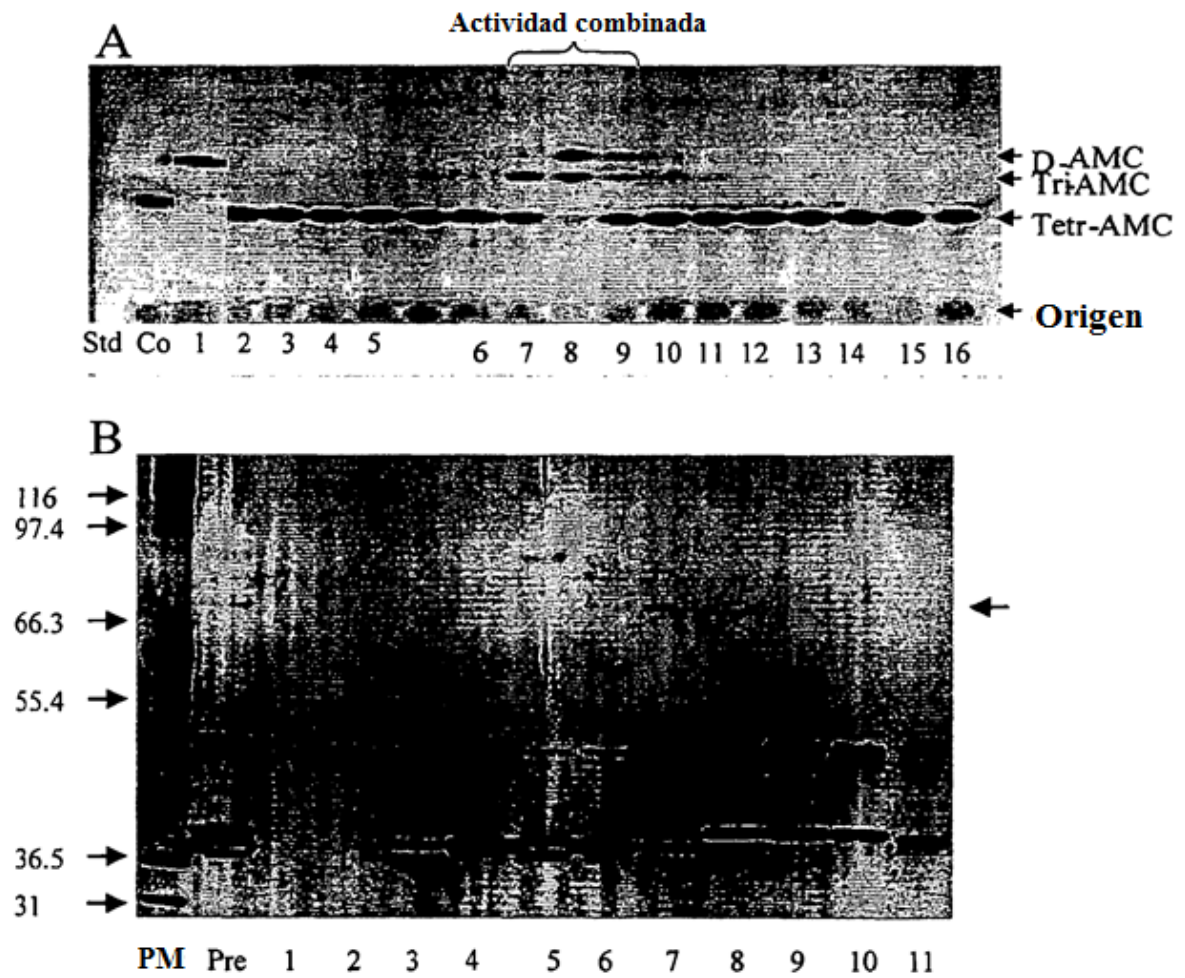


Figura 7.

SDS-NuPAGE de fracciones combinadas de la cromatografía S12 de la actividad enzimática purificada de N° 2357

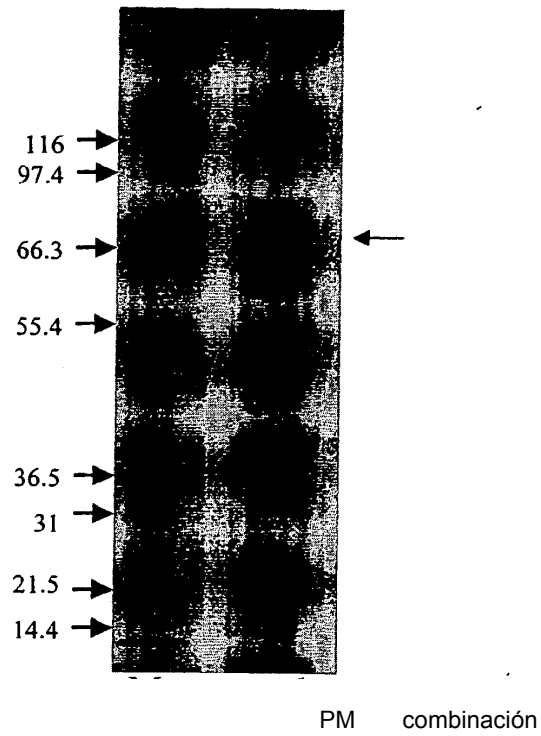


FIGURA 8.

Análisis por HPTLC de especificidades de sustrato de la α -galactosidasa recombinante del grano de café y α -galactosidasa purificada de N° 2357

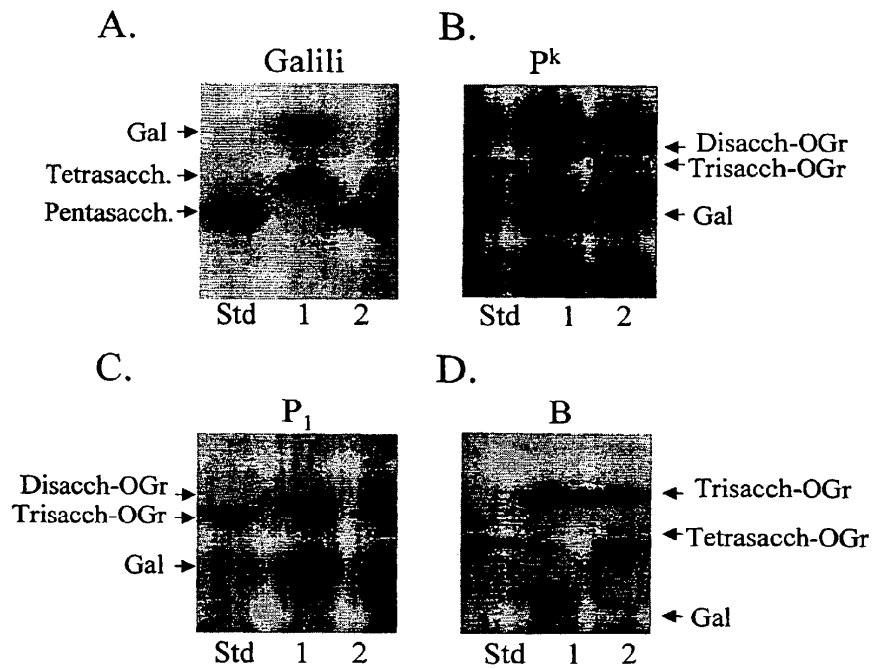
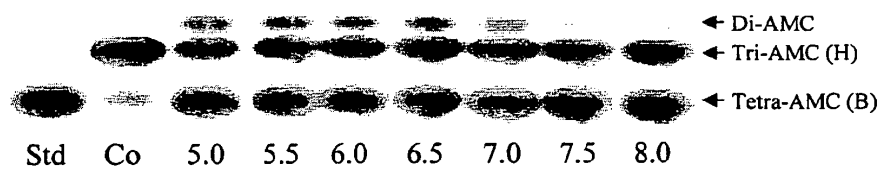


FIGURA 9.

Actividad de α -galactosidasa purificada de N° 2357 con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B a diferentes pH.

A.



B.

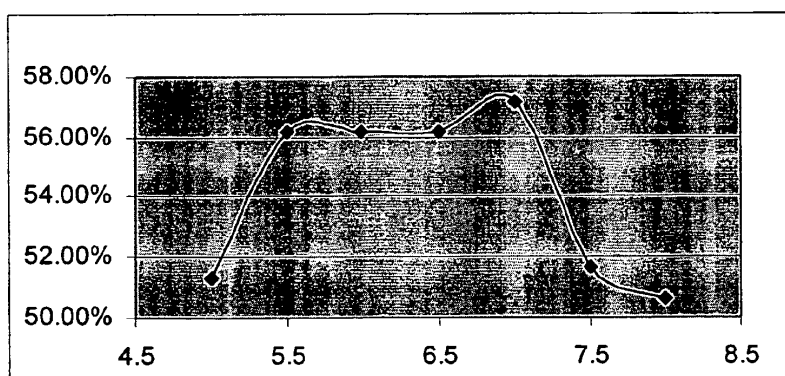


FIGURA 9B.

Análisis de la enzima α -galactosidasa purificada de Streptomyces N° 2357 con agregado de cantidades conocidas de BSA separada por cromatografía con S12

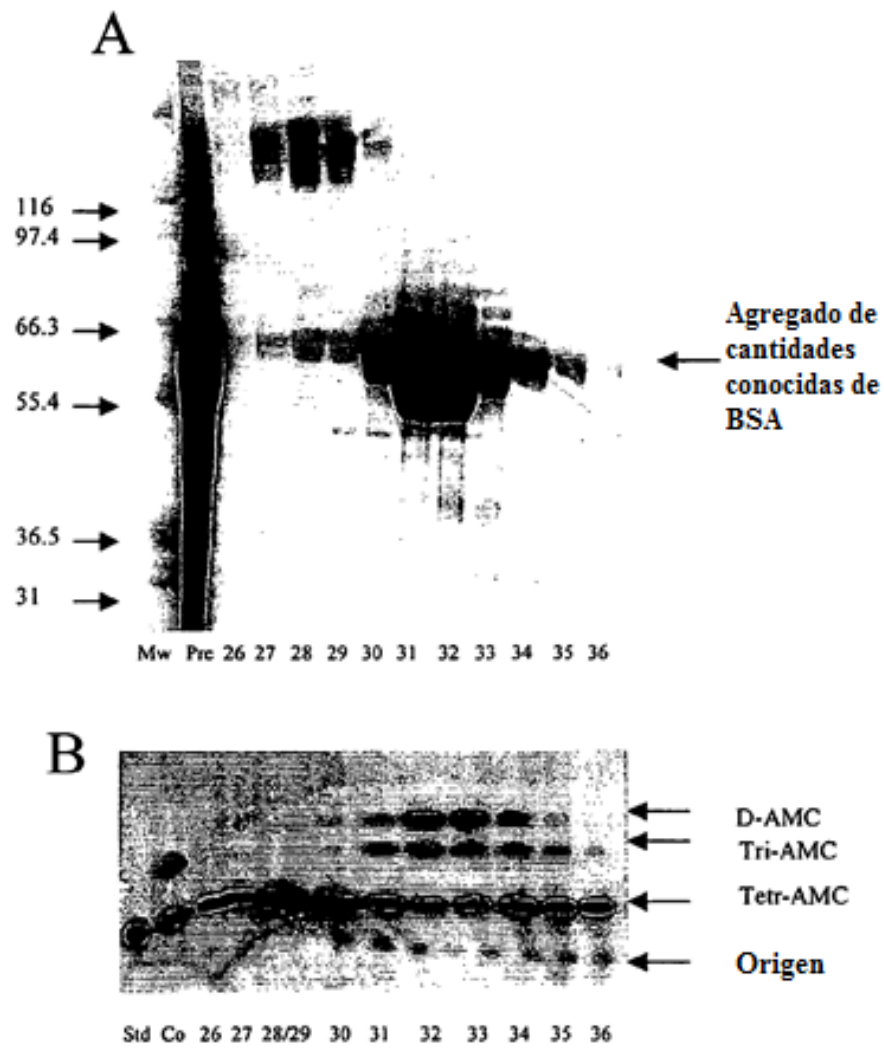


FIGURA 10.

Actividad de la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* con el sustrato tetrasacárido-AMC del grupo A a diferentes pH.

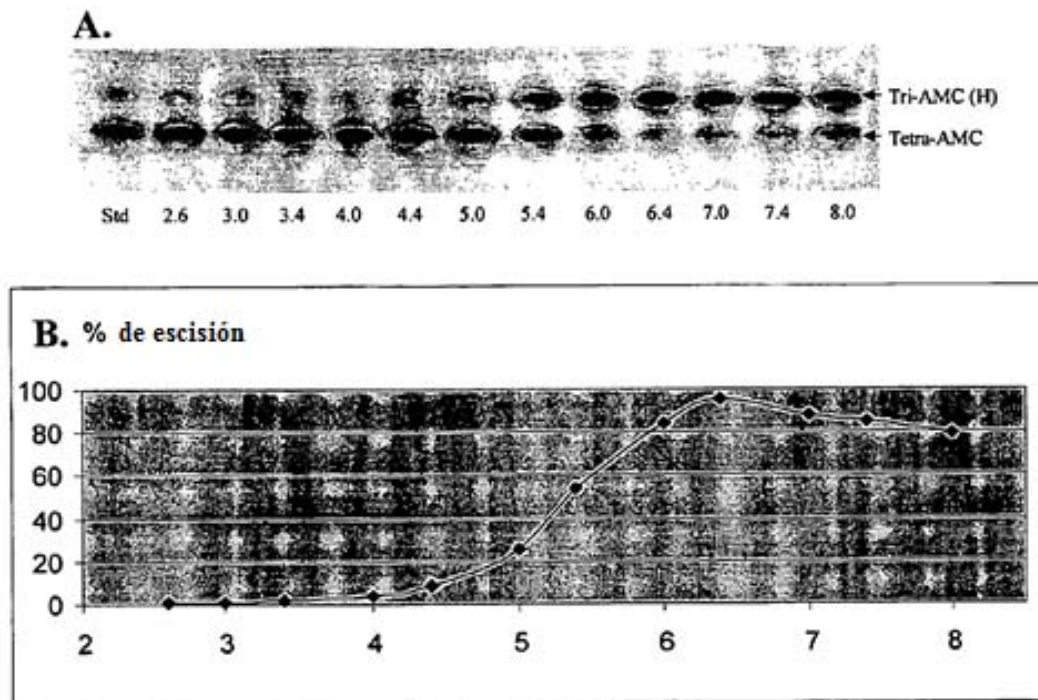


FIGURA 11.

Influencia del sistema de tampón en la conversión enzimática de células sanguíneas A₂ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. Coli*

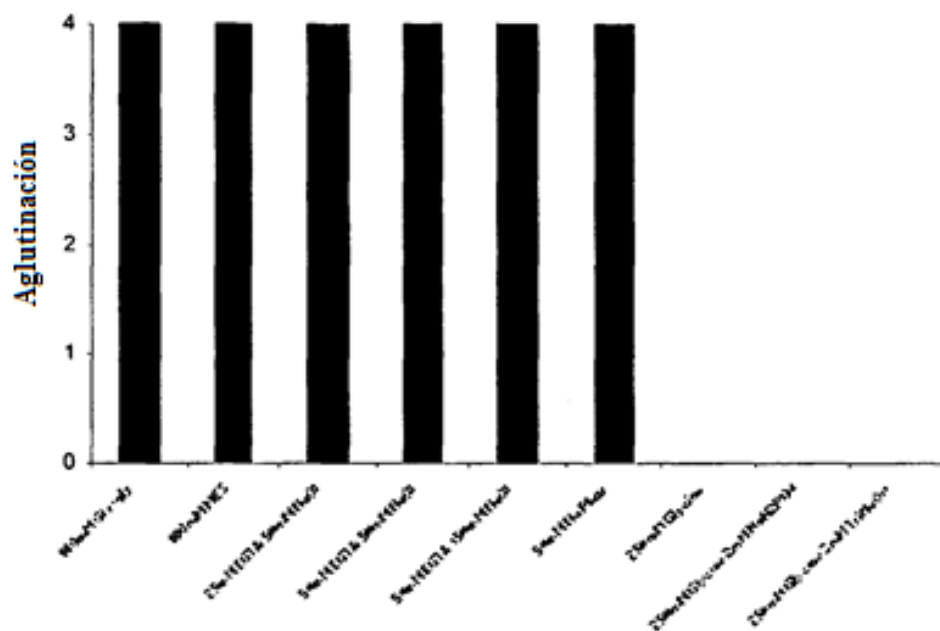


FIGURA 12.

Influencia del pH usando tampón de glicina 250 mM en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*

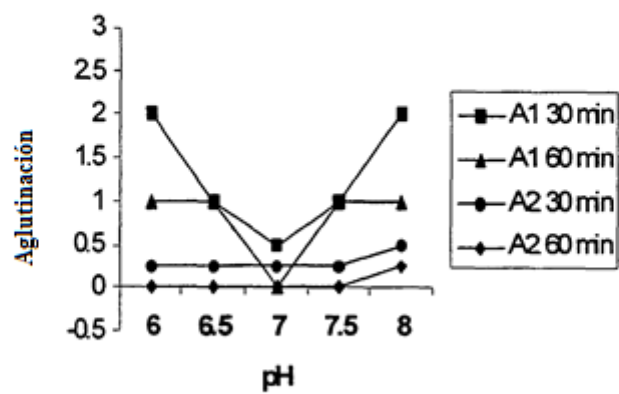


FIGURA 13.

Influencia de la concentración del tampón de glicina en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*

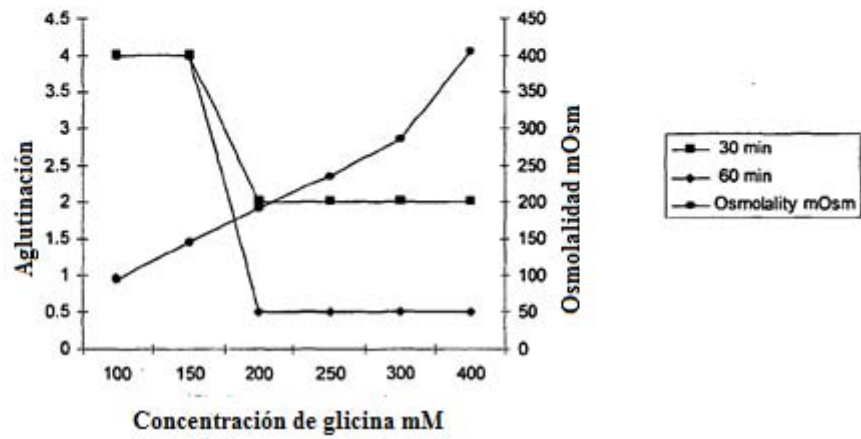


FIGURA 14.

Influencia de la concentración de α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli* en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂

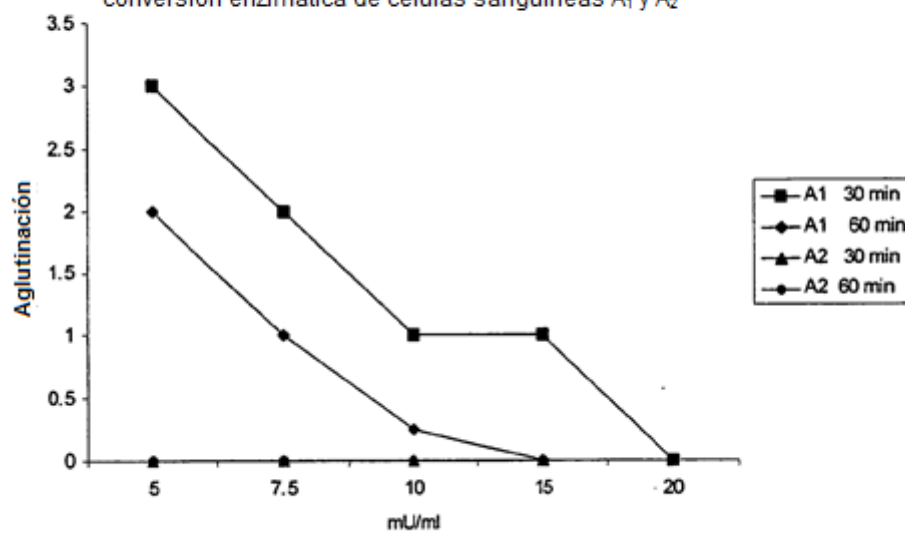


FIGURA 15.

Influencia de la concentración de células (hematocrito) en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*

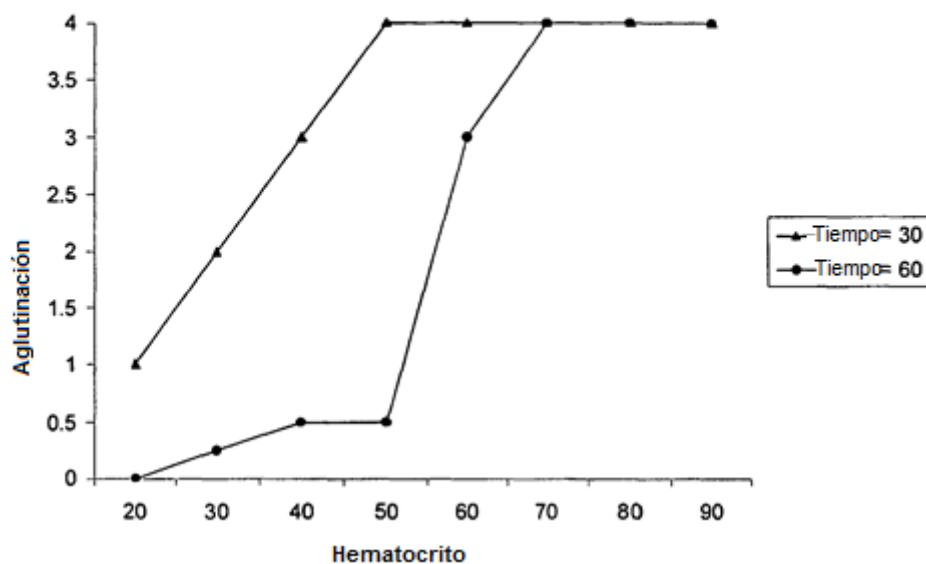


FIGURA 16.

Influencia del tiempo de reacción en la conversión enzimática de células sanguíneas A_1 y A_2 usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*

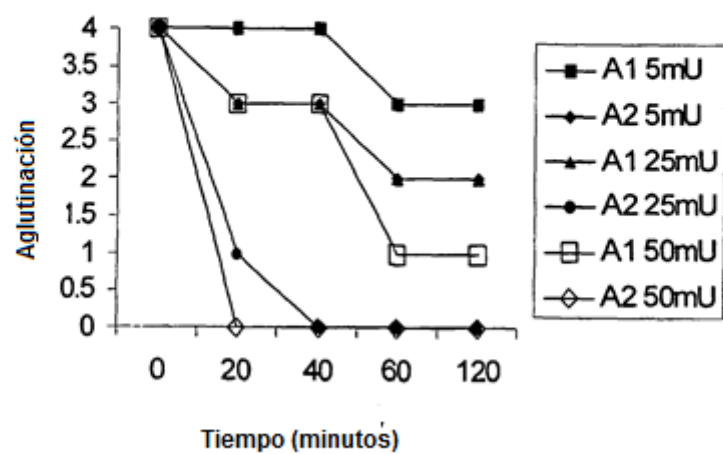


FIGURA 17.

Influencia de la temperatura en la conversión enzimática de células sanguíneas A₁ y A₂ usando la α -N-acetilgalactosaminidasa expresada en *E. coli*

