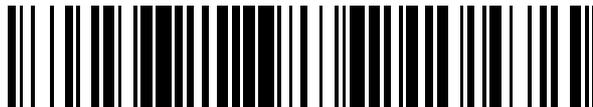


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 413**

51 Int. Cl.:
C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10165152 .9**
96 Fecha de presentación: **31.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2250883**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

54 Título: **α -Galactosidasas novedosas**

30 Prioridad:
31.10.2005 US 731845 P
07.08.2006 US 836000 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2012

73 Titular/es:
Velico Medical, Inc.
100 Cummings Center, Suite 436 H
Beverly MA 01915-6122, US

72 Inventor/es:
Liu, Qiyong Peter y
Clausen, Henrick

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 386 413 T3

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

DESCRIPCIÓN

 α -Galactosidasas novedosas

- 5 Esta invención se refiere a una familia novedosa de polipéptidos que tienen actividades α -galactosidasa, que demuestran especificidades de sustrato únicas y propiedades cinéticas superiores, que se usan para la eliminación de los monosacáridos inmunodominantes en tejidos y productos sanguíneos. Específicamente, esta invención proporciona una familia novedosa de α 3 glicosidasas, usadas para la eliminación enzimática de antígenos de tipo B de productos sanguíneos reactivos para el grupo sanguíneo B y AB, y el antígeno Galili de tejidos animales no humanos, convirtiendo de ese modo éstos en tejidos y células no inmunogénicos y adecuados para trasplante.

Antecedentes de la invención

- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término "productos sanguíneos" incluye sangre completa y componentes celulares derivados de la sangre, incluyendo eritrocitos (glóbulos rojos) y plaquetas.

- 20 Hay más de treinta sistemas de grupos sanguíneos (o tipos), uno de los más importantes de los cuales es el sistema ABO. El sistema se basa en la presencia o ausencia de antígenos A y/o B. Estos antígenos se encuentran en la superficie de eritrocitos y plaquetas así como en la superficie de células endoteliales y la mayor parte de células epiteliales. El principal producto sanguíneo usado para la transfusión son los eritrocitos, que son glóbulos rojos que contienen hemoglobina, cuya principal función es el transporte de oxígeno. La sangre del grupo A contiene antígeno A en sus eritrocitos. De manera similar, la sangre del grupo B contiene antígeno B en sus eritrocitos. La sangre del grupo AB contiene ambos antígenos, y la sangre del grupo O no contiene ningún antígeno.

- 25 Las estructuras de grupo sanguíneo son glicoproteínas y glicolípidos y se ha realizado un trabajo considerable para identificar las estructuras específicas que constituyen los determinantes o antígeno A y B. La especificidad del grupo sanguíneo ABH se determina por la naturaleza y el enlace de los monosacáridos en los extremos de las cadenas de hidratos de carbono. Las cadenas de hidratos de carbono están unidas a una estructura principal de péptido (glicoproteína) o lípido (glicoesfingolípidos), que están unidos a la membrana celular de las células. El monosacárido inmunodominante que determina la especificidad de tipo A es una *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) unida en α 1-3, mientras que el monosacárido correspondiente de la especificidad de tipo B es una galactosa (Gal) unida en α 1-3. Las células de tipo O carecen de cualquiera de estos monosacáridos en los extremos terminales de las cadenas de oligosacáridos, que en su lugar están terminadas con residuos de fucosa (Fuc) unidos en α 1-2.

- 35 Se encuentra una gran diversidad de estructuras de hidratos de carbono del grupo sanguíneo ABH debido a variaciones estructurales en las cadenas de oligosacáridos que portan sacáridos inmunodominantes ABH. La tabla 1 enumera estructuras notificadas en el hombre y aquellas que se han encontrado en glóbulos rojos o en extractos de sangre. Para una revisión, véase, Clausen & Hakomori, *Vox Sang* 56(1): 1-20, 1989. Los glóbulos rojos contienen antígenos ABH en glicoproteínas y glicoesfingolípidos *N*-unidos, mientras que se cree generalmente que los glicanos O-unidos en glicoproteínas de eritrocitos, principalmente glicoforinas, están terminadas por ácido siálico y no con antígenos ABH. Los glicoesfingolípidos de cadena tipo 1 no son productos endógenos de glóbulos rojos, sino que en su lugar se absorben del plasma.

Tabla I:

- 45 Determinantes inmunorreactivos del grupo histosanguíneo ABH de células humanas¹

Nombre	Estructura de hapteno	Tipo de glicoconjugado	Encontrado en RBC	N.º
Tipo A 1, ALe ^d	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glicolípidos N-unidos O-unidos	Glicolípidos	1
Tipo A 1, ALe ^b	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuc α 1 Fuc α 1	Glicolípidos N-unidos O-unidos	Glicolípidos	2
Tipo A 2, A	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glicolípidos N-unidos O-unidos	Glicolípidos N-unidos	3
Tipo A 2, ALe ^v	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuc α 1 Fuc α 1	Glicolípidos N-unidos O-unidos	Glicolípidos?	4
Tipo A 3, O-unido	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuc α 1	O-unidos		5
Tipo A 3, repetitivo	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 2 Fuc α 1 Fuc α 1	Glicolípidos	Glicolípidos	6

ES 2 386 413 T3

Tipo A 4, globo	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuca1	Glicolípido	Glicolípido?	7
Tipo A 4, ganglio	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido		8
Tipo B 1, BLe ^d	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido	9
Tipo B 1, BLe ^b	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuca1 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido	10
Tipo B 2, B	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido N-unido	11
Tipo B 2, BLe ^y	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuca1 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido?	12
Tipo B 3, O-unido	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuca1	O-unido		13
Tipo B 4, globo	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuca1	Glicolípido?	Glicolípido?	14
Tipo B 4, ganglio	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido?		15
Tipo H 1, Le ^d	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido	16
Tipo H 1, Le ^b	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuca1 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido	17
Tipo H 2, H	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido N-unido	18
Tipo H 2, Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuca1 Fuca1	Glicolípido N-unido O-unido	Glicolípido?	19
Tipo H 3, O-unido	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuca1	O-unido		20
Tipo H 3, H-A	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 2 Fuca1 Fuca1	Glicolípido	Glicolípido (A RBC)	21
Tipo H 4, globo	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuca1	Glicolípido	Glicolípido	22
Tipo H 4, ganglio	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido		23
Thomsen-Friedenrich Tf, T	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr	O-unido	O-unido (+SA)	24
Gal-A, T hist. cruz.	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuca1	Glicolípido	Glicolípido (A RBC)	25
Tn, A hist. cruz.	GalNAc α 1-O-Ser/Thr	O-unido	O-unido (+SA)	26

¹Adaptado de Clausen y Hakomori, Vox Sang 56(1): 1-20, 1989. Designaciones: “?” indica posibles estructuras de glicolípido que no se han notificado hasta la fecha.

5 El grupo sanguíneo A y B existe en varios subtipos. Los subtipos del grupo sanguíneo A son los más frecuentes, y hay tres subtipos principales reconocidos del tipo sanguíneo A. Estos subtipos se conocen como A₁, A intermedio (A_{int}) y A₂. Hay diferencias tanto cuantitativas como cualitativas que distinguen estos tres subtipos. Cuantitativamente, los eritrocitos A₁ tienen más sitios A antigénicos, es decir, residuos de N-acetilgalactosamina terminales, que eritrocitos A_{int} que a su vez tienen más sitios A antigénicos que eritrocitos A₂. Cualitativamente, los eritrocitos A₁ tienen una estructura A doblemente repetida en un subconjunto de glicoesfingolípidos, mientras que

células A₂ tienen una estructura H en una estructura A interna en un subconjunto similar de glicolípidos (Clausen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 1199-203, 1985, Clausen *et al.*, J. Biol. Chem. 261(3): 1380-7, 1986). Estas diferencias entre los subtipos A₁ y A débil se piensa se refieren a diferencias en las propiedades cinéticas de variantes de isoenzimas del grupo sanguíneo A responsables de la formación de antígenos A (Clausen *et al.*, J. Biol. Chem. 261(3): 1388-92, 1986). Se cree que las diferencias de subtipos del grupo B son únicamente de naturaleza cuantitativa.

La sangre del grupo A contiene anticuerpos frente al antígeno B. A la inversa, la sangre del grupo B contiene anticuerpos frente al antígeno A. La sangre del grupo AB no tiene ningún anticuerpo, y la sangre del grupo O tiene ambos. Se cree que los anticuerpos frente a estos y otros antígenos de grupo sanguíneo definidos por hidratos de carbono se producen por la exposición continua a un organismo microbiano que porta estructuras de hidratos de carbono relacionadas. Un individuo cuya sangre contiene cualquiera (o ambos) de los anticuerpos anti-A o anti-B no puede recibir una transfusión de sangre que contiene el/los correspondiente(s) antígeno(s) incompatible(s). 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 incompatible transfundido y provocan que los glóbulos rojos transfundidos se aglutinen, o se peguen entre sí. Puede resultar de lo mismo reacciones frente a la transfusión y/o hemólisis (la destrucción de los glóbulos rojos).

Con el fin de evitar reacciones graves frente a la transfusión debido a la presencia de anticuerpos frente a los antígenos del grupo sanguíneo A y B, el grupo sanguíneo del donante y el receptor se igualan antes de las transfusiones de sangre mediante métodos de tipificación. Por ejemplo, un receptor con sangre de tipo A puede transfundirse de manera segura con sangre de tipo A, que contiene antígenos compatibles, pero no sangre de tipo B, que desencadenaría una respuesta inmunitaria adversa en el receptor. Debido a que la sangre de tipo O no contiene ni antígenos A ni B, puede transfundirse a cualquier receptor con cualquier tipo de sangre, es decir, receptores con sangre de los tipos A, B, AB u O. Por tanto, la sangre de tipo O se considera "universal", y puede usarse para todas las transfusiones. Por tanto, es deseable que los bancos de sangre mantengan grandes cantidades de sangre de tipo O. Sin embargo, hay una escasez de donantes con sangre de tipo O. Por tanto, es deseable y útil eliminar los antígenos A y B inmunodominantes en sangre de los tipos A, B y AB con el fin de mantener grandes cantidades de productos sanguíneos universales.

En un intento por aumentar el suministro de sangre de tipo O, se han desarrollado métodos para convertir sangre de tipo A, B y AB en sangre de tipo O. Aunque se ha logrado en el pasado la conversión enzimática de glóbulos rojos del grupo A y el grupo B, estos procedimientos más antiguos tienen varias desventajas, particularmente que requieren excesivas cantidades de enzimas, y las especificidades de muchas enzimas modificadoras de glicanos no se restringen a la escisión de sólo los antígenos del grupo sanguíneo A o B.

Tal como se explicará a continuación, la presente invención proporciona una familia de polipéptidos que tienen especificidades de sustrato altamente refinadas, y mejores propiedades cinéticas, que pueden usarse para generar tejidos y productos sanguíneos que carecen de antígenos inmunodominantes, proporcionando de ese modo un procedimiento comercial eficaz y económico para suministrar, por ejemplo células sanguíneas universales (no inmunogénicas) para trasplante, e incluso tejidos animales para xenotrasplante en seres humanos.

CONVERSIÓN DE CÉLULAS DEL GRUPO SANGUÍNEO B

Se ha logrado la conversión enzimática de sangre de tipo B usando α -galactosidasa de los granos del café (*Coffea canephora*) usando 100-200 U/ml (patente estadounidense n.º 4.427.777; Zhu *et al.*, Arch Biochem Biophys 1996; 327 (2): 324-9; Kruskall *et al.*, Transfusion 2000; 40(11): 1290-8). Se notificó que la actividad específica de la α -galactosidasa de los granos del café era de 32 U/mg usando p-nitrofenilo α -D-Gal, definiéndose una unidad (U) como un μ mol de sustrato hidrolizado por minuto (Zhu *et al.*, Arch Biochem Biophys 1996; 327(2): 324-9). Se realizaron las conversiones enzimáticas a pH 5,5 con aproximadamente 6 mg/ml de enzima a un hematocrito del 80-90%, y las células O convertidas resultantes funcionaban de manera normal en experimentos de transfusión y sin que se observaran parámetros clínicos adversos significativos (Kruskall *et al.*, Transfusion 2000; 40 (11): 1290-8). Estos datos, junto con publicaciones anteriores, demuestran claramente que la conversión enzimática de glóbulos rojos es viable y que tales células O convertidas de grupo enzimático B (B-ECO) pueden funcionar tan bien como células no tratadas de tipo coincidente en medicina de transfusión. No obstante, las cantidades de enzimas requeridas para la seroconversión en estos estudios, incluso con producción recombinante de la enzima, hace que este método para generar células ECO sea poco práctico principalmente por motivos económicos.

Se han notificado reivindicaciones de protocolos para una conversión mejorada de células B usando α -galactosidasa Glycine max recombinante con una actividad específica de aproximadamente 200 U/mg usando 5-10 unidades de enzima/ml de sangre (con un hematocrito del 16%) (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.606.042; 5.633.130; 5.731.426; 6.184.017). Se usó por tanto la α -galactosidasa Glycine max a 25-50 μ g/ml, lo que representa una reducción significativa en 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 actividad específica superior de la α -galactosidasa Glycine max (aproximadamente 6 veces) así como a diferentes

métodos usados para la conversión y evaluación. Las 200 U/ml de enzima usadas en el estudio de Kruskall *et al.*, (Transfusion, 40(11): 1290-8, 2000) se formularon para lograr conversiones de unidad completa (aproximadamente 220 ml de células empaquetadas) a hematocritos del 80-90% y se analizaron meticulosamente mediante tipificación de banco de sangre convencional así como mediante análisis de histocompatibilidad cruzada más sensibles.

5 Además, se evaluó la eficacia de conversión mediante análisis de la supervivencia y la inmunidad inducida en pacientes que recibieron múltiples transfusiones de células convertidas. Se realizaron las conversiones enzimáticas en tubos de ensayo a escala de ml a un hematocrito del 16%, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.606.042 (y 5.633.130; 5.731.426; 6.184.017) con α -galactosidasa Glycine max, y la eficacia de conversión no se evaluó mediante análisis de histocompatibilidad cruzada. La conversión de células a un hematocrito del 16%
10 requería 10 U/ml, mientras que conversiones al 8% requerían 5 U/ml, lo que indica que la conversión a un hematocrito aumentado requiere más enzima aunque no se sometieron a prueba concentraciones celulares superiores. Por tanto, parte de la reducción de las cantidades de proteína enzimática requeridas en comparación con los protocolos notificados por Kruskall *et al.*, (Transfusion 2000; 40(11): 1290-8), está relacionada con la concentración (hematocrito) de células usadas en la conversión, y esto puede representar más de 5-10 veces,
15 aunque no es posible una comparación directa sin experimentación adicional. La patente estadounidense n.º 5.606.042 (y 5.633.130; 5.731.426; 6.184.017) proporciona además mejoras en el tampón de conversión que usa citrato de Na y glicina a pH menos ácido (preferiblemente pH 5,8) e incluye proteína adicional en forma de BSA (albúmina sérica bovina) para la estabilización. De manera interesante, se encontró que el tampón de conversión desarrollado para la α -galactosidasa Glycine max no era aplicable a α -galactosidasa de los granos del café. Aunque
20 puede proporcionarse alguna mejora en la conversión de células B mediante la patente estadounidense n.º 5.606.042 (y 5.633.130; 5.731.426; 6.184.017), queda claro que se requieren más de 0,5 mg de enzima por ml de glóbulos rojos B empaquetados usando el protocolo dado a conocer. Es probable que se requiera considerablemente más enzima que ésta para obtener células completamente convertidas en células O mediante los procedimientos de tipificación más sensibles usados en protocolos de tipificación de banco de sangre
25 convencionales. Además, el protocolo requiere la introducción de proteína extraña adicional (BSA o albúmina sérica humana) así como la exposición de productos sanguíneos a un pH ácido significativo.

Bakunina *et al.* (Bakunina *et al.* Biochemistry (Moscú) 1998, p. 1420) han reivindicado la identificación y el aislamiento de una α -galactosidasa novedosa a partir de la bacteria marina *Pseudoalteromonas* spp. (KMM 701). La
30 preparación enzimática aislada se purificó hasta una actividad específica de 9,8 U/mg usando el sustrato pNP-Gal y tenía un peso molecular aparente mediante filtración en gel de 195 kD. La preparación enzimática escindía eficazmente el sustrato de monosacárido pNP-Gal con una Km aparente para pNP-Gal de 0,29 mM así como varios disacáridos no ramificados con α -galactosa terminal incluyendo melibiosa y Gal α 1-3Gal, y por tanto no muestra alta especificidad por el grupo sanguíneo B. Por tanto, esta enzima escindirá oligosacáridos no ramificados con α -Gal
35 terminal tal como la estructura B lineal así como el antígeno P₁. Se notificó que la enzima tenía un óptimo de pH neutro (es decir, un óptimo de pH que oscila entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,7) y convertía células del grupo sanguíneo B con un tiempo de reacción de incubación de 24 h en células que se tipificaban como células del grupo O. Sin embargo, no se describían detalles del procedimiento de conversión ni del consumo de enzima, y la eficacia de conversión evaluada mediante procedimientos de tipificación convencionales con reactivos de tipificación autorizados sigue por someterse a prueba. Se requerirán probablemente purificación hasta la homogeneidad,
40 clonación y expresión recombinante de la enzima para proporcionar las cantidades y la calidad de la proteína enzimática requeridas para la conversión enzimática de glóbulos rojos.

Se ha dado a conocer (documento U.S.S.N. 10/251.271) la identificación y caracterización parcial de una actividad
45 α -galactosidasa novedosa con alta actividad específica y especificidad de sustrato altamente restringida por el antígeno del grupo sanguíneo B. La actividad enzimática se identificó examinando más de 2.400 aislados bacterianos y fúngicos y se encontró en sólo unas cuantas bacterias. La enzima se purificó parcialmente de lisados celulares de *Streptomyces griseoplanus* cepa n.º 2357 (depósito de la ATCC n.º PTA-4077) y se obtuvo información de la secuencia de aminoácidos parcial.

50 Resulta evidente a partir de lo anterior que se requieren mejoras adicionales en la conversión de células B con el fin de convertir esto en una tecnología práctica y aplicable comercialmente. Las mejoras necesarias incluyen obtener enzimas α -galactosidasa más eficaces y específicas, que permitan que la conversión tenga lugar preferiblemente a pH neutro y sin proteína extraña añadida.

55 ENSAYOS PARA DETERMINAR ACTIVIDADES GLICOSIDASA QUE ESCINDEN α GAL

Los métodos anteriores para la búsqueda, identificación y caracterización de exo-glicosidasas se han basado generalmente en el uso de derivados de monosacáridos sencillos como sustratos para identificar especificidad de
60 sacárido y enlace potencial. Los sustratos de monosacáridos derivatizados, o rara vez oligosacáridos, incluyen sin limitación p-nitrofenilo (pNP), bencilo (Bz), 4-metil-umbreliferilo (Umb) y 7-amino-4-metil-cumarina (AMC). El uso de tales sustratos proporciona herramientas fáciles, rápidas y económicas para identificar actividades glicosidasa, y hace que el examen a gran escala de diversas fuentes de enzimas pueda aplicarse de manera práctica. Sin embargo, las propiedades cinéticas y las especificidades de sustrato finas de las enzimas glicosidasas pueden no reflejarse necesariamente en ensayos con tales estructuras sencillas. También es posible que existan enzimas
65

novedosas con alto grado de especificidad y/o eficacia selectiva por estructuras de glicoconjugados únicas y oligosacáridos complejas, pero que se hayan pasado por alto y sigan sin reconocerse debido a los métodos de análisis. Por tanto, con el fin de identificar y seleccionar la exo-glicosidasa óptima para una estructura de glicoconjugado u oligosacárido compleja, es preferible usar tales estructuras complejas en ensayos usados para examinar fuentes de enzimas. Además, los ensayos preferidos usados para el examen incluyen la selección de propiedades cinéticas preferibles tales como el requisito de pH y el rendimiento sobre sustratos, por ejemplo, unidos a la membrana de células.

En estudios anteriores, todas las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y α -N-acetilgalactosaminidasas (EC 3.2.1.49) usadas para eliminar los antígenos B y A de células sanguíneas se habían identificado y caracterizado usando principalmente derivados de monosacáridos de p-nitrofenilo. De manera interesante, la mayoría de estas enzimas α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas usadas en estudios anteriores son homólogos evolutivos tal como se demuestra mediante similitudes significativas de la secuencia de aminoácidos y ADN. Por tanto, la α -galactosidasa y α -N-acetilgalactosaminidasa humanas son homólogos cercanos (Wang *et al.*, J Biol Chem, 265: 21859-66, 1990), y otras enzimas anteriormente usadas en la conversión de células sanguíneas incluyendo la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo, α -N-acetilgalactosaminidasa de *Acremonium* fúngica y α -galactosidasas bacterianas presentan todas las similitudes de secuencia significativas. El análisis de secuencia de todas las O-glicosidasas hidrolasas conocidas las ha agrupado en 85 familias distintas basándose en el análisis de secuencia, y las α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas mencionadas anteriormente se agrupan en la familia 27 (http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_32.html). Estas enzimas se caracterizan por tener un mecanismo de retención de la catálisis y usan ácido aspártico como nucleófilo catalítico (Henrissat, Biochem Soc Trans, 26(2): 153-6, 1998; Rye & Withers, Curr Opin Chem Biol, 4(5): 573-80, 2000). Se notificó que la estructura primaria de una α -N-acetilgalactosaminidasa bacteriana de *Clostridium perfringens* era distinta y no homóloga a las α -N-acetilgalactosaminidasas eucariotas (Calcutt *et al.* FEMS Micro Lett 214:77-80, 2002), y se agrupa en la familia 36 relacionada de manera distante, que también contiene α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas (http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_32.html). Se pronostica que el mecanismo catalítico de este grupo de enzimas es similar al de las enzimas de la familia 27 porque existe algo de similitud de secuencia entre enzimas de las dos familias.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la eliminación enzimática de antígenos de tipo B de productos sanguíneos reactivos para el grupo sanguíneo A y AB. Específicamente, esta invención proporciona composiciones y métodos para la eliminación enzimática específica de los monosacáridos inmunodominantes que especifican los antígenos del grupo sanguíneo B, concretamente α 1,3-D-galactosa.

En una realización, esta invención proporciona una familia novedosa de polipéptidos homólogos, que tienen un 20% o más de identidad de secuencia de aminoácidos global con SEQ NO. 2. Estos polipéptidos presentan actividad α -galactosidasa a lo largo de un óptimo de pH neutro, y demuestran alta especificidad de sustrato por estructuras del antígeno Galilli o el grupo sanguíneo B, y sin actividad o actividad no significativa con sustratos de monosacáridos α Gal o α GalNAc-pNP. Ciertos miembros de esta familia no muestran actividad o muestran actividad no significativa con Gal unida en α 1-3 lineal. Otros polipéptidos en esta familia escindirán estructuras lineales, pero no mostrarán actividad o mostrarán actividad no significativa con antígenos P y enlaces Gal α 1-4. Los polipéptidos novedosos y la familia génica dada a conocer por la presente invención tienen aplicaciones para su uso en la eliminación de monosacáridos inmunodominantes, α Gal y Galilli, de dianas de oligosacáridos complejos tales como las próximas a los antígenos de hidrato de carbono A y B verdaderos de la superficie de células en productos sanguíneos, y el antígeno Galilli de tejidos animales.

En otro aspecto, esta invención proporciona métodos para la seroconversión de todos los glóbulos rojos del grupo AB y B, dando como resultado la eliminación de antígenos B inmunodominantes de células de tipo B y AB. La eliminación de antígenos B puede determinarse, por ejemplo, mediante tipificación serológica de banco de sangre convencional. Según los métodos de esta invención, los antígenos B se eliminan usando los polipéptidos descritos, que (i) tienen especificidad altamente restringida por antígenos del grupo sanguíneo B, (ii) tienen rendimiento óptimo a pH neutro con oligosacáridos del grupo sanguíneo; y (iii) son activos en la conversión de glóbulos rojos a un pH de ligeramente ácido a ligeramente básico, y preferiblemente neutro (pH de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8). Estos métodos comprenden las etapas de: (a) poner en contacto un producto sanguíneo con uno o más de estos polipéptidos, en condiciones de pH aproximadamente neutro, durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar los antígenos B inmunodominantes, y (b) eliminar el polipéptido y los fragmentos de antígeno digeridos del producto sanguíneo seroconvertido.

En otra realización, esta invención proporciona métodos para la eliminación de todos antígenos B detectables de los glóbulos rojos del grupo A o B, usando α -galactosidasas que (i) tienen especificidad altamente restringida por antígenos del grupo sanguíneo B; y (ii) son activas en la conversión de glóbulos rojos con oligosacáridos del grupo sanguíneo, a lo largo de un intervalo de pH aproximadamente neutro (aproximadamente de pH 6 a

aproximadamente 8).

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan eritrocitos seroconvertidos. En una realización, se caracterizan los eritrocitos seroconvertidos como: (i) que se han convertido de un eritrocito de tipo B o tipo AB en un eritrocito no B (que no tiene antígenos B detectables, tal como se determina mediante tipificación serológica de banco de sangre convencional) seroconvertido usando un polipéptido de la familia descrita en el presente documento.

Aún en otro aspecto, la invención incluye glóbulos rojos modificados que comprenden: un eritrocito del grupo B o un eritrocito del grupo AB que carece de epítomos B inmunodominantes pero presenta epítomos α 1-4Gal, incluyendo los antígenos del grupo sanguíneo P1 y P^K. En una realización, los glóbulos rojos carecen sustancialmente de epítomos B inmunodominantes tal como se determina mediante tipificación serológica o ensayos de hemaglutinación, y también carecen de estructuras de Gal unida en α 1-3 lineal. En otra realización, los glóbulos rojos carecen sustancialmente de epítomos B inmunodominantes tal como se determina mediante tipificación serológica o ensayos de hemaglutinación, pero conservan estructuras de Gal unida en α 1-3 lineales.

Aún en otro aspecto, la invención incluye glóbulos rojos modificados preparados mediante el método que comprende: obtener un eritrocito del grupo B o un eritrocito del grupo AB, suspender el eritrocito en una disolución tampón que tiene un pH aproximadamente neutro (de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 8), y poner en contacto el eritrocito con un polipéptido de alfa galactosidasa escindiendo de ese modo sustancialmente del eritrocito los epítomos B inmunodominantes. En diversas realizaciones, la enzima usada para procesar el eritrocito incluye al menos 10 aminoácidos contiguos del polipéptido (o la secuencia de nucleótidos que codifica para el mismo) tal como se especifica por: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, el procesamiento enzimático del eritrocito se realiza a pH desde aproximadamente 6,0 hasta pH aproximadamente 8,0, preferiblemente pH de aproximadamente 6,5 a pH de aproximadamente 7,5, o más preferiblemente pH de aproximadamente 7,0 a pH de aproximadamente 7,5. En realizaciones actualmente preferidas, el procesamiento enzimático del eritrocito se realiza usando 0,01-1000 μ g de enzima por ml de glóbulos rojos, preferiblemente 0,1-500 μ g de enzima por ml de glóbulos rojos, más preferiblemente 1-100 μ g de enzima por ml de glóbulos rojos. Lo más preferiblemente, el procesamiento enzimático de antígenos de la preparación de eritrocitos se consigue usando 1-10 μ g de enzima/ml de glóbulos rojos.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un método de modificación de glóbulos rojos, que comprende: obtener un eritrocito del grupo B o del grupo AB, suspenderlo en una disolución tampón que tiene un pH aproximadamente neutro, y ponerlo en contacto con una enzima que tiene al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia de polipéptido especificada como o codificada por: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, escindiendo de ese modo los epítomos B inmunodominantes en el eritrocito del grupo B o del grupo AB tal como se determina mediante tipificación serológica o ensayos de hemaglutinación. En una realización, los glóbulos rojos carecen sustancialmente de epítomos B inmunodominantes tal como se determina mediante tipificación serológica o ensayos de hemaglutinación, y también carecen de estructuras de Gal unida en α 1-3 lineales. En otra realización, los glóbulos rojos carecen sustancialmente de epítomos B inmunodominantes tal como se determina mediante tipificación serológica o ensayos de hemaglutinación, pero conservan estructuras de Gal unida en α 1-3 lineales.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un método de tratamiento de un sujeto, que comprende: identificar un sujeto que necesita sangre de tipo A, O o AB, siendo el sujeto seropositivo para anticuerpos anti-B; obtener una preparación de glóbulos rojos modificados de células B seroconvertidas, u obtener la misma mediante los métodos descritos en el presente documento, y; transfundir la preparación de glóbulos rojos modificados en el sujeto, en el que el sujeto no rechaza de manera inmunológica los glóbulos rojos transfundidos.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un polipéptido purificado, teniendo el polipéptido al menos 10 aminoácidos contiguos de las secuencias: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, en las que la enzima presenta actividad α 3 galactosidasa, y un óptimo de pH neutro. En ciertas realizaciones, la enzima purificada comprende: un polipéptido que tiene al menos 10 aminoácidos de la siguiente secuencia numerada consiguientemente cuando se alinea con SEQ ID. NO:2: M en el residuo 10; G en el residuo 47; G en el residuo 84; Y en el residuo 86; Y en el residuo 99; N en el residuo 102; K en el residuo 114; T en el residuo 127; G en el residuo 130; G en el residuo 132; G en el residuo 139; N en el residuo 156; D en el residuo 160; P en el residuo 164; G en el residuo 205; R en el residuo 277; R en el residuo 281; F en el residuo 287; G en el residuo 308; Q en el residuo 312; I en el residuo 317; R en el residuo 333; D en el residuo 340; G en el residuo 346; G en el residuo 349; G en el residuo 360; D en el residuo 363; D en el residuo 364; N en el residuo 367; H en el residuo 369; G en el residuo 370; T en el residuo 371; G en el residuo 396; E en el residuo 462; N en el residuo 463; T en el residuo 465; T en el residuo 467; P en el residuo 468; R en el residuo 483; G en el residuo 484; L en el residuo 486; T en el residuo 489; N en el residuo 498; I en el residuo 508; D en el residuo 513; W en el residuo 517; E en el residuo 519; G en el residuo 521; D en el residuo 525; I en el residuo 528; N en el residuo 531; F en el residuo 533; I en el residuo 549; P en el residuo 553; I en el residuo 573; A en el residuo 590; G en el residuo 595; N en el residuo 601; e I en el residuo 629; en la que el polipéptido tiene una identidad de al menos el 20% con SEQ ID

NO: 2, y en la que el polipéptido también tiene actividad $\alpha 3$ galactosidasa. En una realización, el polipéptido demuestra especificidad por estructuras de alfa galactosa ramificadas pero no estructuras de alfa galactosa lineales. En otra realización, el polipéptido demuestra especificidad por estructuras de alfa galactosa lineales pero no estructuras de $\alpha 1-4$ gal. En una realización, la enzima purificada comprende un polipéptido que incluye nueve aminoácidos contiguos que tienen la secuencia DD(P/A)(V/I)N(V/I)HGT (SEQ ID NO: 10). En otra realización, la enzima purificada comprende un polipéptido que tiene veintiún aminoácidos contiguos que tienen la secuencia: DXXXW(Y/F)E(S/T)GXXXD(L/V)(L/T)I(K/R)XNXF, (SEQ ID NO: 11) en la que X puede ser cualquier aminoácido. En una realización, la enzima purificada incluye equivalentes funcionales de la misma que tienen actividad $\alpha 3$ galactosidasa. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye una variante truncada que carece de una secuencia señal.

En otro aspecto, la invención incluye un método de producción de una enzima recombinante, que comprende: obtener un ácido nucleico que codifica para: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; expresar el ácido nucleico en una célula transfectada con el mismo; inducir la expresión del ácido nucleico que codifica para la enzima; y purificar la enzima expresada a partir de la célula. En diversas realizaciones, la invención incluye una célula procarionota que no se produce de manera natural, que comprende: un vector de expresión no encontrado en una célula procarionota de tipo natural, teniendo el vector de expresión una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene la secuencia especificada por: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. Se apreciará que debido a la degeneración del código genético, la enzima recombinante puede optimizarse para su expresión en el organismo huésped particular, tal como conocen generalmente los expertos en la técnica.

En una realización actualmente preferida, la invención se refiere a una familia de α -galactosidasas, y más particularmente al uso de éstas para catalizar la eliminación de sustancialmente todos de los antígenos B inmunodominantes en eritrocitos B y AB. Las α -galactosidasas más preferidas son las que son activas a un pH neutro, y catalizan la eliminación de los antígenos B inmunodominantes en eritrocitos B y AB y no otros epítomos de α Gal de hidratos de carbono de cadena lineal unidos a lípidos tales como antígeno P1 (Gal $\alpha 1,4$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1,3$ Gal $\beta 1,4$ Glc $\beta 1$ ceramida) y antígeno Pk (Gal $\alpha 1,4$ Gal $\beta 1,4$ Glc $\beta 1$ ceramida, también conocido como globotriosilceramida (Gb3Cer)/CD77). Las α -galactosidasas particulares de esta familia se describen a continuación como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, el fragmento SEQ ID NO: 1 y la secuencia consenso de SEQ ID NO: 9.

Aún en otro aspecto, esta invención proporciona métodos para el examen y la selección de enzimas con las características únicas preferidas descritas anteriormente y métodos de purificación y secuenciación de aminoácidos útiles para la clonación y expresión de los genes que codifican para estas enzimas. Estos métodos proporcionan aislados bacterianos que producen tales enzimas preferidas. Tales otras aplicaciones y características de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

Aún en otro aspecto, esta invención proporciona composiciones y métodos para la eliminación enzimática de los monosacáridos inmunodominantes en tejidos, tales como un tejido para xenotrasplante. Específicamente, la presente invención proporciona una familia novedosa de $\alpha 3$ -glicosidasas (tal como se describió anteriormente), usadas para la eliminación enzimática del antígeno Galili de tejidos animales no humanos, convirtiendo de ese modo éstos en tejidos no inmunogénicos adecuados para el trasplante. Los ejemplos de una $\alpha 3$ -galactosidasa incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de SEQ ID NO: 2-9.

El método de preparación de un tejido para xenotrasplante comprende obtener un tejido de una fuente animal no humana, incubar el tejido con un polipéptido que tiene actividad $\alpha 3$ -galactosidasa eliminado de ese modo residuos de galactosa terminal unida en $\alpha 1-3$ inmunodominantes del tejido, y aislar el tejido del polipéptido y la galactosa eliminada de manera enzimática, haciendo de ese modo que el tejido sea adecuado para xenotrasplante en seres humanos. En una realización, el tejido de una fuente animal no humana es tejido conjuntivo porcino. En otra realización, el tejido conjuntivo porcino es un ligamento.

En otra realización, el tejido de una fuente animal no humana es un órgano que incluye hígado, riñón o corazón. Aún en otra realización, el tejido de una fuente animal no humana es colágeno inyectable no inmunogénico; xenoinjertos óseos; tejido blando y xenoinjertos de tejido blando reducido en proteoglicano; válvulas cardíacas de xenoinjerto; xenoinjertos de menisco; y matrices de tejido, en el que los tejidos son tejidos deficientes en $\alpha 1,3$ -galactosa que se han modificado usando una $\alpha 3$ -galactosidasa. Los ejemplos de una $\alpha 3$ -galactosidasa incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de SEQ ID NO: 2-9.

60 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el análisis de HPTLC de la actividad α -galactosidasa en el sobrenadante de cultivo de *Streptomyces griseoplanus* hecho crecer en medios ricos (véase la tabla II para las formulaciones) con los sustratos de tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se llevó a cabo la fermentación en durante 1 día en medio YM y 3 días en medio BP, a 30°C, 220 rpm. Se realizaron los ensayos mezclando volúmenes iguales del

sobrenadante de cultivo y B-tetra 0,1 mM en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8), y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se tomó una muestra de un µl de cada reacción y se aplicó rápidamente sobre HPTLC. Designaciones: NE, sin control enzimático; Control, reacción de control positivo usando α-galactosidasa de los granos del café; CS, sobrenadante de cultivo de *S. griseoplanus*; S, sustrato, es decir, tetrasacárido B; B-tetra, tetrasacárido B; H-tri, trisacárido H; Origen: la posición en HPTLC cuando se aplicaron las muestras. Se reveló la placa de CCF en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8). Se exploró la placa y se fotografió mediante un instrumento Bio-Rad Fluor-S Multilmager con el software Quantity One 4.1.1.

La figura 2 ilustra una análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de sobrenadantes de cultivo de *Streptomyces griseoplanus*, recuperados de cultivos hechos crecer en medios mínimos con 18 fuente de carbono diferentes, con el sustrato de tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se realizaron los ensayos mezclando volúmenes iguales de cada sobrenadante de cultivo y B-tetra 0,025 mM en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8), y se incubaron a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de un µl de cada reacción a 1 h y se colocó sobre una placa de CCF. Las fuentes de carbono, indicadas por el número 1-18 en la parte superior del panel, son 18 azúcares diferentes usados en la fermentación tal como se muestra en la tabla III. Designaciones: B-tetra: tetrasacárido B, el sustrato; H-tri: trisacárido H, el producto del sustrato B-tetra mediante escisión con α-galactosidasa (los productos que se mueven rápidamente por encima de H-tri indican la presencia de fucosidasa y β-galactosidasa en los sobrenadantes de cultivo que provocan degradación adicional de trisacárido H para dar di y monosacáridos). Fermentaciones: se descongelaron reservas criogénicas de *Streptomyces griseoplanus* y se inocularon en YM (-1:5-10, v/v) y se incubaron a 30°C, 220 rpm, durante 24 h. Se hizo pasar el cultivo sobre medios BP (-1:20, v/v) y se continuó la fermentación durante 72 h. Los micelios, recogidos a partir de 100 ml de cultivo BP mediante centrifugación, se lavaron 3 veces usando medios mínimos basales (los medios mínimos carecen de fuente de carbono y aditivos de metal/vitamina traza) para eliminar los medios ricos tanto como sea posible. Entonces se resuspendió el sedimento en 100 ml de medios mínimos basales 2X con aditivos. Entonces se alicuotó la suspensión de micelios en tubos cónicos de 50 ml a 2,5 ml/tubo. Entonces se añadieron diferentes fuentes de carbono y agua a una concentración final del 0,5% y un volumen final de 5,5 ml. Se sometió a prueba cada fuente de carbono por duplicado. Se incubaron los 36 cultivos de 5,5 ml de cada uno, con 18 fuentes de carbono diferentes, a 30°C, 220 rpm. Se tomó una muestra de una alícuota de 0,16 ml de cultivo de cada tubo a las 43 y 71 horas.

La figura 3 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de sobrenadante de cultivo de *Streptomyces griseoplanus* hecho crecer en medios mínimos con o bien galactosa o bien lactosa como única fuente de carbono con el sustrato de tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se realizaron los ensayos mezclando volúmenes iguales de cada sobrenadante de cultivo y B-tetra 0,1 mM en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8), y se incubaron a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de un µl de cada reacción a los 20 min. y se aplicó sobre una placa de HPTLC su para análisis. Designaciones: B-tetra: tetrasacárido B, el sustrato; H-tri: trisacárido H, el producto del sustrato B-tetra mediante escisión con α-galactosidasa (los productos que se mueven rápidamente por encima de H-Tri indican la presencia de fucosidasa y β-galactosidasa en los sobrenadantes de cultivo que provocan degradación adicional de H-Trisacárido para dar di y monosacáridos); Fuente de carbono: n.º 4, galactosa; n.º 7, lactosa; NE, sin control enzimático; Control, reacción de control positivo usando α-galactosidasa de los granos del café.

La figura 4 ilustra un análisis de HPTLC del ensayo enzimático de actividad α-galactosidasa en la disolución de proteína tras hacer pasar por la columna CEX o DEAE el sustrato B-tetra. Aproximadamente 450 ml de sobrenadante de *Streptomyces griseoplanus*, recogidos a partir de 800 ml de cultivo en una fermentación en un fermentador de 1 litro hecho crecer en medios mínimos con galactosa, almacenados congelados a -80°C, se descongelaron durante 24 h a 4°C y se centrifugaron durante 30 min. a 4°C, 20.000 rpm. Se hizo pasar el sobrenadante recuperado a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) de 15 ml (Macro-Prep High S Support, BioRad, n.º de cat. 156-0031), equilibrada previamente con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8). Se recogió la fracción no retenida que contenía la actividad enzimática. Se lavó secuencialmente la columna con 40 ml de tampón de equilibrado, 40 ml del mismo tampón con un pH ligeramente aumentado (7,3). Se agruparon la fracción no retenida y los lavados y se cargaron directamente en una columna de DEAE de 2,5 ml (DEAE Sepharose, Sigma, n.º de cat. DEF100) equilibrada previamente con tampón de equilibrado CEX y se recogió la fracción no retenida. Se lavó la columna con 50 ml de tampón de equilibrado CEX para eliminar la enzima residual de la columna. Se concentró la disolución de proteína agrupada de la fracción no retenida en DEAE y el lavado (~600 ml) usando dispositivos de filtro centrífugo Centricon Plus 80 (Millipore, n.º de cat. UFC5LGC02) y se intercambió el tampón en NaPO₄ 10 mM (pH 7,0) en el mismo dispositivo hasta un volumen final de 23 ml.

La figura 5 ilustra un análisis de HPTLC de la actividad α-galactosidasa en diversas fracciones de la etapa de hidroxiapatita con el sustrato B-tetra. Se cargó la muestra de proteína en NaPO₄ 10 mM, pH 7,0, en una columna de hidroxiapatita de 2,5 ml (Bio-Gel HT Hydroxyapatite, Bio-Rad n.º de cat. 130-0150), equilibrada previamente con NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). Se lavó la columna con tampón de equilibrado y se lavó/eluyó gradualmente con una cantidad creciente de NaPO₄ (de 10 a 100 mM). No puede detectarse actividad en la fracción no retenida, indicando la unión eficaz de la enzima a la columna en presencia de NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). La aparición de actividad enzimática en el lavado con NaPO₄ 30 mM y la carencia casi completa de actividad en el lavado con NaPO₄ 100 mM indica la elución simple de la enzima de la columna de hidroxiapatita usando tan sólo NaPO₄ 30-50 mM (pH 7,0). Designaciones: Pre, disolución de proteína antes de cargarse sobre la columna; FT, fracción no retenida.

5 La figura 6 ilustra el resultado del análisis de HPTLC de la actividad α -galactosidasa en fracciones de la etapa de Cibacron Blue 3GA con el sustrato B-tetra. Se diluyeron las fracciones con actividad agrupadas de la etapa de hidroxapatita 1:1 con H₂O y se aplicaron sobre una columna Cibacron Blue de 2,5 ml (Cibacron Blue 3GA, Sigma, n.^o de cat. C-1285), equilibrada con Tris 10 mM (pH 7,5). Se lavó la columna con el tampón de equilibrado y se lavó/eluyó adicionalmente con tampón de equilibrado con una cantidad aumentada de sal tal como se indica en la parte inferior del panel. Se distribuyó la actividad enzimática entre lavados con NaCl 100 y 400 mM. Designaciones: Pre, disolución de proteína antes de cargarse sobre la columna; FT, fracción no retenida.

10 La figura 7 ilustra un análisis de HPTLC de la actividad α -galactosidasa en diversas fracciones de la etapa de AEX con el sustrato B-tetra. Se concentró la agrupación de las fracciones con actividad enzimática a partir de Cibacron Blue y se intercambió el tampón en Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5), hasta un volumen final de 3,7 ml. Se cargó la disolución de proteína en una columna AEX de 1 ml (Macro-Prep High Q Support, Bio-Rad n.^o de cat. 156-0051), equilibrada previamente con Tris 40 mM, NaCl 10 mM, pH 8,5. En primer lugar se lavó la columna con tampón de equilibrado y entonces se lavó/eluyó con el mismo tampón que contenía una cantidad creciente de sal tal como se indica en la parte inferior del panel. Designaciones: Pre, disolución de proteína antes de cargarse sobre la columna; FT, fracción no retenida; lavados/eluatos, lavado de la columna y/o muestras de elución; [NaCl] (mM), la concentración de sal en el tampón de elución/lavado; n.^o de fracción, fracciones recogidas en cada etapa de lavado/elución; B-tetra, tetrasacárido B, el sustrato; H-tri, trisacárido H, el producto (el producto que se mueve más rápido por encima de H-tri indica la presencia de actividad fucosidasa contaminante en la muestra de proteína que produce degradación adicional de trisacárido H para dar disacárido).

25 La figura 8 ilustra un análisis de SDS-NuPAGE (gel Bis-Tris al 4-12% Novex con tampón MOPS, teñido con un kit de tinción con plata SilverQuest, patrón no teñido Mark12, todos productos de Invitrogen) de la actividad α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* purificada mediante AEX. El análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de la fracción n.^o 3 de la muestra de lavado/elución a cada concentración de sal en la etapa de AEX tal como se muestra en la figura 7, se colocó en la parte superior del gel para una fácil comparación de la actividad enzimática y banda(s) de proteína sobre el gel. Una única banda de proteína, de ~ 70 kDa, indicada por una flecha en el lado derecho del panel marcada con una supuesta α -galactosidasa, se muestra en la actividad α -galactosidasa pico. Designaciones: B-tetra, tetrasacárido B, el sustrato; H-tetra, trisacárido H, el producto.

30 La figura 9 ilustra análisis comparativos de fracciones de cromatografía S12 de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* parcialmente purificada mediante SDS-NuPAGE y ensayos de actividad enzimática usando tetrasacárido B, analizada por HPTLC. La supuesta banda de α -galactosidasa de 70 kD se indica mediante una flecha en el lado derecho del panel usando un marcador de peso molecular Rainbow (Amersham, n.^o de cat. RPN800). Designaciones: Control, NEB A-zima de concentración conocida; B-tetra, tetrasacárido B, el sustrato; H-tri, trisacárido H, el producto.

40 La figura 10 ilustra la alineación del péptido obtenido mediante secuenciación de Edman del digesto de tripsina fraccionado por HPLC de una α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* novedosa (SEQ ID NO: 1), con una proteína hipotética de *Streptomyces avermitilis* (n.^o de registro de GenBank BAC74979,1, GI:29610934, SEQ ID NO: 2). Los aminoácidos en SEQ ID NO: 2 que corresponden a los de SEQ ID NO: 1 están subrayados. Se obtuvo la alineación mediante análisis BLAST del péptido usando "búsqueda para coincidencias cortas, casi exactas" frente a la base de datos nr del NCBI [(puntuación = 51,5 bits (114), esperado = 3e-06; Identities = 18/29 (62%), positivos = 24/29 (82%), huecos = 0/29 (0%)]. La secuencia de aminoácidos se muestra en un código de una única letra. Los residuos idénticos se indican por letras mayúsculas en negrita, residuos similares por letras en negrita simples y residuos diferentes por letras minúsculas.

50 La figura 11 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de sobrenadante de cultivo y lisado de sedimento de *Streptomyces avermitilis* hecho crecer en medios YM (véase la tabla II para las formulaciones) con el tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC y sustratos de 4-metilumbelliferil α -D-galactopiranosido (α -Gal pNP). La fermentación se llevó a cabo durante 3 días a 30°C, 220 rpm. Se realizaron los ensayos mezclando volúmenes iguales del sobrenadante de cultivo y B-tetra 0,1 mM o 0,5 mM de α -Gal pNP en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8) y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Se tomó una muestra de un μ l de cada reacción y se aplicó rápidamente sobre HPTLC. Designaciones: NE, sin control enzimático; Control, reacción de control positivo usando α -galactosidasa de los granos del café; CS, sobrenadante de cultivo de *S. avermitilis*; PT, lisado de sedimento; B-tetra, tetrasacárido B; H-tri, trisacárido H; MU, 4-metilumbeliferona, el producto de escisión de α -Gal pNP; Origen: la posición en HPTLC cuando se aplicaron las muestras. Se reveló la placa de CCF en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8). Se exploró la placa y se fotografió mediante un instrumento Bio-Rad Fluor-S Multilmager con el software Quantity One 4.1.1.

65 La figura 12 ilustra la alineación de secuencias de proteína de la supuesta α -galactosidasa novedosa de *Streptomyces avermitilis* (SEQ ID NO: 2) con varios de los primeros aciertos de proteínas de funciones desconocidas mediante análisis BLAST de SEQ ID NO: 2 frente a la base de datos nr del NCBI. Se realizó la alineación usando alineación múltiple CLUSTALW (NPS@: Network Protein Sequence Analysis, TIBS 2000: 25;147-

150, Combet C., Blanchet C., Geourjon C. y Deléage G.). Datos de alineación: longitud de alineación: 665; identidad (*) : 59 es el 8,87%; fuertemente similar (:): 86 es el 12,93%; débilmente similar (.) : 42 es el 6,32%; diferente: 478 es el 71,88 %. Las secuencias son tal como sigue: SA (625 residuos SEQ ID NO: 2); BT α (568 residuos SEQ ID NO: 3); BF α 1 (605 residuos SEQ ID NO: 4); BF α 2 (605 residuos SEQ ID NO: 5); BF β 1 (595 residuos SEQ ID NO: 6); BF β 2 (595 residuos SEQ ID NO: 7); BT β (615 residuos SEQ ID NO: 8). SEQ ID NO: 9 es una secuencia consenso de las secuencias SEQ ID NO: 2-8. Designaciones: SA, BT y BF, las supuestas α -galactosidasas de *Streptomyces avermitilis* MA-4680, *Bacteroides thetaotaomicron* VPI-5482 y *Bacteroides fragilis*, respectivamente; α y β : 2 copias diferentes de α -galactosidasas de *B. thetaotaomicron* VPI-5482; α 1 y β 1: 2 copias diferentes de α -galactosidasas de *B. fragilis* YCH46; α 2 y β 2: dos copias diferentes de α -galactosidasas de *B. fragilis* NCTC 9343.

La figura 13 ilustra un análisis de HPTLC de las actividades enzimáticas, de lisados celulares completos del sedimento celular de cultivos inducidos por IPTG de clones de *E. coli* (que contienen plásmidos que expresan el gen de α -galactosidasa recombinante de *Streptomyces avermitilis*), con el sustrato de tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se añadió un ml de medio TB con antibióticos (48,2 g de EZmix Terrific Broth, Sigma T-91790, 8 ml de glicerol, 34 mg de cloranfenicol y 30 mg de kanamicina por medio litro) a cada microtubo de 1,5 ml que contenía el tapón de agar que portaba una única colonia. Se cerró la tapa y se realizó la incubación durante la noche a 37°C, 250 rpm. Se inoculó medio ml de un cultivo durante la noche en 10 ml de medio en un tubo cónico de 50 ml y se realizó la incubación en las mismas condiciones. La densidad celular alcanzó 0,3-0,6 de DO a 600 nm en aproximadamente 2 h a 220 rpm. Se retiró el cultivo del agitador y se mantuvo a temperatura ambiente durante ~20 min. Mientras tanto, se redujo la temperatura del incubador hasta ~26°C. Entonces se añadió IPTG a cada cultivo a una concentración de 0,1 mM y volvieron a colocarse todos los cultivos en el agitador y se agitaron a 220 rpm, para iniciar la inducción de proteína. Se retiró una alícuota de 0,5 ml de manera aséptica de cada tubo en 1 h y se sedimentaron las células con una centrifuga de sobremesa en el parámetro más alto durante 5 min. Se añadieron veinte ml de tampón de lisis (0,9 ml de NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM, pH 6,8, 0,1 ml de BugBuster 10X, Novagen 70921-4, 1 mg de lisozima/ml, y 5 μ l de Benzonase, Novagen 70664-3, por mililitro de tampón de lisis) a cada tubo para suspender el sedimento y lisar las células, lo que se ayudó pipeteando la suspensión hacia arriba y hacia abajo unas cuantas veces. Se completó la lisis en 5-10 min. Se analizó posteriormente una alícuota (2,2 μ l) del lisado completo bruto mezclando con un volumen igual de una disolución de sustrato que contenía 0,1 mM de B-tetra en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8) y se incubó a temperatura ambiente. Se retiró un μ l de la digestión en 10 min. y se colocó sobre una placa de HPTLC. Designaciones: Control, reacción de control positivo usando α -galactosidasa de los granos del café; 1 y 2: lisados completos de dos colonias individuales del mismo constructo que expresa la galactosidasa novedosa de longitud completa de *Streptomyces avermitilis*; B-tetra, tetrasacárido B; H-tri, trisacárido H; Origen: la posición en HPTLC cuando se aplicaron las muestras. Se reveló la placa de CCF en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8). Se exploró la placa y se fotografió mediante un instrumento Bio-Rad Fluor-S Multimager con el software Quantity One 4.1.1. La figura 14 confirmó que la B-zima novedosa puede expresarse de manera eficaz en *E. coli*, pero como cuerpos de inclusión. Por tanto, la expresión necesita optimizarse o es necesario desarrollar un método de replegamiento eficaz para la aplicación de esta B-zima novedosa.

La figura 14 ilustra un análisis de SDS-NuPAGE de α -galactosidasa (SEQ ID NO: 2) expresada en *E. coli* (gel Bis-Tris al 4-12% Novex con tampón MOPS, teñido con kit de tinción Colloidal Blue, patrón no teñido Mark12, todos productos de Invitrogen). Se preparó el lisado de cada cultivo de manera similar tal como se describe en la leyenda de la figura 13 con una escala aumentada. Se centrifugó una alícuota de cada lisado completo a 14.000 g durante 5 min. a TA. Se eliminó el sobrenadante. Se mezclaron doce μ l de sobrenadante o lisado completo con 4 μ l de tampón 4X LDS, complementado con β -mercaptoetanol al 10% (v/v). Se suspendió el sedimento en tampón de muestra 1 X LDS, complementado con β -mercaptoetanol al 2,5% (v/v), a una razón de 16 μ l de tampón de muestra / 12 μ l de lisado completo. Se calentaron todas las muestras a 70°C durante 10 min. para el análisis de SDS-NuPAGE. Designaciones: WL, lisado completo; Sup, sobrenadante; PT, sedimento; U, muestra preparada a partir de cultivo no inducido; I, muestra preparada a partir de cultivo inducido.

La figura 15 ilustra la alineación de secuencias de proteína Multiple ClustalW (BoxShade 3,21) de la supuesta familia de α -galactosidasa novedosa para identificar regiones conservadas para el diseño de cebadores degenerados. Los residuos idénticos y las sustituciones conservadas se destacan en negro y gris oscuro. Las secuencias alineadas son de *S. avermitilis* MA-4680, *B. thetaotaomicron* VPI-5482 y *B. fragilis* NCTC 9343. Las dos secuencias de *B. fragilis* YCH624, casi idénticas a las de *B. fragilis* NCTC 9343, no se incluyen. Las regiones conservadas usadas diseñar un par de cebadores degenerados para clonar el gen de α -galactosidasa parcial de *S. griseoplanus* 2357 se indican con una flecha hacia adelante para el cebador directo y una flecha hacia atrás para el cebador inverso.

La figura 16 ilustra la secuencia de proteína de una α -galactosidasa de *S. griseoplanus* destacando las regiones correspondientes a los cebadores usados para la clonación. Los cebadores directo e inverso están coloreados de gris oscuro y claro respectivamente. Los cebadores degenerados están subrayados.

La figura 17 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de α -galactosidasa FragB recombinante purificada con un panel de oligosacáridos de diversas estructuras. Se realizaron las reacciones a temperatura ambiente con 10 nmol de sustrato y 21 ng de enzima en 10 μ l de NaPO₄ 10 mM, pH 6,8/NaCl 2,5 mM, complementado con 0,25

mg/ml de BSA. Se retiró un μ l de los ensayos enzimáticos en puntos de tiempo deseados y se colocó sobre una placa de CCF recubierta con gel de sílice (EMD Chemicals, NJ), que se reveló en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 30/60/10) durante 15 min. y se detectaron los desarrollos de producto mediante tinción con Orcinol/ H_2SO_4 . Designaciones: Tiempo de reacción para cada sustrato de izquierda a derecha: 0 (muestreado de la reacción de control que no contenía enzima), 5, 10, 20, 40 y 80 min. Se describen las estructuras detalladas de los sustratos en la tabla V. La escisión del sustrato dio como resultado un aumento de la migración tal como se observa para B-tri, B-di y B lineal, pero no para P₁, P^k y A-tri, indicando la carencia de escisiones.

La figura 18 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de B-zima FragB recombinante purificada con AMC-B-tetra en pH diferente. Se realizaron las reacciones a temperatura ambiente con 1 nmol de sustrato y ~8 ng de enzima en 10 μ l de tampón a pH de 2,0 a 9,0, complementado con 0,25 mg/ml de BSA. Se retiró un μ l de ensayos enzimáticos en los puntos de tiempo deseados y se colocó sobre una placa de HPTLC, que se reveló en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8). Se exploró la placa y se fotografió mediante un instrumento Bio-Rad Fluor-S Multimager con el software Quantity One 4.1.1. Se derivaron los tampones 1 X usados en las reacciones a partir de tampones 2 X descritos tal como sigue: pH 2,0, ácido cítrico 0,1 M; pH 2,5 - 5,5, ácido cítrico 0,1 M / Na_2HPO_4 0,2 M; pH 6,0-7,5, NaH_2PO_4 0,2 M / Na_2HPO_4 0,2 M; pH 8,0-9,0, Tris 0,2 M/HCl. Se tomaron muestras de las mezclas de ensayo a los 5 (panel superior) y 10 min. (panel inferior). Designaciones: B-tetra, tetrasacárido B; H-tri, trisacárido H; Origen: la posición en HPTLC cuando se aplicaron las muestras.

La figura 19 ilustra el análisis de la actividad enzimática en pH diferente usando derivado de para-nitrofenilo cromogénico, Gal α -pNP. Se llevaron a cabo los ensayos usando sustrato 2,5 mM, 8,5 μ g de enzima en 400 μ l de tampones entre pH 2,0 - 9,0 tal como se describe en la leyenda de la figura 17, a 26°C durante 5 min., se terminaron con 600 μ l de Na_2CO_3 1,0 M y se leyeron a 405 nm. Se usó un coeficiente de extinción molar de 18.300 para calcular la cantidad de nitrofenol liberado. Se definió una unidad como la cantidad de enzima requerida para escindir 1 μ mol de sustrato por minuto en la condición experimental. Entonces se calculó la actividad específica a cada pH y se representó frente al pH.

La figura 20 ilustra la especificidad de sustrato de α -galactosidasas de *Bacteroides fragilis*. Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos sin enzima (-) y con ~30 ng de enzima (+), sustrato ~1,0 mM en 10 μ l de $NaPO_4$ 10 mM, pH 6,8, NaCl 2,5 mM, complementado con BSA 0,25 mg/ml. Se monitorizaron las reacciones mediante CCF durante la incubación a 26°C y se muestra el punto de tiempo de 2 h. Las escisiones del trisacárido del grupo sanguíneo B ramificado (B-tri) para dar el disacárido H (Hdi) mediante α -galactosidasa BF α 2 (FragA), y todas las estructuras B mediante α -galactosidasa de BF β 1 (FragB), se completaron en el plazo de 5-20 min. (no mostrado), mientras que no se detectó escisión de otros sustratos de oligosacárido tras 2 h de incubación. Se revelaron las placas de CCF en cloroformo/metanol/agua (30/60/10, v/v/v) durante 15 min. y se tiñeron calentando con Orcinol al 0,05% en H_2SO_4 0,5 M.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere al desarrollo y la aplicación de una estrategia de examen y selección para α -galactosidasas novedosas con especificidades preferidas por las estructuras del grupo sanguíneo B, y con rendimiento preferido en la conversión enzimática de productos sanguíneos y tejidos animales, a lo largo de un intervalo de pH aproximadamente neutro. La tabla 1 enumera las estructuras complejas de antígenos encontrados en glóbulos rojos.

Para el fin de esta invención, se sintetizaron los derivados de oligosacáridos activos del grupo sanguíneo B o se produjeron mediante eliminación enzimática de α Gal a partir de diversos sustratos. Además, se purificaron glicoesfingolípidos con estructuras 3, 6, 21 y 25 a partir de eritrocitos humanos o se produjeron a partir de los mismos mediante tratamientos con glicosidasas tal como se describió anteriormente (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 fina para determinar cuantitativamente la eliminación de α Gal o α GalNAc de los derivados de AMC o glicosfingolípidos.

Las α -galactosidasas preferidas tienen alta especificidad de sustrato por estructuras de sacáridos ramificadas del grupo sanguíneo B, un óptimo de pH generalmente neutro y pueden producirse de manera económica como proteínas recombinantes en organismos unicelulares tales como bacterias y levaduras. La solicitud de patente anterior de los inventores (documento U.S.S.N. 10/251.271) desarrolló un ensayo de examen para las actividades enzimáticas preferidas usando sustratos de derivado de AMC de tetrasacárido B, y midió las actividades enzimáticas a pH neutro. Además, se compararon las actividades con actividades usando derivados de monosacárido de p-nitrofenilo con el fin de identificar actividades con preferencia o exclusividad por los sustratos complejos. En esa solicitud, se da a conocer el uso de este ensayo de examen en un panel grande de aislados bacterianos y fúngicos (3100), y se identifican en la misma varios aislados bacterianos que expresan actividades α -N-acetilgalactosaminidasa o α -galactosidasa medidas con sustratos de AMC de tetrasacárido A o B, pero no tienen o tienen niveles no significativos de actividad con los correspondientes sustratos de monosacáridos de p-nitrofenilo. Se analizó adicionalmente cada una de estas actividades tras serotipar y genotipar éstas como cepas de *Streptomyces*.

El análisis de la cepa n.º 8 que determinó que tenía actividad α -N-acetilgalactosaminidasa reveló que la actividad era insoluble y estaba asociada con la masa celular. Se depositó la cepa n.º 8 el 14 de febrero de 2002 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se le ha asignado el n.º de depósito de la ATCC PTA-4076. En contraposición, se determinó que la cepa n.º 2357 tenía actividad α -galactosidasa, y se determinó que la actividad era soluble, se encontraba en el sobrenadante de células transformadas lisadas mediante prensa francesa. Se depositó la cepa n.º 2357 el 14 de febrero de 2002 en la Colección Americana de Cultivos Tipo y se le asignó el n.º de depósito de la ATCC PTA-4077. Debido a que es considerable más sencillo purificar una proteína soluble, se eligió secuenciar y purificar inicialmente la proteína de la cepa n.º 2357.

Se purificó parcialmente la enzima que se encontró en la fracción soluble de la cepa n.º 2357. El análisis detallado de la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa parcialmente purificada demostró una especificidad fina sin precedentes por las estructuras del grupo sanguíneo B ramificadas, pero no se escindieron estructuras lineales tapadas por residuos de galactosa α 1-3 o α 1-4 por esta enzima. El análisis de su óptimo de pH mostró que las condiciones preferidas eran pH de 5,5 a 7,0. Por tanto, la actividad α -galactosidasa identificada es altamente preferida con respecto a enzimas conocidas en la técnica anterior debido a su especificidad de sustrato restringida, alta actividad específica para estructuras del grupo B y óptimo de pH. El análisis de SDS-PAGE del extracto bruto parcialmente purificado resultante reveló 3-4 bandas de proteína en la región de 40-80 kDa que tenían la actividad α -galactosidasa. El análisis de filtración en gel de la preparación mostró que la actividad migraba de manera comparable a BSA, indicando una proteína globular que tiene un peso molecular de aproximadamente 40-80 kDa. Se obtuvo una secuencia corta individual: Phe-Ala-Asn-Gly-Leu-Leu-Leu-Thr (SEQ ID NO: 1).

Posteriormente a estos estudios, y tal como se da a conocer en la presente invención, se ha descubierto una nueva familia de polipéptidos, que tienen actividades α -galactosidasa, y se han desarrollado métodos para su inducción, purificación, secuenciación y clonación. Tal como se mencionó anteriormente, la familia de polipéptido es distinta de la proteína parcialmente purificada anteriormente de la cepa n.º 2357, y notablemente estos miembros de la familia no contienen la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1. La nueva estrategia de inducción implica el crecimiento de la bacteria apropiada en fuentes de carbono definidas y medio mínimo, lo que da como resultado un aumento significativo en la producción de los polipéptidos de α -galactosidasa. Los α -galactósidos conocidos (que tienen generalmente un óptimo de pH ácido y especificidad de sustrato por Gal α -pNP u otros monosacáridos sencillos) no se secretan en *griseoplanus* y cepas de *Streptomyces* relacionadas en las mismas condiciones de crecimiento que producen estos polipéptidos novedosos.

Por tanto, la presente invención proporciona un método novedoso para la expresión recombinante y la purificación de ciertos polipéptidos de α -galactósido. Esta estrategia de purificación aplicada en combinación con los métodos de crecimiento e inducción novedosos dio como resultado la purificación satisfactoria hasta la homogeneidad aparente de los polipéptidos de α -galactosidasa en cantidades suficientes para la secuenciación de aminoácidos, y producto sanguíneo y conversiones de tejido.

Se usaron las siguientes etapas sucesivas para lograr la purificación hasta la homogeneidad aparente: en primer lugar, se hizo pasar el sobrenadante de caldo celular derivado de cultivos de *S. griseoplanus* n.º 2357 sin unir sucesivamente a través de columnas CEX y DEAE (figura 4). Posteriormente, se unió la actividad y se eluyó sucesivamente en una columna de hidroxapatita (figura 5), una columna Cibacron Blue (figura 6) y finalmente una columna AEX (figuras 7 y 8). A lo largo de todo el esquema de purificación, se siguió la proteína mediante un análisis de su actividad enzimática en diversas fracciones; también se analizó el producto de proteína final mediante SDS-NuPAGE. Se obtuvo identificación de la proteína de α -galactosidasa mediante la comparación del patrón de bandas de proteína mediante tinción con plata de SDS-NuPAGE y cromatografías de filtración en gel S12 y AEX (figuras 8-9). Sólo una banda que migra como 70 kD mediante SDS-NuPAGE y filtración en gel S12 correspondía a la actividad α -galactosidasa observada. Finalmente, se separó la proteína identificada tal como se describe, mediante electroforesis en gel NuPAGE y se cortó la banda de 70 kD teñida con Coomassie del gel y se sometió a análisis de la secuencia de aminoácidos. Se obtuvo información de la secuencia de aminoácidos interna mediante análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF) y degradación de Edman tras la digestión con tripsina. Ninguna de las secuencias cortas obtenidas mostró alto grado de identidad con secuencias conocidas en bases de datos públicas (GenBank). Una búsqueda en la base de datos BLAST de un péptido de 30 aminoácidos (la secuencia peptídica más larga obtenida mediante la secuenciación interna y confirmada mediante EM/EM, usando "búsqueda para coincidencias cortas, casi exactas") identificó un supuesto marco de lectura abierto que se pronostica que codifica para una proteína (SEQ ID NO: 2) de la secuencia del genoma de *Streptomyces avermitilis* (n.º de registro de GenBank BAC74979.1, GI:29610934). El genoma completo de *Streptomyces griseoplanus* no está disponible y no se identificaron secuencias relacionadas derivadas de este género en las búsquedas en base de datos. *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces griseoplanus* están estrechamente relacionados. Por tanto, se ha sometido a prueba si *Streptomyces avermitilis* también contenía la actividad α -galactosidasa identificada, que se demostró anteriormente que era poco común entre aislados bacterianos incluyendo muchos aislados de *Streptomyces*.

Se sometió a ensayo el sobrenadante de cultivo de *Streptomyces avermitilis* (ATCC 31267) para detectar α -galactosidasa secretada y, tal como se muestra en la figura 11, se observaron pruebas claras de la presencia de actividades α -galactosidasa tanto en el sobrenadante de cultivo como en el lisado de sedimento, tal como se

determina mediante digestión de sustratos de oligosacáridos B-tetra. Sin embargo, la escisión de un sustrato sencillo (α -Gal pNP) mediante la α -galactosidasa de *Streptomyces avermitilis* secretada fue insignificante. En contraposición, se observó escisión completa de α -Gal pNP para la α -galactosidasa de *Streptomyces avermitilis* obtenida de la fracción celular. Por tanto, las α -galactosidasas secretadas y celulares probablemente no son de las mismas identidades. Parte de la galactosidasa secretada es probable que sea la α -galactosidasa novedosa que prefiere sustrato ramificado con respecto a sustratos sencillos (lineales), mientras que se observa que la mayoría de las actividades α -galactosidasa celulares, si no todas, tienen actividades glicosidasa convencionales. Las similitudes del polipéptido de *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2) con la α -galactosidasa de *S. griseoplanus* con respecto a su secreción en el caldo de cultivo, peso molecular pronosticado y las similitudes de secuencia con *S. griseoplanus*, indican que la proteína de *S. avermitilis* representa un homólogo de la α -galactosidasa derivada de *S. griseoplanus* identificada originalmente.

Lo identificado a partir del polipéptido de *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2) consiste en 625 aminoácidos y no mostró similitud significativa con cualquier otra proteína conocida. De nuevo, búsquedas con SEQ ID NO: 2 identificaron varias secuencias de proteína novedosas (SEQ ID NO: 3-8) a partir de genomas exclusivamente procariotas, con similitudes de secuencia mostradas tal como sigue en la tabla 1A:

Tabla 1A:

Identidad (% global) de α -galactosidasas de *Bacteroides* con la enzima de *S. avermitilis*

SEQ ID NO.	GI n.º	Abrev.	Aminoácidos	Identidad con SA (%)
2	gi 29833810 ref NP_828444.1 <i>S. avermitilis</i>	SA	625	100
3	gi 29340474 gb AA078266.1 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	BT α	568	30,35
4	gi 53715733 ref YP_101725.1 <i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	BF α 1	605	30,23
5	gi 60495103 emb CAH09922.1 <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	BF α 2	605	29,30
6	gi 60491830 emb CAH06588.1 <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	BF β 1	595	24,30
7	gi 53712216 ref YP_098208.1 <i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	BF β 2	595	24,30
8	gi 29341569 gb AA079356.1 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	BT β	615	22,82

Se analizaron todos los polipéptidos identificados mediante alineaciones de secuencias múltiples tal como se muestra en la figura 12; se proporciona una secuencia consenso como SEQ ID NO: 9. Estos polipéptidos representan una nueva familia de α -galactosidasas novedosas, que tienen especificidad de sustrato única descrita en más detalle a continuación, y que tienen la característica común de un óptimo de pH aproximadamente neutro.

Las secuencias de genes para estos miembros de esta familia de α -galactosidasa han permitido el desarrollo de sistemas de expresión recombinantes para estos polipéptidos, usando una variedad de células procariotas o eucariotas y sistemas de expresión, y permiten la purificación de formas recombinantes de estas enzimas usando procedimientos de purificación de proteínas establecidos (por ejemplo sistemas de purificación y expresión con etiqueta de HIS).

Ejemplos

Ensayos enzimáticos:

Alberta Chemical Research Council sintetizó por encargo sustratos que consistían en una serie de estructuras de oligosacáridos del grupo sanguíneo ABH complejas, tales como derivados de 7-amino-4-metil-cumarina (véase el documento U.S.S.N. 10/251.271). Otros sustratos estaban disponibles de diferentes proveedores (Sigma-Aldrich). Todos los reactivos usados eran de calidad analítica o superior. Se realizaron ensayos enzimáticos convencionales tal como sigue con los diferentes sustratos.

Se realizaron ensayos típicos mediante el siguiente procedimiento: se incubaron muestras de proteína con oligosacárido marcado con AMC a una concentración de 0,05 mM, con monosacárido marcado con MU a una concentración de 0,25 mM, en 2,2-10 μ l de reacción en NaPO₄ 50 mM (pH 6,8) durante el tiempo deseado a 26°C o temperatura ambiente. Se tomó una alícuota de un μ l a diversos puntos de tiempo y se aplicó sobre HPTLC para

seguir el desarrollo de producto. Se reveló la placa de CCF en cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol: 60/35/8). Se exploró la placa y se fotografió mediante un instrumento Fluor-S Multilmager de Bio-Rad con el software Quantity One 4.1.1. Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima requerida para escindir 1 μmol de sustrato por minuto en las condiciones experimentales.

5

Fermentaciones:

Se enumeraron las formulaciones de diversos medios en la tabla II. Se realizaron fermentaciones en matraz y tubos cónicos de 50 ml en condiciones convencionales: 30°C, 220 rpm durante el periodo de tiempo deseado. Se realizó la fermentación a pH 6,8, 30°C, 300-600 rpm, DO = 50%.

10

Tabla II

Formulaciones de medios¹ para hacer crecer *Streptomyces griseoplanus* para la producción de polipéptidos de α -galactosidasa

Medio YM

Componentes	g/l
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Bacto Soytone	5
Glucosa	10

Medio BP

Componentes	g/l
Bacto Soytone	15
Extracto de malta	5
Extracto de levadura	5
Pharmamedia	5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
CaCO ₃	2,5
Glucosa	25
N-Acetilglucosamina ²	0,1

Medio mínimo

Componentes	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,6
NaH ₂ PO ₄ 0,2 M / K ₂ HPO ₄ pH 6,8	7,5 ml
CaCl ₂	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,1
Fuente de carbono ²	5
Complemento mineral traza (n.º de cat. de la ATCC MD-TMS) ²	10 ml
Complemento de vitaminas (n.º de cat. de la ATCC MD-TMS) ²	10 ml

15

1. Todos los medios sin los componentes indicados se esterilizaron a 121°C durante 25 min.

2. Se esterilizaron los componentes mediante filtración a través de 0,22 μm y se añadieron a la receta deseada tras la esterilización

20

EJEMPLO 1: INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE α -GALACTOSIDASA EN *STREPTOMYCES GRISEOPLANUS*

25

Se demostró en el pasado que *S. griseoplanus* podía producir una α -galactosidasa novedosa secretada cuando se hacía crecer en medios apropiados, aunque esta enzima nunca se purificó hasta la homogeneidad. Se inoculó una reserva criogénica de este microorganismo en de 5 a 10 volúmenes de medios YM y se hizo crecer durante 24 h a 30°C, 220 rpm, en matraces con agitación o tubos cónicos de 50 ml dependiendo de la escala del cultivo. Entonces se inoculó el cultivo YM en aproximadamente 20 volúmenes de medio BP para continuar la incubación en las mismas condiciones, para inducir la producción de la galactosidasa. La actividad enzimática asociada con el cultivo habitualmente alcanza su máximo en 3 días. Se recogió el sobrenadante de cultivo que contenía la actividad enzimática mediante centrifugación. La figura 1 muestra un análisis de HPTLC del ensayo enzimático de un sobrenadante de medio de cultivo gastado típico con el sustrato B-tetra. Se expresó la α -galactosidasa identificada en un rendimiento volumétrico muy bajo tanto en lisados totales de células así como secretada al medio (aproximadamente ~0,1 U/l de cultivo tal como se analiza mediante el ensayo enzimático B-tetra AMC descrito en los

30

métodos generales). Por tanto, era en gran parte imposible aislar una cantidad suficiente de proteína pura para la secuenciación (véase el documento U.S.S.N. 10/251.271). Se consideró que el bajo nivel de expresión de la proteína deseada, la heterogeneidad y riqueza en proteína del medio rico representaban los principales factores de la dificultad para purificar suficiente actividad para la identificación de la proteína.

5 Se consideró necesario en el presente estudio desarrollar una estrategia para inducir la expresión y secreción de la enzima para lograr una actividad específica de partida superior. Un enfoque era usar una fuente de carbono alternativa en lugar de glucosa. Otro enfoque era reducir la complejidad de los medios usando medios homogéneos con pocos materiales orgánicos, en particular el contenido en proteína, es decir, los medios mínimos. Se esperaba que el aislamiento de la actividad enzimática a partir de tales medios fuese más fácil y se esperaba que los rendimientos de enzima en cada etapa aumentasen.

15 Considerando que el crecimiento del microorganismo en medios mínimos es muy lento y la sensibilidad de la producción de α -galactosidasa a la composición de los medios de crecimiento, se hizo crecer en primer lugar *S. griseoplanus* en medios ricos siguiendo el protocolo convencional, es decir, 24 h en YM, 72 h en BP. Entonces se recogieron los micelios del cultivo mediante centrifugación. Se lavaron concienzudamente los micelios sedimentados con medios mínimos basales (los medios mínimos carecen de fuente de carbono y aditivos) para eliminar los medios ricos residuales tanto como sea posible. Entonces se resuspendió el sedimento de micelios en medios mínimos que carecían de una fuente de carbono, que pueden distribuirse fácilmente para el examen de la fuente de carbono tal como se detalla en la figura 2. Se realizaron cultivos en tubos a pequeña escala en condiciones de fermentación convencionales. Se tomaron muestras de alícuotas pequeñas a diferentes puntos de tiempo y se recuperaron los sobrenadantes para el análisis de α -galactosidasa. Se estudió un total de 18 fuentes de carbono tal como se muestra en la tabla III. El análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de sobrenadantes de cultivo con B-tetra se muestra en la figura 2. La completa desaparición de los sustratos usando sobrenadantes 70 h de fermentación en el carril 4 y 7 distingue claramente a la galactosa y lactosa de otras fuentes de carbono por su capacidad para producir la α -galactosidasa. En las condiciones de ensayo actuales, 25 pmol de sustrato/ μ l de muestra de proteína, NaPO₄ 50 mM (pH 6,8), 1 h a temperatura ambiente, el rendimiento volumétrico de la actividad α -galactosidasa puede calcularse tal como sigue:

30 $25 \text{ pmol} / (1 \mu\text{l} * 60 \text{ min.}) \approx 0,4 \text{ mU/ml}$ o $0,4 \text{ U/l}$.

Este rendimiento es mucho mayor que un rendimiento típico obtenido a partir del cultivo en medios ricos ($\sim 0,1 \text{ U/l}$). Además, el rendimiento probablemente está subestimado puesto que la falta del punto de tiempo antes de 1 h puede haber dejado pasar el punto final de las reacciones. El resultado preliminar muestra un gran potencial de uso de medios mínimos para facilitar la producción y purificación de α -galactosidasa.

Para confirmar la notable observación usando medios mínimos, volvió a evaluarse la fuente de carbono líder de galactosa y lactosa para la inducción de α -galactosidasa novedosa. La figura 3 muestra el análisis de HPTLC de ensayos de reacción de muestras de fermentación tomadas a diferentes puntos de tiempo hechas crecer en medios mínimos con galactosa y lactosa como fuentes de carbono. Se escindió aproximadamente el 90% de los sustratos por muestras de cultivo de 3 días en 20 min., lo que se tradujo en aproximadamente 4 U/l de sobrenadante de cultivo. Por tanto, tal como se muestra en la figura 3, galactosa (carril n.º 4) y sorprendentemente lactosa (carril n.º 7) indujeron actividad α -galactosidasa significativa. Entonces se usaron condiciones para el crecimiento y la inducción usando galactosa identificadas anteriormente sin optimización adicional para desarrollar fermentaciones a gran escala de la cepa de *Streptomyces* n.º 2357 para el aislamiento de la enzima. Tal como se demuestra a partir de los siguientes ejemplos, estas condiciones eran esenciales para el aislamiento y la identificación satisfactorios de la proteína α -galactosidasa resultante, que era diferente de la enzima dada a conocer originalmente por el documento U.S.S.N. 10/251.271.

50 Tabla III. Fuentes de carbono usadas para examinar la inducción de α -galactosidasa novedosa a partir de *Streptomyces griseoplanus* usando medios mínimos

Fuente de carbono n.º	Fuente de carbono
1	Harina de semilla de algarrobo
2	Dextrina de almidón de patata
3	D(-) Fructosa
4	D(+) Galactosa
5	D(+) Glucosamina
6	Glicerol
7	D(+) Lactosa monohidratada
8	Extracto de malta

9	D(+) Maltosa monohidratada
10	D-Manitol
11	D(+) Manose
12	D(+) Rafinosa
13	L(-) Sorbosa
14	Almidón
15	Sacarosa
16	Xilitol
17	D(+) Xilosa
18	D(+) Glucosa

EJEMPLO 2: PURIFICACIÓN DE UNA α -GALACTOSIDASA EXPRESADA EN *STREPTOMYCES GRISEOPLANUS* CEPA N.º 2357

5 Se desarrolló una nueva estrategia de purificación para la enzima novedosa puesto que el material de partida era sustancialmente diferente al usado para la purificación parcial descrita anteriormente (véase el documento U.S.S.N. 10/251.271). Se usaron las siguientes etapas para lograr la purificación hasta la homogeneidad aparente: se sometió sobrenadante de caldo celular (450 ml), derivado de 800 ml de cultivo llevado a cabo en un fermentador de 1 l tal como se describió en el ejemplo 1, a centrifugación a alta velocidad de 30 min. a 20.000 rpm, 4°C. Se aplicó el sobrenadante a una columna CEX de 15 ml (soporte Macro-Prep High S, BioRad, n.º de cat. 156-0031), equilibrada previamente con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8), y se lavó con 40 ml del tampón de equilibrado y PO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 7,3), respectivamente. Se agruparon la fracción no retenida y los dos lavados que contenían la actividad α -galactosidasa (figura 4, panel A), y se aplicaron a una segunda columna de DEAE de 2,5 ml (DEAE Sepharose, Sigma, n.º de cat. DEF100) equilibrada previamente con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8).
10 Entonces se lavó la columna con 50 ml del tampón de equilibrado. Se recogió un total de 600 ml que contenían la actividad α -galactosidasa a partir de la fracción no retenida y el lavado (figura 4, panel B). Se agruparon, se concentraron con dispositivos de filtro centrífugo Centricon Plus 80 (n.º de cat. de Millipore UFC5LGC02), y se intercambió el tampón por NaPO₄ 10 mM (pH 7,0) en el mismo dispositivo hasta un volumen final de 23 ml.

20 Se aplicó la muestra con tampón intercambiado de 23 ml a una columna de hidroxapatita de 2,5 ml (BioRad, n.º de cat.103-0150) equilibrada previamente con NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). Se lavó la columna con 5 ml del tampón de equilibrado, y se eluyó gradualmente la actividad α -galactosidasa con un tampón en gradiente de NaPO₄ (10 mM/escalón) desde 20 hasta 100 mM (pH 7,0). La actividad α -galactosidasa se eluyó en fracciones con NaPO₄ 30-50 mM (figura 5). Se agruparon las fracciones activas y se diluyeron 1:1 con H₂O y se aplicaron a una columna Cibacron Blue de 2,5 ml (Sigma, n.º de cat. C-1285) equilibrada previamente con Tris 10 mM (pH 7,5). Se lavó la columna con 10 ml de Tris 10 mM (pH 7,5) y 5 ml de Tris 10 mM, NaCl 80 mM (pH 7,5). Se eluyó la actividad α -galactosidasa con 25 ml de tampón de elución que contenía Tris 10 mM (pH 7,5) con aumento de la cantidad de sal (figura 6). Se concentró el eluato enzimático y se intercambió el tampón en Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5) con dispositivos de filtro centrífugo Centricon YM10 (n.º de cat. de Millipore 4205) hasta un volumen final de 3,7 ml.
25 Finalmente, se aplicó el eluato con tampón intercambiado a una columna AEX de 1 ml (BioRad, n.º de cat. 156-0031), equilibrada previamente con Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5). Se lavó la columna con 5 ml tampón de equilibrado y se eluyó la actividad α -galactosidasa con un gradiente de NaCl en Tris 40 mM (figura 7).

35 Se realizaron análisis de las fracciones de eluato de la columna AEX mediante SDS-NuPAGE y se observó una única banda con un peso molecular aparente de 70 kD tras la tinción con plata (SilverQuest, Invitrogen, n.º de cat. LC6070) (figura 8). Se proporcionó una verificación adicional de la α -galactosidasa aislada mediante cromatografía de filtración en gel. Se equilibró una columna S12 (Superose 12™, Amersham, n.º de cat. 17-5173-01) y se ejecutó con acetato de amonio 150 mM. Se aplicó α -galactosidasa parcialmente purificada tal como se describió anteriormente (volumen de 250 μ l) y se recogieron 45 fracciones (0,5 ml/fracción a una velocidad de flujo de 1 ml/min.) (figura 9). Las fracciones n.ºs 19-21 contenían el pico de proteína principal (uv 280 nm). Se analizaron las fracciones 19-22 para detectar α -galactosidasa con B-tetra AMC y se analizaron 10 μ l de cada una mediante un SDS-NuPAGE en gradiente del 4-12% usando 10 y 20 ng de NEB A-zima como controles (carriles 2 y 3). Tal como se muestra en la figura 9, la actividad α -galactosidasa pico se correlaciona completamente con la banda de 70 kD mediante SDS-PAGE.

45 EJEMPLO 3: SECUENCIACIÓN DE AMINOÁCIDOS DE α -GALACTOSIDASA PURIFICADA A PARTIR DE *STREPTOMYCES GRISEOPLANUS* CEPA N.º 2357

Se preparó aproximadamente 1 μ g de proteína α -galactosidasa tal como se estimó mediante NuPAGE tal como se

describió en el ejemplo 2. Se separó la proteína mediante NuPAGE al 4-12% y se tiñó con el kit de tinción Colloidal Blue (Invitrogen, n.º de cat. LC6025). Tras desteñir el gel con H₂O, se cortaron las bandas de 70 KD teñidas y se lavaron con H₂O de calidad para HPLC y acetonitrilo al 50% en H₂O. Se sometió el gel cortado a análisis de secuencia directo en la Harvard Microchemistry Facility, Universidad de Harvard. En resumen, se redujeron las rodajas de gel con DTT y se alquilaron con yodoacetamida, y luego se digirieron con tripsina en tampón bicarbonato de amonio 25 mM. Se analizó el digesto de tripsina mediante HPLC de fase inversa microcapilar-espectrometría de masas en tándem por nano-electrospray (CL μ /EM/EM) en un espectrómetro de masas cuadrupolo de trampa iónica Finnigan LCQ DECA XP Plus. Se facilitó la secuenciación preliminar de péptidos mediante correlación con bases de datos con el algoritmo SEQUEST. Entonces se revisaron las secuencias peptídicas de EM/EM para determinar el consenso con proteínas conocidas y se confirmaron los resultados manualmente para determinar la fidelidad. Ninguna secuencia de las bases de datos nr o est del NCBI se correlacionaba con estos datos.

Varios intentos de obtener la secuencia N-terminal de la proteína no digerida no pudieron generar ninguna información de secuenciación, lo que sugiere que el extremo N-terminal estaba bloqueado. Con el fin de obtener información de secuenciación interna, se fraccionaron péptidos del digesto de tripsina de las rodajas de gel NuPAGE que contenían ~5 μ g de la proteína deseada mediante HPLC en una columna C18 de 0,3x150 mm. Se monitorizaron tres longitudes de onda; 205 nm (para enlaces amida), 277 nm y 292 nm (para aminoácidos aromáticos Trp y Tyr) mediante un detector de red de diodos. Se examinaron unos cuantos de los mejores picos/fracciones mediante MALDI para seleccionar picos para la secuenciación de Edman. Búsquedas BLAST en bases de datos usando "búsqueda para coincidencias cortas, casi exactas" en la base de datos nr del NCBI no identificaron ninguna secuencia idéntica a ninguna de las secuencias peptídicas obtenidas. Sin embargo, una búsqueda usando una secuencia peptídica de 30 aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 12, la secuencia peptídica más larga obtenida y confirmada mediante EM/EM, identificó una proteína supuesta candidata (SEQ ID NO: 2) pronosticada a partir de la secuencia del genoma de *Streptomyces avermitilis* (n.º de registro de GenBank BAC74979,1, GI:29610934) que mostró una similitud de secuencia débil con SEQ ID NO: 12, la secuencia peptídica de *griseoplanus* obtenida (ilustrada en la figura 10).

SEQ ID NO: 12: TVIDVTDFGADPSGKADSAAVSAAMAHAK

El genoma de *Streptomyces griseoplanus* no está disponible y no se identificaron secuencias relacionadas en búsquedas en bases de datos. De manera notable, esta secuencia no la comparte la α -galactosidasa descrita en la descripción anterior (y en el presente documento como SEQ ID NO: 1). *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces griseoplanus* están estrechamente relacionados. Por tanto, se sometió a prueba si *Streptomyces avermitilis* también contenía la α -galactosidasa novedosa, puesto que se demostró que la α -galactosidasa previa era muy poco común entre muchos de los aislados de *Streptomyces* sometidos a prueba (véase el documento U.S.S.N. 10/251.271).

Se cultivó *Streptomyces avermitilis* (ATCC 31267) en medios YM y se sometió a ensayo el sobrenadante de cultivo para detectar α -galactosidasa secretada usando el tetrasacárido B marcado con AMC y un monosacárido α -Gal pNP como sustratos. Tal como se muestra en la figura 11, hay pruebas claras de la presencia de actividades α -galactosidasa tanto en el sobrenadante de cultivo como en el lisado del sedimento tal como se analiza mediante el oligosacárido B-tetra. Sin embargo, la escisión de un sustrato sencillo, α -Gal pNP, por las actividades α -galactosidasa secretadas es insignificante. En cambio, se observó escisión completa de α -Gal pNP para la(s) α -galactosidasa(s) celular(es).

La proteína supuesta identificada consistía en 625 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y no mostró identidad significativa con ninguna otra proteína conocida. De nuevo, búsquedas con la secuencia proteica identificada identificaron muy pocas secuencias proteicas con bajas similitudes de secuencia exclusivamente a partir de genomas procariontes. Se analizaron todas las secuencias identificadas mediante análisis de secuencia múltiple tal como se muestra en la figura 12.

EJEMPLO 4: EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE α -GALACTOSIDASA IDENTIFICADO A PARTIR DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS*

Se amplificó la secuencia codificante completa pronosticada del gen de *Streptomyces avermitilis* identificado, de 1878 pares de bases de longitud, que codifica para la proteína supuesta (SEQ ID NO: 2) de 625 aminoácidos (longitud completa) mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando el par de cebadores AVER1 (5'-GCGAATTCCCATGGCTCACGGATGCTCCGGAGGG-3' SEQ ID NO: 13) / AVER3 (5'-GCCTCGAGAAGCTTCTAGTCCGTGACCACGGAGGTGTTTC-3' SEQ ID NO: 14), se digirió con la enzima de restricción NcoI/HindIII (sitios de restricción en los cebadores subrayados), y se clonó en el sitio NcoI/HindIII del vector de expresión bacteriano pPET28 (Novagen, n.º de cat. 70777-3) formando el constructo pZQ-B002a. Dado el hecho de que el gen tiene un sitio NcoI interno en la posición 1490, se realizó la inserción del constructo génico de longitud completa usando un procedimiento de clonación de dos etapas. Se secuenció el constructo de expresión en su totalidad para la confirmación. Se usó el constructo de expresión de longitud completa generado pZQ-B002a para transformar la cepa de *E. coli* Rosetta (BL21-DE3)pLysS (n.º de cat. de Novagen 70956-3), y se sembró en placas de LB-agar en presencia de cloranfenicol (34 μ g/ml) y kanamicina (50 μ g/ml).

Para el análisis inicial de la expresión de proteínas, se realizó la inducción a 26°C en lugar de los más comunes 37°C con una baja concentración de inductor (IPTG 0,1 mM), una condición que favorece la formación de proteínas solubles. Se lisó el sedimento celular inducido mediante un método químico a base de detergente y se sometió a ensayo el lisado completo directamente en condiciones convencionales para detectar la actividad B-zima novedosa sin clarificarse. Tal como se muestra en la figura 13, la escisión del tetrasacárido del grupo sanguíneo B marcado con AMC podía detectarse fácilmente tal como se indica mediante la formación de trisacárido H usando lisado bruto generado a partir de cultivos inducidos sólo durante 1 h. Este resultado demuestra inequívocamente que la proteína de *Streptomyces avermitilis* (SEQ ID NO: 2) es de hecho una galactosidasa novedosa, una actividad característica compartida por otros miembros de esta familia de proteínas. La figura 14 confirma que SEQ ID NO: 2 puede expresarse eficazmente en *E. coli*, aunque se recupera en cuerpos de inclusión. Por tanto, son necesarios en primer lugar la desnaturalización, la extracción de la enzima de los cuerpos de inclusión y el replegamiento, para producir este polipéptido en *E. coli*.

15 EJEMPLO 5: CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE GLÓBULOS ROJOS B EN CÉLULAS DE FENOTIPO O USANDO α -GALACTOSIDASA EXPRESADA TAL COMO SE EVALÚA MEDIANTE PROTOCOLOS DE TIPIFICACIÓN DE RUTINA

20 Protocolo de conversión uno - Se realizaron reacciones de conversión enzimática en 1 ml de mezclas de reacción que contenían glicina 200 mM, pH 6,8, y NaCl 3 mM con glóbulos rojos empaquetados al 30% (pRBC) y enzima tal como se indica. Se obtuvo sangre completa reciente del Oklahoma Blood Institute (Oklahoma City, OK) y se eliminó la capa leucocítica. Se lavaron previamente los RBC 1:1 y 1:4 vol/vol en tampón de conversión antes de la adición de enzima, y se incubaron las reacciones durante 60 min. con mezclado suave a 26°C, seguido por cuatro ciclos de lavado repetidos con 1:4 vol/vol de solución salina mediante centrifugación a 1.000 rpm. Los RBC B-ECO tratados con enzima lavados se tipificaron como ABO según técnicas de bancos de sangre convencionales usando diversos reactivos de anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente ((Immucor Gamma Anti-B (Gamma Biologicals/Immucor, Norcross, Ga.); Ortho Anti-B (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, N.J.); y Diagast Anti-B (Diagast Laboratories, Francia)).

30 Protocolo de conversión dos - Se extraen glóbulos rojos B (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos con EDTA y se almacenan 4°C durante hasta siete días, y se lavan tres veces en PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4), y se resuspenden hasta el 10% en una disolución de PBS y PEG al 7,5% (pH 7,4). Se tratan las células con α -galactosidasa recombinantes (10-500 U/ml) a 30°C durante 180 min. mientras se agita. Se lavan las células tres veces en solución salina al 0,9% y se resuspenden al 3-5% en solución salina para la tipificación.

40 Protocolo de conversión tres - Se extraen glóbulos rojos B (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos con EDTA y se congelan glóbulos rojos B leucorreducidos (Cruz Roja americana, región de Nueva Inglaterra, Dedham, MA) en Glycerolyte 57, (Baxter Healthcare Corporation, Fenwal Division: Deerfield, IL) según el Manual Técnico de la AABB, 13ª edición, método 6.6 y se almacenan a -70°C. Antes del tratamiento enzimático, se desgllicerolizan las células usando solución salina al 9,0%, solución salina al 2,5% y solución salina al 0,9% (véase el método 125 de Immunohematology Methods por la Cruz Roja americana), se resuspenden entonces hasta un hematocrito del 50% en una disolución de PBS y PEG al 7,5% (pH 7,4) y se añade α -galactosidasa recombinante (200 U/ml). Se incuban las reacciones a 37°C con agitación durante 4 horas, seguido por tres lavados en solución salina al 0,9%, y suspensión final al 3-5% en solución salina para la tipificación.

50 Protocolo de conversión cuatro - El origen y almacenamiento de las células es el mismo que se describe en el protocolo B. Se lavan los glóbulos rojos desgllicerolizados dos veces en PCI (pH 7,4) con NaCl 150 mM y se resuspenden hasta un hematocrito del 50% en PCI (pH 7,4) con NaCl 150 mM. Se tratan las células con α -galactosidasa recombinante (200 U/ml) a 37°C con agitación durante 4 horas, seguido por tres lavados en solución salina al 0,9%, y suspensión final al 3-5% en solución salina para la tipificación.

55 Reactivos de tipificación aprobados usados en ensayos de hemaglutinación son anticuerpos monoclonales murinos y lectinas vegetales obtenidas de Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, N.J.; Gamma Biologicals/Immucor, Norcross, Ga. Los reactivos no aprobados por la FDA incluyeron anticuerpos monoclonales murinos anti-B frente a variantes del grupo sanguíneo B 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 tipificación se usan según las recomendaciones de los fabricantes y otros anticuerpos monoclonales tal como se determina mediante titulaciones.

60 Ensayo de hemaglutinación (temperatura ambiente).

65 Se prepara una suspensión al 3-5% de glóbulos rojos lavados en solución salina de banco de sangre isotónica. Se añade una gota (aprox. 50 microlitros) de reactivo de anticuerpo anti-B. Se añade una gota (aprox. 50 microlitros) de la suspensión de glóbulos rojos. Se mezclan los tubos y se centrifugan durante 15 segundos a 3500 rpm. Se resuspenden las células mediante agitación suave y se examinan macroscópicamente para detectar la aglutinación.

Se clasifica la aglutinación según el método 1.8 en el Manual Técnico de la AABB, 13ª edición.

Tal como se describe en los ejemplos anteriores, es probable que las enzimas preferidas para su uso en la eliminación de los epítomos del grupo sanguíneo B tengan cinéticas particularmente buenas con sustratos de oligosacáridos que se asemejan a antígenos del grupo sanguíneo B. Tales propiedades cinéticas preferidas podrían estar representadas por especificidades de sustrato preferidas o exclusivas por los oligosacáridos del grupo sanguíneo B, y actividad baja o carente con derivados de monosacáridos sencillos tales como sustratos de monosacárido-pNP. Las propiedades cinéticas preferidas podrían estar representadas también por una Km particularmente baja para sustratos relevantes. Propiedades cinéticas preferidas adicionales consisten en un óptimo de pH neutro de reacciones con sustratos activos de grupo sanguíneo relevantes, y otras condiciones de reacción que son compatibles con la integridad y las funciones de los glóbulos rojos. Otras propiedades preferidas de la enzima tal como el tamaño, la carga, la solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pueden referirse también al rendimiento en conversión enzimática de glóbulos rojos. Se identificó la α -galactosidasa novedosa con propiedades cinéticas mejoradas a partir de diversas cepas bacterianas tal como se describe y proporciona una enzima con las características preferidas mencionadas anteriormente, que presenta rendimiento superior en conversiones de glóbulos rojos.

Tabla 3A: Resultados de aglutinación de glóbulos rojos humanos convertidos con α -galactosidasas recombinantes FragA o FragB

Protocolo de conversión de rutina (Glicina 200, pH 6,8, NaCl 3 mM)		Immucor Anti-B		Diagast Anti-B	
Enzima Frag B	Dosis μ g/ml	IS	4°C	IS	4°C
Células B humanas	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	1,25	0	0	0	0
	0,625	0	W+	W+	1+
	0,3125	0	1+	1+	1+
Enzima Frag A					
Células B humanas	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	1,25	0	0	0	0
	0,625	0	W+	W+	1+
	0,3125	1+	1+	1+	2+

20 EJEMPLO 6: CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN de α -GALACTOSIDASA DE *STREPTOMYCES GRISOPLANUS* CEPA N.º 2357 Y DEDUCCIÓN DE SU SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

Se describió el aislamiento y la purificación de la α -galactosidasa endógena de *S. griseoplanus* 2357 en el ejemplo 2. Se describió la secuenciación de aminoácidos parcial de la α -galactosidasa purificada que generaba un péptido de 30 aminoácidos en el ejemplo 3. La búsqueda BLAST usando este péptido frente a la base de datos "nr" (GenBank) identificó una familia de α -galactosidasas supuestas. Se presentaron las secuencias para las 5 α -galactosidasas a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ y se les asignaron los siguientes números de registro: AM109953 (*Streptomyces avermitilis*), AM109954 y AM109955 (*Bacteroides fragilis*), AM109956 y AM109957 (*Bacteriodes thetaiotaomicron*). La alineación de secuencias múltiples de α -galactosidasas supuestas identificó unas cuantas regiones conservadas (figura 15). Se clonó el marco de lectura abierto que codificaba para una α -galactosidasa supuesta de *Streptomyces griseoplanus* basándose en amplificación rápida 5' y 3' de extremos genómicos (RAGE). Los cebadores degenerados iniciales se basaron en las regiones conservadas determinadas a partir de la alineación de secuencias múltiples de secuencias de α -galactosidasas supuestas. Se usaron cebadores sentido y antisentido dAVER7 (5'-TTCGGXGTGXGTXKKGKAGTWCAGXGAGAA-3' SEQ ID NO: 15)/dAVER9 (5'-GTXCCTGXATXTTXATXGGXTCXTCGTG-3' SEQ ID NO: 16), en los que X= inosina y K= G o T, para amplificar por PCR un único fragmento de ADN específico de BZima de 185 pb de ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus*. Se clonó el producto de PCR en el vector pCR4 (Invitrogen) y se secuenció generando pCR4-

dAVER7/9. Se derivaron los cebadores específicos de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* GRIS10 (5'-ATCGACTCGGTACCTTCAAGGCCGAC-3' SEQ ID NO: 17) y GRIS11 (5'-AAGACGCTGTTGGTATGCGTACGGTGC-3' SEQ ID NO: 18) de pCR4-dAVER7/9. Se trató con endonucleasa el ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus* hasta el final con la endonucleasa de restricción Haell, se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó el ADN fraccionado de 2-3 kpb mediante purificación Qiagen (Qiagen). Se ligó el ADN purificado a un adaptador Haell bicatenario EBRETTE3 (5'-GCGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGGGAATTCGGTACCCTCGAGGCGC-3' SEQ ID NO: 19)/EBRETTE4 (5'-CTCGAGGGTACCGAATTCCGGAA-3' SEQ ID NO: 20) que codifica para un sitio de unión a T7 (subrayado) y una proyección de restricción Haell (mostrada en cursiva). Se usó el ADN ligado al adaptador en 5' RAGE usando 10 ng de ADN ligado al adaptador, T7/GRIS11 o 3'RAGE usando 10 ng de T7/GRIS10. Se clonaron los productos de 5' y 3' RAGE generados en pCR4 generando 5'-T7/GRIS11-pCR4 y 3'-T7/GRIS10-pCR4 y se secuenciaron completamente. Las secuencias 5'-T7/GRIS11-pCR4 y 3'-T7/GRIS10-pCR4 solapantes representan 1593 pb de la secuencia del gen BZima codificante completa. Se obtuvo la secuencia 5' y 3' restante mediante RAGE repetida en ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus* digerido con BamHI fraccionado, ligado al adaptador de BamHI EBRETTE3/6 (5'-GATCGCGCCTCGAGGGTACCGAATTCCGGAA-3' SEQ ID NO: 21) (proyección de BamHI mostrada en cursiva). Se obtuvo la secuencia 5' completa usando 10 ng de ADN ligado al adaptador y T7/GRIS22 (5'-CGCTTCGGCGTCCGTTCCGGGCCAG-3' SEQ ID NO: 22) y la secuencia 3' usando T7/GRIS24 (5'-CCGGTGCACCGCAACGTCCTCATC-3' SEQ ID NO: 23). Se clonaron los productos de 5' y 3' RAGE generados en pCR4 generando 5'-T7/GRIS22-pCR4 y 3'-T7/GRIS24-pCR4 y se secuenciaron completamente. 5'-T7/GRIS22-pCR4 contenía una metionina de codón de iniciación pronosticado y 3'-T7/GRIS24-pCR4 contenía un codón de terminación en marco, completando la secuencia codificante de 2184 pb completa del gen de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* (SEQ ID NO: 24) que codifica para una α -galactosidasa de 727 aminoácidos (SEQ ID NO: 25). Se presentó la secuencia a GenBank (número de registro AM259273). Las regiones en la secuencia proteica de la α -galactosidasa de la que se derivaron los cebadores se describen en la figura 16.

EJEMPLO 7: EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE α -GALACTOSIDASA IDENTIFICADO DE *BACTEROIDES FRAGILIS*

Se clonó el constructo de expresión de α -galactosidasa FragB (SEQ ID NO: 6) a partir de ADN bacteriano genómico mediante PCR. El gen de α -galactosidasa FragB, que carece de la región codificante para el péptido señal amino-terminal supuesto 1-24, se sacó del ADN genómico de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285D) mediante PCR usando los cebadores BFRAGB2 (5'-GCGGGATCCCGGATGGGACGTGTTTATGACATTTCCAGTTTGGC-3' SEQ ID NO: 24)/BFRAGB3 (5'-GCCTCGAGAAGCTTCACTCTGAAATCTTCACGTTTGTCACTCG-3' SEQ ID NO: 25) y se amplificó usando la polimerasa Pfu Ultra (Stratagene). Las proyecciones de enzimas de restricción para BamH I y Hind III en los cebadores anteriores están subrayadas. Tras la digestión con BamH I y Hind III, se insertaron los productos de polinucleótido amplificados en el vector de expresión bacteriano pET28 (Novagen) en marco y en el sentido de 3' de la etiqueta 6xHis codificada por el plásmido para generar el plásmido pZQ-B006a. Para la construcción de un vector de expresión no etiquetado, se eliminó la etiqueta 6xHis en el vector pET28 mediante digestión con NcoI/BamHI seguido por inserción de un oligo bicatenario PETNCBAF (5'-CATGGATCCCAGGCCTCCGGATG-3' SEQ ID NO: 26)/(GATCCATCCGGAGCCTGGGATC-3' SEQ ID NO: 27) creando el plásmido pET28- δ His. Se subclonó el constructo de FragB descrito anteriormente que codifica para la proteína etiquetada con His en el sitio BamHI/HindIII de pET28- δ His para crear el plásmido pZQ-B006c para la expresión de la α -galactosidasa FragB no etiquetada. Se secuenciaron completamente todos los constructos en un instrumento 377 ABI Prism (Applied Biosystems). Para la expresión de proteína, se transformó pZQ-B006c en *E. coli*, Rosetta2 (DE3) (Invitrogen). Se hizo crecer el clon de *E. coli* en 1X Terrific Broth (Sigma), complementado con 34 μ g/ml de cloranfenicol y 50 μ g/ml de kanamicina a 37°C, 220 rpm hasta una DO de ~0,6 a 600 nm y se añadió IPTG hasta 0,5 mM para inducir la expresión de proteína diana. Se recogió el cultivo tras 3 h, mediante centrifugación a 3000 xg durante 30 min. Se almacenó el sedimento celular a -20°C. Se lisó el sedimento celular recogido de 350 ml de cultivo usando BugBuster 1X (Invitrogen) en NaOAc 25 mM, pH 5,5/NaCl 10 mM, complementado con 5 μ l de Benzonase (Invitrogen), y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se clarificó el lisado completo mediante centrifugación a 40.000 x g, 5°C, durante 30 min. Se resuspendieron los residuos celulares, que contenían más del 90% de actividad enzimática, en NaPO₄ 10 mM, pH 6,8/NaCl 400 mM y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se repitió la centrifugación a alta velocidad para recuperar el sobrenadante que contenía la actividad enzimática. Se cargó el sobrenadante resultante en una columna de hidroxipatita de 5 ml, equilibrada previamente con NaPO₄ 10 mM, pH 7,0. Se lavó la columna con 20 ml de tampón de equilibrado, seguido por elución usando un gradiente de NaPO₄, pH 7,0, desde 10 hasta 400 mM. Se agruparon las actividades enzimáticas, eluidas entre NaPO₄ 200-400 mM, pH 7,0, se concentraron y se intercambiaron con un dispositivo centrífugo Amicon (Grace) Plus 70, en 10 ml de Tris 40 mM, NaCl 400 mM/pH 7,5. Se dejó pasar la disolución de proteína a través de una columna de alta resolución de fenil-Sepharose de 5 ml (Amersham), equilibrada previamente con el tampón de diálisis, y se lavó la columna con 10 ml de tampón de diálisis tras cargar. Se agruparon la fracción no retenida y el lavado, se ajustaron a pH 8,5 con Tris 1 M, se diluyeron con un volumen igual de H₂O. Se sometió la disolución de proteína resultante a otra etapa de columna de paso, 2,3 ml de Macro-Prep High Q, equilibrada previamente con Tris 40 mM, pH 8,5/NaCl 10 mM, y se lavó la columna con 10 ml de tampón de equilibrado. Se agruparon la fracción no retenida y el lavado y se intercambiaron el tampón en 7 ml de NaPO₄ 10 mM, pH 6,8/NaCl 50 mM. Se determinó la concentración de proteína mediante el kit de ensayo de

proteína BCA de Pierce.

Se evaluó la α -galactosidasa FragB para determinar su capacidad para escindir el sustrato de cadena de hidrato de carbono ramificada B-tetra en condiciones convencionales (1 nmol de sustrato en 10 μ l de NaPO₄ 100 mM, pH 6,8/NaCl 50 mM), y la enzima purificada demostró una actividad específica extremadamente alta hacia el sustrato B-tetra: ~5-10 U/mg. Se evaluó el óptimo de pH de la α -galactosidasa FragB purificada con el sustrato B-tetra-AMC a lo largo de un intervalo de pH de 2,0 a 9,0 y los resultados se muestran en la figura 17. La enzima FragB tiene un intervalo de pH óptimo de 4,5 a 7,5. El análisis con el ensayo colorimétrico más sensible/cuantitativo proporciona la conclusión similar tal como se muestra en la figura 18, aunque se observó la actividad de la enzima en el extremo bajo del intervalo de pH sometido a prueba, es decir, se observó actividad por debajo de ~pH 4,2, una diferencia sutil en la actividad que no es detectable usando el ensayo de AMC-B-tetra basado en CCF. Por tanto, la enzima novedosa puede usarse satisfactoriamente en de condiciones ácidas a condición neutra e incluso condiciones ligeramente básicas, es decir, pH de aproximadamente 4 a pH de aproximadamente 7,4 o superior. En realizaciones actualmente preferidas, la enzima se usa dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5, y más preferiblemente pH de aproximadamente 6,5 a pH de aproximadamente 7,5. El intervalo de pH más preferido actualmente para la enzima novedosa son las condiciones que imitan el pH fisiológico de la sangre venosa o arterial circulante, con el fin de minimizar los efectos del pH sobre las propias células sanguíneas y no debido a las limitaciones del pH sobre la actividad y rendimiento enzimáticos.

Se clonó la α -galactosidasa FragA (SEQ ID NO: 5) de manera similar mediante PCR a partir del mismo ADN genómico que para la α -galactosidasa FragB, y se expresó de manera similar que la proteína con la etiqueta His6 en el extremo N-terminal en Rosetta (DE3) pLysS (Novagen). Se purificó la proteína soluble expresada hasta la homogeneidad mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado sucesiva (IMAC), cromatografía de intercambio catiónico o aniónico. Se demostró que la proteína purificada era similar a la α -galactosidasa de *S. griseoplanus* endógena (cepa 2357) en cuanto a actividad específica para el sustrato ramificado, especificidad de sustrato y óptimos de pH. El análisis de la actividad con un sustrato de tetrasacárido-AMC del grupo sanguíneo B en el intervalo de pH de 2-9 mostró que la enzima tiene un óptimo amplio entre 5 y 7,5. Se determinó la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa FragA con un panel diverso de estructuras de oligosacáridos y se encontró una especificidad notablemente rigurosa para galactosa unida en α 1-3 en la estructura del grupo sanguíneo B ramificada (figura 20). La enzima no escindía ni enlaces α 4Gal encontrados en antígenos de grupo sanguíneo P1 y P^k ni el enlace α 3Gal en la estructura B lineal sin fucosa.

EJEMPLO 8: α -GALACTOSIDASA *BACTEROIDES FRAGILIS* ESCINDE EFICAZMENTE OLIGOSACÁRIDOS B LINEALES A UN PH NEUTRO

El análisis adicional de la especificidad de sustrato de α -galactosidasa FragB purificada recombinante reveló sorprendentemente que esta enzima (en contraposición a la α -galactosidasa purificada anteriormente a partir de *S. griseoplanus*) presentaba baja actividad con el sustrato Gal α -pNP (~1,6 U/ml usando el sistema de tampón NaPO₄ 100 mM pH 6,8/NaCl 50 mM) (tabla IV).

Tabla IV. Comparación de las actividades específicas (U/mg) de α -galactosidasa FragB y α -galactosidasa de los granos del café

Sustrato	Granos del café	<i>B. fragilis</i> (FragB) ¹
Gal α -pNP	32 (pH 6,5) ²	1,6 (pH6,8)
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	0,017 (pH 5,5) ⁴	9,4 (pH 6,8)

¹Este trabajo.

²Derivado de Zhu, A., Monahan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Leng, L. & Goldstein, J. (1995) Arch Biochem Biophys 324, 65-70.

³No determinado.

⁴Derivado de la solicitud de patente estadounidense, número de publicación 20050208655.

Esto animó a los inventores a someter a prueba la especificidad de sustrato con sustratos que tienen enlaces α 1-3Gal y α 1-4Gal diferentes. Tal como se muestra en la figura 19, FragB mostró alta actividad con enlaces α 1-3Gal lineales (B-di y B lineal) además de las estructuras de oligosacárido del grupo sanguíneo B. De manera interesante, la actividad de FragB con el disacárido Gal α 1-3Gal era muy alta (~12 U/mg a pH 6,8), lo que sugiere que esta enzima es adecuada para la escisión eficaz del antígeno B lineal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R, en el que R es cualquier estructura de oligosacárido) también conocido como antígeno Galili (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86). El antígeno Galili es un antígeno de barrera de xenotrasplante principal encontrado en la mayoría de los tejidos animales excepto monos del viejo mundo y el hombre (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86). El xenotrasplante de por ejemplo tejidos y células de cerdo en el hombre da como resultado rechazo hiperagudo debido principalmente a la presencia de altos títulos en el hombre de anticuerpos de IgG frente al antígeno Galili. Hasta la fecha, sólo se han usado α -galactosidasas ampliamente reactivas tales como enzimas derivadas de los

5 granos del café con óptimos de pH ácido para la escisión del antígeno Galili de células y tejidos. Esto puede constituir un problema significativo puesto que todas las células animales expresan grandes cantidades de por ejemplo la estructura de glicolípido P^k de la serie globular (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Ceramida). Es más deseable usar enzimas α -galactosidasas con superior eficacia, especificidad y óptimo de pH neutro, tales como las descritas en el presente documento.

10 La α -galactosidasa FragB era específica para enlaces α 1-3Gal, y no se observó escisión significativa de varios enlaces α 1-4Gal (P₁ y P^k). Esto es similar a la α -galactosidasa obtenida de *S. griseoplanus*, pero representa una propiedad que es diferente de cualquier otra α -galactosidasa conocida incluyendo la enzima derivada de los granos del café. Los resultados se resumen en la tabla V.

Tabla V. Especificidad de sustrato de las α -galactosidasas

Sustratos	Especificidad de grupo sanguíneo	Granos del café ¹	<i>S. griseoplanus</i> ¹	<i>B. fragilis</i> ² (FragB)
Gal α -pNP	NA ³	+ ⁴	- ⁵	+
Gal α 1-3Gal	B (B-di)	+	-	+
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc	B lineal	+	-	+
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal	B-tri	+	+	+
Gal α 1-4Gal	P ₁	+	-	-
Gal α -4Gal/ β 1-4Glc	P ^k	+	-	-
GalNAc α 1-3(Fuca1-2) Gal	A-tri	-	-	-
Gal α 1-3(Fuca1-2) Gal β 1-4Glc-AMC	B-tetra	+	+	+
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	A-tetra	-	-	-

¹Derivado de la patente estadounidense 20050208655 (Ref.) y Zhu, A., Monahan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Leng, L. & Goldstein, J. (1995) Arch Biochem Biophys 324, 65-70.

15 ²Este trabajo.

³No aplicable.

⁴Actividad fácilmente detectable en las condiciones de ensayo.

⁵Actividad no fácilmente detectable en las condiciones de ensayo.

20 El sorprendente hallazgo de que la α -galactosidasa FragB puede representar una enzima altamente eficaz novedosa para la escisión de B lineal (epítomos Galili) animó a los inventores a someter a prueba la idoneidad y eficacia de esta enzima en la eliminación de tales epítomos de las superficies celulares. Los glóbulos rojos de conejo contienen cadenas de oligosacáridos de glicolípidos y glicoproteínas similares a los glóbulos rojos humanos, pero mientras que las cadenas de oligosacáridos en glóbulos rojos humanos terminan en estructuras ABH dependiendo del estado del grupo sanguíneo, los oligosacáridos de glóbulos rojos de conejo terminan en estructuras B lineales (epítomos Galili) (Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc). Se usa generalmente la lectina Bandeira (Griffonia) simplicifolia IB4 para detectar estructuras B lineales (epítomos Galili) (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86), y tal como se muestra en la tabla VI esta lectina aglutina fuertemente glóbulos rojos de conejo (pero no humanos).

30 Tabla VI: Aglutinación de glóbulos rojos humanos y de conejo con la lectina IB4 y reactivos de tipificación anti-B monoclonales de rutina

Tipo de RBC	Immucor/Gamma Anti-B		Diagast Anti-B		Lectina B4 10 ug/ml
	IS	4°C	IS	4°C	
Células de conejo nativas	2+	4+	4+	4+	4+
Células B humanas nativas	4+	4+	4+	4+	1+
Células A humanas nativas	0	0	0	0	0
Células O humanas nativas	0	0	0	0	0

35 Por tanto, los glóbulos rojos de conejo sirven como un modelo excelente para el análisis de la eficacia de α -galactosidasas en la eliminación del residuo α 1-3Gal inmunodominante de estructuras B lineales (epítomos Galili) de las superficies celulares. Puesto que se ha desarrollado previamente un procedimiento de conversión eficaz para la eliminación de antígenos de tipo A inmunodominantes de células sanguíneas usando una enzima α -N-acetilgalactosaminidasa de *C. meningosepticum* purificada, operativa usando un sistema de tampón glicina pH 6,8, se sometieron a prueba las mismas condiciones para la escisión con FragB de glóbulos rojos de conejo en

5 comparación con glóbulos rojos del grupo sanguíneo B humanos. Tal como se muestra en la tabla VII, FragB eliminó eficazmente la aglutinación con la lectina IB4 de glóbulos rojos de conejo a dosis muy bajas, casi comparables con las que se requirieron para la escisión con FragB del grupo sanguíneo B de glóbulos rojos humanos. La aglutinación de glóbulos rojos de conejo mediante la lectina IB4 se suprimió casi completamente mediante el tratamiento enzimático con una dosis de enzima de 10 g/ml proporcionando sólo una lectura microscópica (M⁺). Concentraciones superiores de enzima o incubación más larga suprimieron completamente la reactividad. Sin embargo, el gen homólogo FragA escindió sólo el grupo sanguíneo B de glóbulos rojos humanos.

10 Tabla VII: Resultados de aglutinación de glóbulos rojos humanos y de conejo digeridos con las enzimas modificadoras de glicano FragA o FragB

Conversión de rutina		Immucor Anti-B		Diagast Anti-B		Lectina B4
Enzima Frag B	Dosis ug/ml	IS	4°C	IS	4°C	10 ug/ml
Células B humanas	10	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0	0
	1,25	0	0	0	0	0
	0,625	0	W+	W+	1+	0
	0,3125	0	1+	1+	1+	0
Células de conejo	10	0	0	0	W+	M+
	5	0	0	0	W+	Vw+
	2,5	0	0	0	W+	W+
	1,25	0	0	0	1+	1+
	0,625	0	W+	W+	3+	1+
	0,3125	0	2+	4+	4+	2+
Enzima Frag A						
Células B humanas	10	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0	0
	1,25	0	0	0	0	0
	0,625	0	W+	W+	1+	0
	0,3125	1+	1+	1+	2+	0
Células de conejo	10	4+	4+	4+	4+	3+
	5	4+	4+	4+	4+	3+
	2,5	4+	4+	4+	4+	3+
	1,25	4+	4+	4+	4+	3+
	0,625	4+	4+	4+	4+	3+
	0,3125	4+	4+	4+	4+	3+

15 Esto demuestra que la isoforma de polipéptido FragB purificado descrita como parte de la familia del gen de α -galactosidasa novedosa notificada en el presente documento tiene especificidades de sustrato únicas que son diferentes de varios otros miembros dentro de esta familia, incluyendo los genes relacionados observados en *Streptomyces*. Además, demuestra que el polipéptido FragB descrito es adecuado para la eliminación enzimática de antígenos del grupo sanguíneo B inmunodominantes de glóbulos rojos, así como para la eliminación del antígeno Galili de xenotrasplante de glóbulos rojos. El polipéptido FragB purificado es por tanto superior a otras enzimas actualmente conocidas, con respecto a su óptimo de pH (lo más preferiblemente de pH 6,5 a pH 7,5), sus especificidad de sustrato restringida a enlaces Gal α 1-3 y su alta actividad específica observada.

- La eliminación enzimática de la galactosa terminal unida en α 1-3 inmunodominante de los antígenos Galili tiene importantes aplicaciones en el campo de los xenotrasplantes. El antígeno Galili constituye la barrera más importante para el xenotrasplante de órganos, tejidos, tendones, ligamentos y células desde animales hasta el hombre, y es la causa principal del fenómeno de rechazo hiperagudo (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86). Aproximadamente el 10% de la IgG sérica de individuos sanos normales se dirige al antígeno Galili. La eliminación enzimática del residuo de galactosa terminal expondrá estructuras comunes encontradas en el hombre, lo que puede suprimir el rechazo hiperagudo (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86).
- El procedimiento descrito para la eliminación enzimática del antígeno Galili en células de conejo en el que se lavan e se incuban células de conejo con la α -galactosidasa FragB en un tampón adecuado a pH neutro durante un periodo de tiempo da como resultado la eliminación eficaz del epítipo Galili (tabla VII). Un procedimiento similar aplicado a órganos, tejido, tendones, ligamentos y células animales da como resultado una eliminación eficaz de los antígenos Galili expuestos.
- El procedimiento preferido implica poner en contacto los tejidos o células animales con la α -galactosidasa FragB (o miembros homólogos de la familia génica con actividades enzimáticas similares) en un tampón adecuado tal como solución salina fisiológica, glicina u otros sistemas de tampón similares descritos en el presente documento, a pH neutro de 5,5 a 8,0 y más preferiblemente de 6,5 a 7,5. La dosis de enzima y el tiempo requerido para la eliminación enzimática de la galactosa terminal unida en α 1-3 inmunodominante generalmente siguen los parámetros de digestión descritos anteriormente para células sanguíneas, pero se evalúan empíricamente, tal como se determina mediante inmunoensayos basados en lectinas y anticuerpos tales como inmunocitología, inmunohistología y ELISA usando lectinas adecuadas tales como la lectina IB4 o anticuerpos monoclonales adecuados reactivos con el epítipo Galili (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83:674-86). Cuando la reacción finaliza, el órgano, tejido, tendón, ligamento o células animales modificados con la enzima se lavan con una disolución tampón apropiada (tal como solución salina fisiológica) para eliminar la disolución de enzima. Los tejidos o células animales carecen de antígenos Galili inmunodominantes, y pueden usarse ahora como xenotrasplante apropiado en un sujeto humano que necesita tal trasplante. Un ejemplo de esto es un ligamento porcino modificado de manera antigénica, que se usa para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior roto en un paciente humano. Véase por ejemplo la patente estadounidense 6.402.783.
- Antes del tratamiento, la superficie externa del xenoinjerto puede perforarse opcionalmente para aumentar la permeabilidad a los agentes usados para hacer que el xenoinjerto sea sustancialmente no inmunogénico. Puede usarse una aguja quirúrgica estéril tal como una aguja de calibre 18 para realizar esta etapa de perforación o, alternativamente, puede usarse un aparato similar a un peine que contiene una pluralidad de agujas. La perforación puede realizarse con diversos patrones, y con diversas separaciones de perforación a perforación, con el fin de establecer un acceso deseado al interior del xenoinjerto. La perforación también puede realizarse con un láser. En una realización de la invención, se establecen de manera circunferencial una o más líneas rectas de punciones separadas aproximadamente tres milímetros en la superficie externa del xenoinjerto.
- Antes de la implantación, el xenoinjerto de ligamento de la invención puede tratarse con digestión limitada mediante enzimas proteolíticas tales como ficina o tripsina para aumentar la flexibilidad del tejido o recubrirse con agentes anticalcificación, recubrimientos antitrombóticos, antibióticos, factores de crecimiento u otros fármacos que pueden potenciar la incorporación del xenoinjerto en la articulación de la rodilla del receptor. El xenoinjerto de ligamento de la invención puede esterilizarse adicionalmente usando métodos conocidos, por ejemplo, con tratamiento con formaldehído o glutaraldehído adicional, esterilización con óxido de etileno, esterilización con óxido de propileno o similar. El xenoinjerto puede almacenarse congelado hasta que se requiera su uso.
- El xenoinjerto de ligamento de la invención, o un segmento del mismo, puede implantarse en una articulación de rodilla humana dañada por los expertos en la técnica usando técnicas quirúrgicas artroscópicas conocidas. Los expertos en la técnica conocen instrumentos específicos para realizar técnicas artroscópicas, que garantizan una colocación precisa y reproducible de los implantes de ligamento. Inicialmente, se logra la artroscopía de diagnóstico completa de la articulación de la rodilla usando métodos conocidos. Se extrae el ligamento dañado de manera irreparable con una cuchilla quirúrgica. Se identifican los sitios de inserción anatómicos para el ligamento y se perforan para alojar un tapón óseo. El tamaño del tapón óseo puede ser de aproximadamente 9-10 mm de anchura por aproximadamente 9-10 mm de profundidad por aproximadamente 20-40 mm de longitud. Se lleva el ligamento xenogénico a través de los orificios de perforación y se fija con tornillos de interferencia. Se realiza el cierre de rutina.
- El uso de los polipéptidos de la presente invención permite por tanto la eliminación del antígeno Galili de muchos tipos de tejidos diferentes, usando los procedimientos de modificación descritos en el presente documento y tal como pueden adaptarse adicionalmente a los tejidos particulares, en vista de las enseñanzas proporcionadas, por un experto. Estos tejidos modificados se usan para una variedad de procedimientos de trasplante en los que se requieren xenotrasplantes no inmunogénicos, tal como se describe a continuación: para crear por ejemplo colágeno inyectable sustancialmente no inmunogénico (véase la patente estadounidense 7.064.187); para xenoinjertos óseos (véase la patente estadounidense 6.972.041); para xenoinjertos de tejido blando y tejido blando reducido en

proteoglicano (véanse las patentes estadounidenses 6.758.865 y 6.455.309); válvulas cardíacas de xenoinjerto (véase la patente estadounidense 6.383.732); y xenoinjertos de menisco (véanse las patentes estadounidenses 6.093.204 y 5.984.858).

5 En otra realización particularmente preferida, la invención proporciona matrices de tejido, preferiblemente las compuestas por tejidos deficientes en α 1,3-galactosa (véase la patente estadounidense 6.933.326 y las solicitudes de patente estadounidense 20050159822 y 20050028228). Se describen métodos de preparación y uso de estas matrices de tejido en las solicitudes y patentes anteriores, y la desgalactosilación de los tejidos se logra usando las α 3 galatosidasas novedosas tal como se describe en el presente documento (SEQ ID NO: 2-9, o fragmentos activos o equivalentes funcionales de las mismas).
10

Lista de secuencias

15 <110> VELICO MEDICAL, INC.
<120> ALFA-GALACTOSIDASAS NOVEDOSAS
<130> 1156-0080
20 <140> Documento JP 2008-538088
<141> 31-10-2006
<150> Documento PCT/US06/42350
25 <151> 31-10-2006
<150> Documento 60/836.000
30 <151> 07-08-2006
<150> Documento 60/731.845
<151> 31-10-2005
35 <160> 29
<170> PatentIn versión 3.5
40 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
45 <213> *Streptomyces griseoplanus*
<400> 1
50 Phe Ala Asn Gly Leu Leu Thr
1 5
<210> 2
<211> 625
55 <212> PRT
<213> *Streptomyces avermitilis*
60 <400> 2

ES 2 386 413 T3

Met Ala His Gly Cys Ser Gly Gly Ala Met Ser Arg Phe Val Phe Leu
1 5 10 15
Gly Val Ala Leu Ala Leu Leu Gly Gly Ala Thr Ser Pro Ala Ala Ala
20 25 30
Ala Pro Arg Val Thr Pro Val Val Val Asp Val Asp Asp Tyr Gly Ala
35 40 45
Asp Pro Thr Gly Arg Thr Asp Ser Thr Pro Ala Val Ala Ala Ala Leu
50 55 60
Arg His Ala Lys Ser Val Asp Arg Pro Val Arg Ile Val Phe Ser Lys
65 70 75 80
Gly Thr Tyr Gln Leu Tyr Pro Glu Arg Ala Glu Thr Arg Glu Leu Tyr
85 90 95
Met Ser Asn Thr Val Gly Ala Asp Gln Arg Tyr Arg Asp Lys Lys Ile
100 105 110

ES 2 386 413 T3

Gly Leu Leu Val Glu Asp Met His Asp Val Thr Val Asp Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ala Lys Leu Val His His Gly Leu Gln Thr Ala Phe Ala Ser Ile Arg
 130 135 140
 Ser Thr Asp Val Thr Phe Gln Asn Phe Ser Phe Asp Tyr Ala Ala Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Ile Asp Ala Thr Val Ala Thr Thr Gly Val Thr Asp Gly His
 165 170 175
 Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Pro Ala Gly Ser Pro Tyr Arg Val Asn
 180 185 190
 Gly Thr His Ile Thr Trp Leu Gly Glu Thr Ser Pro Ala Thr Gly Gln
 195 200 205
 Pro Tyr Trp Ser Gly Val Asp Gly Leu Gln Tyr Thr Gln Ile His Asp
 210 215 220
 Pro Glu Ala Gln Arg Thr Trp Arg Gly Asp Asn Pro Leu Phe Asn Asp
 225 230 235 240
 Val Ala Ala Val Thr Asp Leu Gly Gly Arg Arg Ile Arg Ile Asp Tyr
 245 250 255
 Thr Thr Ala Ala Arg Pro Ala Asp Ala Gly Leu Val Tyr Gln Met Arg
 260 265 270
 Leu Ile Glu Arg Thr Glu Pro Gly Ala Phe Ile Trp Glu Ser Lys Asn
 275 280 285
 Val Thr Met Arg Ser Met Asn Ala Tyr Tyr Leu Gln Ser Phe Gly Val
 290 295 300
 Val Gly Gln Phe Ser Glu Asn Ile Ser Ile Asp Lys Val Asn Phe Ala
 305 310 315 320
 Pro Asp Pro Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ala Ser Phe Ala Asp Phe Val
 325 330 335
 Gln Met Ser Gly Val Lys Gly Lys Val Ser Ile Thr Arg Ser Leu Phe
 340 345 350
 Asp Gly Pro His Asp Asp Pro Ile Asn Ile His Gly Thr Tyr Leu Glu
 355 360 365
 Val Val Gly Lys Pro Gly Pro Ser Thr Leu Thr Leu Ala Tyr Lys His
 370 375 380

ES 2 386 413 T3

Pro Gln Thr Ala Gly Phe Pro Gln Phe Ala Pro Gly Asp Glu Val Glu
 385 390 395 400

Phe Ala Thr Lys Arg Thr Met Thr Pro Leu Ala Asp Ala His Ala Gln
 405 410 415

Val Thr Ala Val Asp Gly Pro Ser Gly Met Asp His Thr Lys Pro Leu
 420 425 430

Thr Thr Met Thr Val Thr Phe Asp Arg Pro Val Pro Ala Gly Val Glu
 435 440 445

Thr Gly Gly Thr Val Val Glu Asn Ile Thr Ala Thr Pro Ser Val Val
 450 455 460

Ile Ser Gly Asn Val Phe Arg Asn Val Pro Thr Arg Gly Ile Leu Val
 465 470 475 480

Thr Thr Arg Lys Pro Val Leu Ile Thr Gly Asn Arg Phe Asp Gly Met
 485 490 495

Ser Met Ala Ser Ile Tyr Val Ser Ala Asp Ala Tyr Gln Trp Tyr Glu
 500 505 510

Ser Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Arg Gly Asn Ser Phe Thr Arg
 515 520 525

Pro Ser Gly Pro Val Ile Phe Val Glu Pro Thr Asn Gln Val Ile Asp
 530 535 540

Pro Ala Thr Pro Val His His Asn Ile Ser Val Glu His Asn Ser Phe
 545 550 555 560

Asp Ile Gly Asp Val Thr Val Val Asn Ala Lys Ser Val Gly Gly Phe
 565 570 575

Ala Phe Thr Gly Asn Thr Val Arg Arg Leu Asp Gly Ala Asp His Pro
 580 585 590

Pro Tyr Thr Ser Pro Leu Phe Val Phe His Gly Ser Ser Gly Ile Arg
 595 600 605

Ile Ala Arg Asn His Tyr Asp Lys Gly Leu Asn Thr Ser Val Val Thr
 610 615 620

Asp
 625

<210> 3

5

<211> 568

ES 2 386 413 T3

<212> PRT

<213> *Bacteroides thetaiotaomicron*

5

<400> 3

Met Met Ser Val Trp Phe Ile Gln Leu Ala Ile Phe Ala Gln Ser Arg
 1 5 10 15
 Ile Ile Glu Val Phe Pro Glu Gln Gly Lys Asp Ile Glu Asn Ile Ala
 20 25 30
 Leu Ala Leu Lys Lys Ala Ala Asp Cys Lys Gly Arg Pro Val Thr Val
 35 40 45
 Lys Phe Ser Pro Gly Ile Tyr Gln Leu Asp Arg Ala Lys Ser Ser Gln
 50 55 60
 Val Leu Tyr Tyr Ile Ser Asn Thr Thr Ser Glu Leu Asp Asp Pro Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Lys His Ile Gly Leu Tyr Leu Asn Thr Leu Lys Asn Ile Thr
 85 90 95
 Ile Asp Gly Cys Gly Ser Thr Leu Leu Met Asn Gly Glu Met Thr Ser
 100 105 110
 Phe Val Leu Asp Lys Cys Glu Gly Ile Val Leu Lys Asn Phe Asn Ile
 115 120 125
 Asp Tyr Lys His Pro Thr Gln Thr Glu Val Glu Val Leu Glu Glu Gly
 130 135 140
 Asn Asp Tyr Leu Ile Val Gln Val His Pro Thr Ser Gln Tyr Arg Ile
 145 150 155 160
 Val Asp Ala Gln Leu Glu Trp Tyr Gly Asp Gly Trp Ser Phe Lys Asn
 165 170 175
 Gly Ile Ala Gln Ser Tyr Asp Arg Ile Ser Glu Met Thr Trp Arg Ser
 180 185 190
 Trp Ser Pro Met Glu Asn Leu Leu Arg Thr Val Glu Leu Arg Pro Asn
 195 200 205
 Val Leu Tyr Leu Gln Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Val Gly Leu His Thr
 210 215 220
 Ile Phe Gln Met Arg Asp Ser Phe Arg Asp Glu Val Ser Gly Phe Val
 225 230 235 240
 Asn Arg Ser Lys Gly Ile Leu Leu Glu Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Leu
 245 250 255
 Gly Asn Phe Gly Val Val Cys Gln Tyr Ser Glu Asn Ile Thr Val Asp
 260 265 270

ES 2 386 413 T3

Arg Cys Asn Phe Ala Pro Arg Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Ala Gly
 275 280 285

Phe Ala Asp Phe Ile Gln Val Ser Gly Cys Arg Gly Met Ile Asp Ile
 290 295 300

Lys Asn Ser Arg Phe Ile Gly Ala His Asp Asp Pro Ile Asn Ile His
 305 310 315 320

Gly Thr His Leu Arg Val Ile Glu Phe Leu Ser Asp Asn Arg Leu Lys
 325 330 335

Leu Arg Phe Met His Asp Gln Thr Phe Gly Phe Glu Ala Phe Phe Lys
 340 345 350

Gly Asp Asp Ile Glu Leu Val Asp Ser Arg Ser Leu Leu Val Val Gly
 355 360 365

Lys Cys Lys Val Lys Glu Ala Lys Leu Val Thr Pro Arg Glu Met Glu
 370 375 380

Leu Thr Leu Ser Ser Pro Leu Ser Ser Glu Val Met Gln Gln Lys Asp
 385 390 395 400

Leu Val Ile Glu Asn Val Thr Trp Thr Pro Glu Val Arg Ile Thr Asn
 405 410 415

Asn Tyr Phe Ala Arg Val Pro Thr Arg Gly Ile Leu Ile Thr Thr Arg
 420 425 430 435

Arg Lys Ser Leu Ile Glu Gly Asn Thr Phe Tyr Gly Met Gln Met Ser
 435 440 445

Gly Ile Phe Val Ala Asp Asp Gly Leu Ser Trp Tyr Glu Ser Gly Pro
 450 455 460

Val His Asp Leu Thr Ile Arg Gln Asn Thr Phe Leu Asn Cys Gly Glu
 465 470 475 480

Pro Ile Ile Ser Ile Asp Pro Glu Asn Arg Glu Tyr Lys Gly Ala Val
 485 490 495

His Lys Asn Ile Thr Ile Glu Glu Asn Tyr Phe Tyr Met Arg Lys Asn
 500 505 510

Ser Ser Cys Ala Ile Arg Ala Lys Ala Val Asp Gly Leu Met Ile Arg
 515 520 525

His Asn Leu Ile Tyr Ser Leu Asp Thr Glu Lys Asn Lys Glu Ser Asp
 530 535 540

ES 2 386 413 T3

Phe Ile Gln Met Tyr Asn Cys Asn Glu Val Thr Ile Lys Glu Asn Arg
545 550 555 560

Val Gln Leu His His Leu Phe Lys
565

<210> 4

5

<211> 605

<212> PRT

10

<213> *Bacteroides fragilis*

<400> 4

ES 2 386 413 T3

Met Lys Lys Tyr Leu His Ile Leu Pro Ala Cys Phe Leu Phe Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ala His Ala Gln Gln Lys Asp Thr Val Tyr Val Thr Asp Phe Gly
20 25 30

Ala Val Pro Tyr Ser Tyr Glu Asn Cys Val Thr Gln Ile Gln Ala Ala
35 40 45

Ile Asp Glu Cys Lys Arg Thr Gly Ala Lys Val Leu Ser Leu Pro Glu
50 55 60

Gly Arg Tyr Asp Ile Trp Pro Glu Gly Ala Thr Arg Lys Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Thr Ser Thr Glu Gln Glu Cys Pro Ser Lys Val Lys Thr
85 90 95

Val Gly Leu Met Leu His Glu Ile Asp Asp Leu Thr Ile Glu Gly Asn
100 105 110

Gly Ala Thr Leu Met Tyr His Gly Lys Met Thr Thr Ile Ala Leu Glu
115 120 125

His Cys Asn Gly Val Arg Ile Asn Asn Leu His Ile Asp Phe Glu Arg
130 135 140

Pro Ala Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Arg Lys Val Thr Gly Gly Glu Thr
145 150 155 160

Glu Val Thr Leu His Arg Asp Thr Arg Tyr Glu Ile Val Asn Gly Lys
165 170 175

Ile Arg Leu Tyr Gly Glu Gly Trp Arg Ser Asn Lys Asn His Cys Ile
180 185 190

Glu Tyr Asp Pro Asp Thr Glu Ser Phe Thr Tyr Ser Gln Gly Trp Asn
195 200 205

ES 2 386 413 T3

Thr Leu Ser Ala Ser Asp Ala Arg Glu Ile Ala Pro Gly Ile Val Arg
 210 215 220
 Phe Asn Thr Pro Ala Glu Phe Met Pro Lys Ala Gly Asn Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Arg Asp Ile Ile Arg Asp Gln Val Gly Phe Phe Ile Leu Glu Ser
 245 250 255
 Lys Asn Ile Thr Leu Ser Arg Leu Gln Met His Tyr Met His Gly Leu
 260 265 270
 Gly Ile Val Ser Gln Tyr Thr Glu Asn Ile Thr Met Asp Arg Val Lys
 275 280 285
 Cys Ala Pro Arg Pro Asp Ser Gly Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Asp
 290 295 300
 Met Met His Phe Ser Gly Cys Lys Gly Lys Val Ile Ile Asp Ser Cys
 305 310 315 320
 Tyr Phe Ala Gly Ala Gln Asp Asp Pro Val Asn Val His Gly Thr Asn
 325 330 335
 Leu Arg Ala Leu Glu Lys Ile Asp Ala Gln Thr Leu Lys Leu Arg Phe
 340 345 350
 Met His Gly Gln Ser Tyr Gly Phe Asn Ala Tyr Phe Lys Gly Asp Thr
 355 360 365
 Val Ala Phe Ile Arg Ala Ala Thr Met Glu Arg Phe Ala Ser Ala Thr
 370 375 380
 Val Arg Asp Val Arg Arg Ile Ser Asp Arg Ile Val Glu Val Arg Phe
 385 390 395 400
 Asp Arg Asp Ile Pro Thr Ser Leu Glu Leu Asn His Asp Cys Val Glu
 405 410 415
 Asn Met Thr Cys Thr Pro Glu Val Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Phe Thr
 420 425 430
 Arg Thr Ser Thr Arg Gly Thr Leu Val Thr Thr Pro Arg Lys Val Val
 435 440 445
 Ile Glu Asn Asn Thr Tyr Tyr Lys Thr Gly Met Ser Ala Ile Leu Ile
 450 455 460
 Glu Ala Asp Ala Glu Gly Trp Tyr Glu Ser Gly Pro Val Lys Asp Val
 465 470 475 480

ES 2 386 413 T3

Leu Ile Lys Gly Asn Thr Phe Ile Asp Cys Ala Tyr Asn Gly Gly Pro
 485 490 495

Gly His Ala Val Ile Ala Ile His Pro Ser Asn Lys Ile Ile Asp Ala
 500 505 510

Glu Arg Pro Val His Gln Asn Ile Arg Ile Glu Asp Asn Thr Phe Arg
 515 520 525

Thr Phe Asp Tyr Pro Val Leu Tyr Ala Lys Ser Thr Ala Gly Leu Leu
 530 535 540

Phe Arg Asn Asn Thr Ile Val Arg Thr Glu Thr Phe Pro Ala Ala Ser
 545 550 555 560

Gly Asn Pro Tyr Val Phe Tyr Leu Asn Gly Cys Lys Lys Ala Val Ile
 565 570 575

Glu Gly Thr Val Phe Lys Gly Glu Thr Pro Arg Gln Ser Ile Lys Thr
 580 585 590

Glu Asn Met Lys Arg Lys Asp Leu Lys Thr Thr Ile Lys
 595 600 605

<210> 5

5

<211> 605

<212> PRT

10 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 5

ES 2 386 413 T3

Met Lys Lys Tyr Leu His Ile Leu Pro Ala Cys Phe Leu Phe Tyr Ala
1 5 10 15
Ala Ala His Ala Gln Gln Lys Asp Thr Val Tyr Val Thr Asp Phe Gly
20 25 30
Ala Val Pro Tyr Ser Tyr Glu Asn Cys Val Thr Gln Ile Gln Ala Ala
35 40 45
Ile Asp Glu Cys Lys Arg Thr Gly Ala Lys Val Leu Ser Leu Pro Glu
50 55 60
Gly Arg Tyr Asp Ile Trp Pro Glu Gly Ala Ile Arg Lys Glu Tyr Tyr
65 70 75 80
Ile Ser Asn Thr Ser Thr Glu Gln Glu Cys Pro Ser Lys Val Lys Thr
85 90 95
Val Gly Leu Met Leu His Glu Ile Asp Asp Leu Thr Ile Glu Gly Asn
100 105 110
Gly Ala Thr Leu Met Tyr His Gly Lys Met Thr Thr Ile Ala Leu Glu
115 120 125

ES 2 386 413 T3

His Cys Asn Gly Val Arg Ile Asn Asn Leu His Ile Asp Phe Glu Arg
 130 135 140
 Pro Ala Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Arg Lys Val Thr Gly Gly Glu Thr
 145 150 155 160
 Glu Val Thr Leu His Arg Asp Thr Arg Tyr Glu Ile Val Asn Gly Lys
 165 170 175
 Ile Arg Leu Tyr Gly Glu Gly Trp Arg Ser Asn Arg Asn His Cys Ile
 180 185 190
 Glu Tyr Asp Pro Asp Thr Glu Ser Phe Thr Tyr Ser Gln Gly Trp Asn
 195 200 205
 Thr Leu Ser Ala Ser Asp Ala Arg Glu Ile Ala Pro Gly Ile Val Arg
 210 215 220
 Phe Asn Thr Pro Ala Glu Phe Met Pro Lys Ala Gly Asn Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Arg Asp Ile Ile Arg Asp Gln Val Gly Leu Phe Ile Leu Glu Ser
 245 250 255
 Lys Asn Ile Thr Leu Ser Arg Leu Gln Met His Tyr Met His Gly Leu
 260 265 270
 Gly Ile Val Ser Gln Tyr Thr Glu Asn Ile Thr Met Asp Arg Val Lys
 275 280 285
 Cys Ala Pro Arg Pro Asp Ser Gly Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Asp
 290 295 300
 Met Met His Phe Ser Gly Cys Lys Gly Lys Val Ile Ile Asp Ser Cys
 305 310 315 320
 Tyr Phe Ala Gly Ala Gln Asp Asp Pro Val Asn Val His Gly Thr Asn
 325 330 335
 Leu Arg Ala Leu Glu Lys Ile Asp Ala Gln Thr Leu Lys Leu Arg Phe
 340 345 350
 Met His Gly Gln Ser Tyr Gly Phe Asn Ala Tyr Phe Lys Gly Asp Thr
 355 360 365
 Val Ala Phe Val Arg Ala Ala Thr Met Glu Arg Phe Ala Ser Ala Thr
 370 375 380
 Val Arg Asp Val Arg Arg Ile Ser Asp Arg Ile Val Glu Val Arg Phe
 385 390 395 400

ES 2 386 413 T3

Asp Arg Asp Ile Pro Thr Ser Leu Glu Leu Asn His Asp Cys Val Glu
 405 410 415

Asn Met Thr Cys Thr Pro Glu Val Glu Ile Arg Asn Cys Tyr Phe Thr
 420 425 430

Arg Thr Ser Thr Arg Gly Thr Leu Val Thr Thr Pro Arg Lys Val Val
 435 440 445

Ile Glu Asn Asn Thr Tyr Tyr Lys Thr Gly Met Ser Ala Ile Leu Ile
 450 455 460

Glu Ala Asp Ala Glu Gly Trp Tyr Glu Ser Gly Pro Val Lys Asp Val
 465 470 475 480

Leu Ile Lys Gly Asn Thr Phe Ile Asp Cys Ala Tyr Asn Gly Gly Pro
 485 490 495

Gly His Ala Val Ile Ala Ile His Pro Ser Asn Lys Ile Ile Asp Ala
 500 505 510

Glu Arg Pro Val His Gln Asn Ile Arg Ile Glu Asp Asn Thr Phe Arg
 515 520 525

Thr Phe Asp Tyr Pro Val Leu Tyr Ala Lys Ser Thr Ala Gly Leu Leu
 530 535 540

Phe Arg Asn Asn Thr Ile Val Arg Thr Glu Thr Phe Pro Ala Val Ser
 545 550 555 560

Gly Asn Pro Tyr Val Phe Tyr Leu Asn Gly Cys Lys Lys Ala Val Ile
 565 570 575

Glu Gly Thr Val Phe Glu Gly Glu Thr Pro Arg Gln Ser Ile Lys Thr
 580 585 590

Glu Asn Met Lys Arg Lys Asp Leu Lys Thr Thr Ile Lys
 595 600 605

<210> 6

5

<211> 595

<212> PRT

10 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 6

ES 2 386 413 T3

Met Lys Thr Ile Leu Leu Phe Ala Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Val Ser Asp Val Cys Ala Gln Glu Arg Val Tyr Asp Ile Ser Gln Phe
20 25 30

ES 2 386 413 T3

Gly Leu Lys Ala Asn Ser Lys Lys Asn Ala Ser Pro Val Val Arg Lys
 35 40 45
 Ala Ile Ala Lys Ile Lys Ala Glu Cys Arg Asp Gly Glu Lys Val Ile
 50 55 60
 Leu Arg Phe Pro Ala Gly Arg Tyr Asn Phe His Glu Ala Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Val Arg Glu Tyr Tyr Ile Ser Asn His Asp Gln Asp Asn Pro Lys Lys
 85 90 95
 Val Gly Ile Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Leu Thr Ile Asp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ser Glu Phe Val Phe Tyr Gly Arg Met Ile Pro Val Ser Leu Leu
 115 120 125
 Arg Ser Glu Asn Cys Val Leu Lys Asn Phe Ser Ile Asp Phe Glu Gln
 130 135 140
 Pro His Ile Ala Gln Val Gln Val Val Glu Asn Asp Pro Glu Lys Gly
 145 150 155 160
 Ile Thr Phe Glu Pro Ala Pro Trp Val Asp Tyr Arg Ile Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Val Phe Glu Gly Leu Gly Glu Gly Trp Val Met Arg Tyr Ser Trp
 180 185 190
 Gly Ile Ala Phe Asp Gly Lys Thr Lys His Val Val Tyr Asn Thr Ser
 195 200 205
 Asp Ile Gly Cys Pro Thr Lys Gly Ala Phe Glu Val Ala Pro Arg Arg
 210 215 220
 Ile Cys Ser Pro Lys Trp Lys Asp Ala Arg Leu Val Pro Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Val Ala Met Arg Gly Trp Gly Arg Pro Thr Pro Gly Ile Phe Met Ser
 245 250 255
 His Asp Val Asn Thr Ser Leu Leu Asp Val Lys Val His Tyr Ala Glu
 260 265 270
 Gly Met Gly Leu Leu Ala Gln Leu Cys Glu Asp Ile Thr Leu Asp Gly
 275 280 285
 Phe Gly Val Cys Leu Lys Gly Asn Asn Asp Pro Arg Tyr Phe Thr Thr
 290 295 300

ES 2 386 413 T3

Gln Ala Asp Ala Thr His Phe Ser Gly Cys Lys Gly Lys Ile Val Ser
 305 310 315 320

Lys Asn Gly Leu Tyr Glu Gly Met Met Asp Asp Ala Ile Asn Val His
 325 330 335

Gly Thr Tyr Leu Lys Val Ile Lys Arg Val Asp Asp His Thr Leu Ile
 340 345 350

Gly Arg Tyr Met His Asp Gln Ser Trp Gly Phe Glu Trp Gly Arg Pro
 355 360 365

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

Lys Gln Asn Gln Ile Thr Ala Ile Arg Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Ile
 385 390 395 400

Gln Gly Ala Arg Glu Phe Ser Ile Thr Phe Lys Glu Ala Ile Asp Pro
 405 410 415

Ala Ile Asn Glu Lys Ser Gly Phe Gly Ile Glu Asn Leu Thr Trp Thr
 420 425 430

Pro Glu Val Leu Phe Ala Gly Asn Thr Ile Arg Asn Asn Arg Ala Arg
 435 440 445

Gly Thr Leu Phe Ser Thr Pro Lys Lys Thr Val Val Glu Asp Asn Leu
 450 455 460

Phe Asp His Thr Ser Gly Thr Ala Ile Leu Leu Cys Gly Asp Cys Asn
 465 470 475 480

Gly Trp Phe Glu Thr Gly Ala Cys Arg Asp Val Thr Ile Arg Arg Asn
 485 490 495

Arg Phe Ile Asn Ala Leu Thr Asn Met Phe Gln Phe Thr Asn Ala Val
 500 505 510

Ile Ser Ile Tyr Pro Glu Ile Pro Asn Leu Lys Asp Gln Gln Lys Tyr
 515 520 525

Phe His Gly Gly Lys Asp Gly Gly Ile Val Ile Glu Asp Asn Glu Phe
 530 535 540

Asp Thr Phe Asp Ala Pro Ile Leu Tyr Ala Lys Ser Val Asp Gly Leu
 545 550 555 560 565

Ile Phe Arg Asn Asn Val Ile Lys Thr Asn Thr Glu Phe Lys Pro Phe
 565 570 575

ES 2 386 413 T3

His Trp Asn Lys Asp Arg Phe Leu Leu Glu Arg Val Thr Asn Val Lys
580 585 590

Ile ser Glu
595

<210> 7

5 <211> 595

<212> PRT

10 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 7

ES 2 386 413 T3

Met Lys Thr Ile Leu Leu Phe Ala Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Val Ser Asp Val Cys Ala Gln Glu Arg Val Tyr Asp Ile Ser Gln Phe
20 25 30

Gly Leu Lys Ala Asn Ser Lys Lys Asn Ala Ser Pro Val Val Arg Lys
35 40 45

Ala Ile Ala Lys Ile Lys Ala Glu Cys Arg Asp Gly Glu Lys Val Ile
50 55 60

Leu Arg Phe Pro Ala Gly Arg Tyr Asn Phe His Glu Ala Gly Ser Thr
65 70 75 80

Val Arg Glu Tyr Tyr Ile Ser Asn His Asp Gln Asp Asn Pro Lys Lys
85 90 95

Val Gly Ile Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Leu Thr Ile Asp Gly Gln
100 105 110

Gly ser Glu Phe Val Phe Tyr Gly Arg Met Ile Pro Val Ser Leu Leu
115 120 125

Arg Ser Glu Asn Cys Val Leu Lys Asn Phe Ser Ile Asp Phe Glu Gln
130 135 140

Pro His Ile Ala Gln Val Gln Val Val Glu Asn Asp Pro Glu Lys Gly
145 150 155 160

Ile Thr Phe Glu Pro Ala Pro Trp Val Asp Tyr Arg Ile Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Val Phe Glu Gly Leu Gly Glu Gly Trp Val Met Arg Tyr Ser Trp
180 185 190

Gly Ile Ala Phe Asp Gly Lys Thr Lys His Val Val Tyr Asn Thr Ser
195 200 205

Asp Ile Gly Cys Pro Thr Lys Gly Ala Phe Glu Val Ala Pro Arg Arg
210 215 220

ES 2 386 413 T3

Ile Cys Ser Pro Lys Trp Lys Asp Ala Arg Leu Val Pro Gly Thr Val
 225 230 235 240

Val Ala Met Arg Gly Trp Gly Arg Pro Thr Pro Gly Ile Phe Met Ser
 245 250 255

His Asp Val Asn Thr Ser Leu Leu Asp Val Lys Val His Tyr Ala Glu
 260 265 270

Gly Met Gly Leu Leu Ala Gln Leu Cys Glu Asp Ile Thr Leu Asp Gly
 275 280 285

Phe Gly Val Cys Leu Lys Gly Asp Asn Asp Pro Arg Tyr Phe Thr Thr
 290 295 300

Gln Ala Asp Ala Thr His Phe Ser Gly Cys Lys Gly Lys Ile Val Ser
 305 310 315 320

Lys Asn Gly Leu Tyr Glu Gly Met Met Asp Asp Ala Ile Asn Val His
 325 330 335

Gly Thr Tyr Leu Lys Val Ile Lys Arg Val Asp Asp His Thr Leu Ile
 340 345 350

Gly Arg Tyr Met His Asp Gln Ser Trp Gly Phe Glu Trp Gly Arg Pro
 355 360 365

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

Lys Gln Asn Gln Ile Thr Ala Ile Arg Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Ile
 385 390 395 400

Arg Gly Ala Arg Glu Phe Ser Ile Thr Phe Lys Glu Ala Ile Asp Pro
 405 410 415

Ala Ile Asn Glu Lys Ser Gly Phe Gly Ile Glu Asn Leu Thr Trp Thr
 420 425 430

Pro Glu Val Leu Phe Ala Gly Asn Thr Ile Arg Asn Asn Arg Ala Arg
 435 440 445

Gly Thr Leu Phe Ser Thr Pro Lys Lys Thr Val Val Glu Asp Asn Leu
 450 455 460

Phe Asp His Thr Ser Gly Thr Ala Ile Leu Leu Cys Gly Asp Cys Asn
 465 470 475 480

Gly Trp Phe Glu Thr Gly Ala Cys Arg Asp Val Thr Ile Arg Arg Asn
 485 490 495

ES 2 386 413 T3

Arg Phe Ile Asn Ala Leu Thr Asn Met Phe Gln Phe Thr Asn Ala Val
500 505 510

Ile Ser Ile Tyr Pro Glu Ile Pro Asn Leu Lys Asp Gln Gln Lys Tyr
515 520 525

Phe His Gly Gly Lys Asp Gly Gly Ile Val Ile Glu Asp Asn Glu Phe
530 535 540

Asp Thr Phe Asp Ala Pro Ile Leu Tyr Ala Lys Ser Val Asp Gly Leu
545 550 555 560

Ile Phe Arg Asn Asn Val Ile Lys Thr Asn Thr Glu Phe Lys Pro Phe
565 570 575

His Trp Asn Lys Asp Arg Phe Leu Leu Glu Arg Val Thr Asn Val Lys
580 585 590

Ile Ser Glu
595

<210> 8

5

<211> 615

<212> PRT

10

<213> *Bacteroides thetaiotaomicron*

<400> 8

ES 2 386 413 T3

Met Arg Thr Phe Leu Ser Leu Lys Thr Cys Leu Leu Ser Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Cys Val Asn Ser Ile Ala Ala Ser Lys Ile Ile Ser Val Ser Asp
 20 25 30

Phe Gly Leu Lys Pro Asp Ser Arg Ile Asn Ala Val Pro Phe Ile Gln
 35 40 45

Lys Ala Ile Asp Ala Cys Lys Gln His Pro Gly Ser Thr Leu Val Phe
 50 55 60

Pro Lys Gly Arg Tyr Asp Phe Trp Ala Gln His Ala Ile Glu Lys Asp
 65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Thr Asn Thr Tyr Asp Val Asn Pro Lys Ile Leu Ala Val
 85 90 95

Leu Leu Glu Gln Ile Asn Asp Leu Thr Ile Asp Gly Asn Gly Ser Glu
 100 105 110

Phe Ile Met His Gly Arg Met Gln Pro Phe Thr Leu Asp His Cys Arg
 115 120 125

ES 2 386 413 T3

Asn Ile Thr Leu Lys Asn Phe Ser Val Asp Trp Glu Ile Pro Leu Thr
 130 135 140

Ala Gln Gly Ile Val Thr Gln Ser Thr Ser Glu Tyr Leu Glu Ile Glu
 145 150 155 160

Ile Asp Ser His Gln Tyr Pro Tyr Ile Ile Glu Asn Lys Arg Leu Thr
 165 170 175

Phe Val Gly Glu Gly Trp Lys Ser Ser Leu Trp Ala Ile Met Gln Phe
 180 185 190

Asp Pro Asp Thr His Leu Val Leu Pro Asn Thr Gly Asp Asn Leu Gly
 195 200 205

Trp Arg Ser Tyr Asp Ala Thr Glu Ile Asn Pro Gly Leu Ile Arg Leu
 210 215 220

Ser Asp Pro Lys Lys Glu Ala Asp Lys Phe Phe Pro Ala Pro Gly Thr
 225 230 235 240

Val Leu Val Leu Arg His Ser Thr Arg Asp His Ala Gly Ile Phe Ile
 245 250 255

Tyr His Ser Met Asp Thr Lys Leu Glu Asn Val Lys Leu Phe His Thr
 260 265 270

Cys Gly Leu Gly Ile Leu Ser Gln Tyr Ser Lys Asn Ile Ser Phe Asn
 275 280 285

Asp Val His Ile Ile Pro Asn Thr Ser Lys Lys Arg Val Leu Ser Gly
 290 295 300

His Asp Asp Gly Phe His Phe Met Gly Cys Ser Gly Leu Leu Lys Ile
 305 310 315 320

Glu Asn Cys Ser Trp Ala Gly Leu Met Asp Asp Pro Ile Asn Ile His
 325 330 335

Gly Thr Cys Ser Arg Ile Met Glu Val Leu Ser Pro Thr Arg Ile Lys
 340 345 350

Cys Lys Phe Met Gln Asp Met Ser Glu Gly Met Glu Trp Gly Arg Pro
 355 360 365

Asp Glu Thr Ile Gly Phe Ile Glu His Lys Thr Met Arg Thr Val Ala
 370 375 380

Thr Gly Lys Met Asn Lys Phe Glu Ala Leu Asn Lys Ala Glu Phe Ile
 385 390 395 400

ES 2 386 413 T3

Ile Glu Leu Ser Val Pro Leu Pro Ala Gly Val Glu Ala Gly Tyr Val
 405 410 415

Ile Glu Asn Leu Thr Cys Thr Pro Asp Ala Glu Ile Arg Asn Cys His
 420 425 430

Phe Gly Ser Cys Arg Ala Arg Gly Leu Leu Val Ser Thr Pro Gly Lys
 435 440 445

Val Ile Ile Glu Asn Asn Val Phe Glu Ser Ser Gly Ser Ala Ile Leu
 450 455 460

Ile Ala Gly Asp Ala Asn Ala Trp Tyr Glu Ser Gly Ala Val Lys Asp
 465 470 475 480

Val Leu Ile Arg Asn Asn Asp Phe Arg Tyr Pro Cys Asn Ser Ser Ile
 485 490 495

Tyr Gln Phe Cys Glu Ala Val Ile Ser Ile Asp Pro Glu Ile Pro Thr
 500 505 510

Pro Glu Gln Lys Tyr Pro Tyr His Arg Asn Ile Arg Ile Met Asp Asn
 515 520 525

Thr Phe His Leu Phe Asp Tyr Pro Ile Leu Phe Ala Arg Ser Val Asn
 530 535 540

Gly Leu Thr Phe Ser Ser Asn Thr Leu Ile Arg Asp Thr Thr Tyr Gln
 545 550 555 560

Pro Tyr His Tyr Arg Lys Glu Gly Ile Thr Leu Glu Ala Cys Lys Ser
 565 570 575

Val Val Ile Ser Asn Asn Lys Ile Glu Gly Asp Val Leu Gly Arg Ile
 580 585 590

Val Thr Ile Glu Lys Met Lys Pro Ser Asp Val Lys Ile Ser Lys Asn
 595 600 605

Pro Phe Phe Lys Leu Lys Lys
 610 615

<210> 9

5

<211> 665

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
 <223> Phe, Val, Tyr o Ile

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Phe, His, Leu o Ser

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Gly, Gln, Leu, Ala o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> Ala, Phe o Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Leu, Gln, Phe, Ser o Ala

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Gly, Ala, Ser o Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> Thr, Ala, Ser o Cys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Ser, His, Asp o Val

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Pro or Asn

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Arg, Ala, Cys o Ile

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Val, Asp, Arg o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (48)..(48)
 <223> Ala or Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (51)..(51)
 <223> Thr, Tyr, Asn o Asp

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (53)..(53)
 <223> Arg, Tyr o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (59)..(59)
 <223> Ala, Ile, Gln, Val o Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (60)..(60)
 <223> Val, Ala o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (73)..(73)
 <223> Val, Lys, Arg, Asp o Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (75)..(75)
 <223> Arg, Gly, Glu o Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (76)..(76)
 <223> Pro, Ala, Lys o Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (78)..(78)
 <223> Arg, Thr, Val o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (80)..(80)
 <223> Val, Lys, Ser o Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (83)..(83)
 <223> Lys, Glu, Pro o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (91)..(91)
 <223> Glu, Ala o Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (95)..(95)
 <223> Thr, Gln, Arg, Val o Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (96)..(96)
 <223> Arg, Val o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (104)..(104)
 <223> Thr, Ser, Asp o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (108)..(108)
 <223> Asp o Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (119)..(119)

<223> Tyr, Leu, Met o Ala
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (123)..(123)
 <223> Met, Leu o Ile
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (134)..(134)
 <223> Lys, Thr o Glu
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (137)..(137)
 <223> His, Met, Tyr o Phe
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (147)..(147)
 <223> Ile, Asp, Glu o Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (148)..(148)
 <223> Arg, Lys o His
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (151)..(151)
 <223> Asp, Gly o Asn
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (163)..(163)
 <223> Ala, His, Arg, Gln o Ile
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (165)..(165)
 <223> Glu, Thr, Ala, His o Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (166)..(166)
 <223> Val, Gln, Gly, Ile o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (168)..(168)
 <223> Asp, Glu o Gln
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (172)..(172)
 <223> Ala, Leu, Arg, Val o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (174)..(174)
 <223> Thr, Glu, Val, Asn o Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (178)..(178)
 <223> Asp o Thr
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (181)..(181)
 <223> Ala, Asp, Glu, Lys o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (182)..(182)
 <223> Tyr o Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (183)..(183)
 <223> Arg, Leu, Thr o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (187)..(187)
 <223> Ile, Val, Leu o Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (190)..(190)
 <223> Gly, Thr, Asp, Trp o His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (191)..(191)
 <223> Ser, Thr, Val o Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (192)..(192)
 <223> Pro, Gln, Arg, Asp o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (197)..(197)
 <223> Gly, Asp, Asn, Lys o Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (198)..(198)
 <223> Thr, Ala, Gly, Asp o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (200)..(200)
 <223> His, Gln, Lys, Val o Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (203)..(203)
 <223> Trp, Leu, Gly o Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (204)..(204)
 <223> Leu, Tyr o Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (209)..(209)
 <223> Pro, Arg, Val o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (211)..(211)
 <223> Thr, Asn, Arg o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (214)..(214)
 <223> Pro, Asn, Ser o Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (215)..(215)
 <223> Tyr, His, Trp o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (216)..(216)
 <223> Trp, Cys, Gly o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (218)..(218)
 <223> Gly, Phe, Glu, Ala o Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (221)..(221)
 <223> Gly o Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (224)..(224)
 <223> Tyr, Ile, Glu, Lys o His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (225)..(225)
 <223> Thr, Ala, Ser, His o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (227)..(227)
 <223> Ile, Ser, Thr, Val o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (233)..(233)
 <223> Gln, Glu o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (234)..(234)
 <223> Arg, Met, Asn, Ile o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (238)..(238)
 <223> Gly, Ser, Ala o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (239)..(239)
 <223> Asp, Trp, Ser, Lys o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (242)..(242)
 <223> Leu, Met, Arg, Phe o Thr

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (251)..(251)
 <223> Asp, Glu, Phe, Ile o Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (252)..(252)
 <223> Leu, Asn, Cys o Ser

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (253)..(253)
 <223> Gly, Arg, Thr, Ser o Asp

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (260)..(260)
 <223> Asp, Gln, Glu, Arg o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (262)..(262)
 <223> Thr, Lys, Met, Val o Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (268)..(268)
 <223> Ala o Val

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (269) .(269)
 <223> Asp o Gly

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (270)..(270)
 <223> Ala o Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (271)..(271)
 <223> Gly o His

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (275)..(275)
 <223> Gln, Thr, Ala o Val

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (280)..(280)
 <223> Glu, Phe, Ile, Gly o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (283)..(283)
 <223> Glu, Gln, Thr o His

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (284)..(284)
 <223> Pro, Val o Ala

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (289)..(289)
 <223> Trp, Asn, Leu, Ser o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (290)..(290)
 <223> Glu, Arg o His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (294)..(294)
 <223> Val, Ile o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (297)..(297)
 <223> Arg, Glu, Ser o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (298)..(298)
 <223> Ser, Asn, Arg o Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (301)..(301)
 <223> Ala, Phe, Met, Val o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (304)..(304)
 <223> Leu, Met, Ala o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (305)..(305)
 <223> Gln, Gly, His, Glu o Cys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (319)..(319)
 <223> Ile, Val, Met, Leu o Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (323)..(323)
 <223> Asn, Lys, Gly o His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (324)..(324)
 <223> Phe, Cys, Val o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (330)..(330)
 <223> Arg, Gly, Asp, Asn o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (334)..(334)
 <223> Ser, Thr, Leu, Tyr o Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (337)..(337)
 <223> Ser, Gly, Ala o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (338)..(338)

<223> Phe, Ser, Gln o His
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (341)..(341)
 <223> Phe, Met, Ala o Gly

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (342)..(342)
 <223> Val, Ile, Met, Thr o Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (351)..(351)
 <223> Val, Ile o Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (352)..(352)
 <223> Ser, Asp, Ile, Val o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (379)..(379)
 <223> Pro, Leu, Ile o Val

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (382)..(382)
 <223> Ser, Asn, Gln, His o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (394)..(394)
 <223> Ala, Phe, Tyr, Trp o Glu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (398)..(398)
 <223> Gln, Ala o Trp

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (400)..(400)
 <223> Ala, Phe o Arg

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (404)..(404)
 <223> Glu, Asp o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (406)..(406)
 <223> Glu, Ala, Gln o Gly

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (411)..(411)
 <223> Arg, Ala, Glu o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (415)..(415)
 <223> Pro, Val, Arg, Leu o Thr

 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (416)..(416)
 <223> Leu, Val, Phe o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (424)..(424)
 <223> Thr, Ala o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (425)..(425)
 <223> Ala, Lys, Val, Ile o Met

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (428)..(428)
 <223> Gly o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (433)..(433)
 <223> Asp, Glu, Val, Gly o Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (435)..(435)
 <223> Thr, Arg, Ile o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (436)..(436)
 <223> Lys, Leu, Ile, Arg o Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (438)..(438)
 <223> Leu, Ser, Asp, Ala o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (443)..(443)
 <223> Val, Glu o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (448)..(448)
 <223> Pro, Asp o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (453)..(453)
 <223> Gly, Ser, Ile o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (454)..(454)
 <223> Val, Leu, Asn o Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (456)..(456)
 <223> Thr, Leu, Lys o Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (457)..(457)
 <223> Gly, Lys, Asn, Ser o Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (459)..(459)
<223> Thr, Leu, Asp, Phe o Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (466)..(466)
<223> Ala, Trp o Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (479)..(479)
<223> Asn, Arg o Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (480)..(480)
<223> Val, Thr, Asn o Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (491)..(491)
<223> Lys, Arg o Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (501)..(501)
<223> Asp, Tyr o Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (502)..(502)
<223> Gly, Lys o His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (511)..(511)
<223> Ser, Ala, Glu o Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (512)..(512)
<223> Ala, Asp o Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (538)..(538)
<223> Cys, Leu o Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (539)..(539)
<223> Ala, Thr o Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (540)..(540)
<223> Tyr, Asn o Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (541)..(541)
<223> Asn, Met o Ile

<220>
<221> MOD_RES

<222> (542)..(542)
 <223> Gly, Phe o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (544)..(544)
 <223> Pro, Cys o Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (546)..(546)
 <223> Gly, Glu, His o Asn

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (552)..(552)
 <223> Glu, Asp, His o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (557)..(557)
 <223> Val, Glu, Ile, Asn o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (559)..(559)
 <223> Asp, Lys o Glu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (560)..(560)
 <223> Pro, Gly, Ala, Asp o Gln

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (561)..(561)
 <223> Ala, Glu, Gln o Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (562)..(562)
 <223> Thr, Val, Arg, Gln o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (564)..(564)
 <223> Tyr, Lys o Val

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (581)..(581)
 <223> Asp, Arg o His

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (587)..(587)
 <223> Val, Ala o Ile

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (597)..(597)
 <223> Ala, Met, Leu, Ile o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (604)..(604)
 <223> Arg, Tyr, Val, Lys o Ile

ES 2 386 413 T3

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (606)..(606)
<223> Leu, Thr, Asn o Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (614)..(614)
<223> Tyr, Gly o Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (618)..(618)
<223> Leu, Phe, Val, Arg o Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (620)..(620)
<223> Val, Gln, Tyr, Leu o Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (626)..(626)
<223> Gly, Glu, Lys, Asn o Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (639)..(639)
<223> Asn, Leu o Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (643)..(643)
<223> Val o Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (644)..(644)
<223> Thr o Lys

<400> 9
Met Ala His Gly Cys Ser Gly Gly Ala Met Lys Thr Xaa Leu Xaa Ile
1          5          10          15

Xaa Leu Ala Leu Xaa Leu Xaa Leu Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Ala Ala
20          25          30

Ala Val Xaa Ala Gln Glu Xaa Val Val Asp Val Ser Asp Phe Gly Xaa
35          40          45

Lys Pro Xaa Ser Xaa Lys Asn Ala Val Pro Xaa Xaa Gln Ala Ala Ile
50          55          60

Asp Lys Ile Lys Ala Glu Cys Lys Xaa Gly Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
65          70          75          80

Phe Pro Xaa Gly Arg Tyr Asp Phe Trp Pro Xaa Gly Ala Thr Xaa Xaa
85          90          95

Glu Tyr Tyr Ile Ser Asn Thr Xaa Thr Glu Gln Xaa Cys Pro Asp Asn
100         105         110

```

ES 2 386 413 T3

Pro Lys Lys Val Gly Leu Xaa Leu Glu Asp Xaa Lys Asp Leu Thr Ile
 115 120 125
 Asp Gly Asn Gly Ser Xaa Leu Val Xaa His Gly Arg Met Thr Pro Phe
 130 135 140
 Ala Leu Xaa Xaa Cys Glu Xaa Val Val Leu Lys Asn Phe Ser Ile Asp
 145 150 155 160
 Phe Glu Xaa Pro Xaa Xaa Ala Xaa Val Gln Val Xaa Glu Xaa Gly Val
 165 170 175
 Thr Xaa Gly Glu Xaa Xaa Xaa Glu Val Glu Xaa His Pro Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Tyr Arg Ile Val Xaa Xaa Ser Xaa Ile Glu Xaa Xaa Gly Glu Gly Trp
 195 200 205
 Xaa Ser Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Phe Asp Xaa Asp Thr Xaa
 210 215 220
 Xaa Val Xaa Tyr Asn Thr Gly Asp Xaa Xaa Thr Trp Arg Xaa Xaa Asp
 225 230 235 240
 Ala Xaa Glu Ile Ala Pro Gly Ile Val Arg Xaa Xaa Xaa Pro Lys Trp
 245 250 255
 Lys Asp Ala Xaa Phe Xaa Pro Lys Ala Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 260 265 270
 Val Leu Xaa Met Arg Asp Ile Xaa Arg Asp Xaa Xaa Gly Ile Phe Ile
 275 280 285
 Xaa Xaa Ser Lys Asn Xaa Thr Leu Xaa Xaa Val Lys Xaa His Tyr Xaa
 290 295 300
 Xaa Gly Leu Gly Ile Val Ser Gln Tyr Ser Glu Asn Ile Thr Xaa Asp
 305 310 315 320
 Arg Val Xaa Xaa Ala Pro Arg Gly Pro Xaa Ser Gly Arg Xaa Leu Ala
 325 330 335
 Xaa Xaa Ala Asp Xaa Xaa His Phe Ser Gly Cys Lys Gly Lys Xaa Xaa
 340 345 350
 Ile Lys Asn Cys Leu Phe Ala Gly Ala Met Asp Asp Pro Ile Asn Val
 355 360 365
 His Gly Thr Tyr Leu Arg Val Ile Glu Lys Xaa Asp Asp Xaa Thr Leu
 370 375 380

ES 2 386 413 T3

Lys Leu Arg Phe Met His Asp Gln Ser Xaa Gly Phe Glu Xaa Gly Xaa
 385 390 395 400
 Pro Gly Asp Xaa Val Xaa Phe Val Arg Ser Xaa Thr Met Glu Xaa Xaa
 405 410 415
 Ala Lys Ala Asn Gln Ile Thr Xaa Xaa Arg Pro Xaa Pro Tyr Asp Lys
 420 425 430 435
 Xaa Glu Xaa Xaa Ser Xaa Arg Glu Phe Ser Xaa Thr Phe Asp Arg Xaa
 435 440 445
 Ile Pro Pro Ala Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Gly Xaa Val Ile Glu Asn Leu
 450 455 460
 Thr Xaa Thr Pro Glu Val Glu Ile Arg Asn Asn Tyr Phe Arg Xaa Xaa
 465 470 475 480
 Arg Thr Arg Gly Thr Leu Val Thr Thr Pro Xaa Lys Val Val Ile Glu
 485 490 495
 Asn Asn Thr Phe Xaa Xaa Thr Ser Met Ser Ala Ile Leu Ile Xaa Xaa
 500 505 510
 Asp Ala Asn Gly Trp Tyr Glu Ser Gly Pro Val Lys Asp Val Thr Ile
 515 520 525
 Arg Gly Asn Thr Phe Ile Asn Pro Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa
 530 535 540
 Gly Xaa Ala Val Ile Ser Ile Xaa Pro Glu Asn Pro Xaa Ile Xaa Xaa
 545 550 555 560
 Xaa Xaa Pro Xaa His His Asn Gly Lys Asp Gly Gly Ile Arg Ile Glu
 565 570 575
 Asp Asn Thr Phe Xaa Thr Phe Asp Tyr Pro Xaa Leu Tyr Ala Lys Ser
 580 585 590
 Val Asp Gly Leu Xaa Phe Arg Asn Asn Thr Ile Xaa Arg Xaa Thr Thr
 595 600 605
 Phe Lys Pro Phe His Xaa Asn Lys Asp Xaa Phe Xaa Leu Glu Gly Cys
 610 615 620
 Lys Xaa Val Val Ile Ser Glu Asn Val Phe Glu Gly Glu Thr Xaa Arg
 625 630 635 640
 Gln Ser Xaa Xaa Thr Glu Asn Met Lys Arg Lys Asp Leu Lys Thr Thr
 645 650 655
 Ile Lys Pro Phe Phe Lys Leu Lys Lys
 660 665

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Pro o Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Val o Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Val o Ile

<400> 10

Asp Asp Xaa Xaa Asn Xaa His Gly Thr

1 5

<210> 11

15 <211> 21

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(4)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Tyr o Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ser o Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(12)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Leu o Val

ES 2 386 413 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Leu o Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Lys o Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 11
Asp Xaa Xaa Xaa Trp xaa Glu xaa Gly xaa xaa xaa Asp xaa xaa Ile
1 5 10 15

Xaa Xaa Asn Xaa Phe
20

<210> 12

5 <211> 30

<212> PRT

<213> *Streptomyces avermitilis*

10

<400> 12

Thr val Ile Asp val Thr Asp Phe Gly Ala Asp Pro Ser Gly Lys Ala
1 5 10 15

Asp Ser Ala Ala Ala val Ser Ala Ala Met Ala His Ala Lys
20 25 30

15 <210> 13

<211> 34

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 13

gcgaattccc atggctcacg gatgctccgg aggg

34

30

<210> 14

<211> 39

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 5 <400> 14
 gcctcgagaa gcttctagtc cgtgaccacg gaggtgttc 39
 10 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Inosina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Inosina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Inosina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Inosina
 <400> 15
 ttcggngtng tnkgkcagtw cagngagaa 29
 25 <210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (18)..(18)
 <223> Inosina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223>

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Inosina

<400> 16
 gtnccntgna tnttnatngg ntcntcgtg

29

5 <210> 17

<211> 27

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 17

atcgactcgg tcaccttcaa ggccgac

27

20

<210> 18

<211> 28

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

ES 2 386 413 T3

	<code><400> 18</code>			
		<code>aagacgctgt tggatgatgcg tacggtgc</code>		28
5		<code><210> 19</code>		
		<code><211> 50</code>		
10		<code><212> ADN</code>		
		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
15		<code><223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</code>		
		<code><400> 19</code>		
20		<code>gcgctcgaaa ttaaccctca ctaaagggga attcgggtacc ctcgaggcgc</code>		50
		<code><210> 20</code>		
		<code><211> 23</code>		
25		<code><212> ADN</code>		
		<code><213> Secuencia artificial</code>		
30		<code><220></code>		
		<code><223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</code>		
		<code><400> 20</code>		
35		<code>ctcgagggta ccgaattccg gaa</code>		23
		<code><210> 21</code>		
40		<code><211> 31</code>		
		<code><212> ADN</code>		
		<code><213> Secuencia artificial</code>		
45		<code><220></code>		
		<code><223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</code>		
50		<code><400> 21</code>		
		<code>gatcgcgcct cgagggtacc gaattccgga a</code>		31
		<code><210> 22</code>		
55		<code><211> 24</code>		
		<code><212> ADN</code>		
60		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
		<code><223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</code>		
65				

<400> 22
 cgcttcggcg tccgttcggg ccag 24
 5 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 23

 ccggtgcacc gcaacgtcct catc 24
 20 <210> 24
 <211> 46
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 24
 35 gcgggatccc gggatgggac gtgtttatga catttcccag tttggc 46
 <210> 25
 <211> 44
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 25
 50 gcctcgagaa gctttcactc tgaaatcttc acgtttgtca ctcg 44
 <210> 26
 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 65 <400> 26

catggatccc aggcctccgg atg 23

5 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 27
 gatccatccg gaggcctggg atc 23

20 <210> 28
 <211> 727
 <212> PRT

25 <213> *Streptomyces griseoplanus*
 <400> 28

Met Gly Thr Ala Thr Ala Gln Pro Ala Leu Arg Pro Gln Thr Ser Thr
 1 5 10 15

Val Ile Gly Gly Leu His Gly Ala Ala Val Leu Asp Asn Thr Gly Arg
 20 25 30

Thr Val Ile Asp Val Thr Asp Phe Gly Ala Asp Pro Ser Gly Lys Ala
 35 40 45

Asp Ser Ala Ala Ala Val Ser Ala Ala Met Ala His Ala Lys Thr Val
 50 55 60

Gly Gly Pro Thr Thr Leu His Phe Pro Thr Gly Thr Tyr His Ile Trp
 65 70 75 80

Pro Glu Arg Thr Pro Lys Arg Glu Leu Tyr Val Ser Asn Thr Val Gly
 85 90 95

Ser Asp Gln Ala Phe Arg Thr Lys Asn Ile Gly Ile Leu Val Glu Asp
 100 105 110

Met Arg Asp Val Val Val Asp Gly Gly Gly Ser Arg Ile Val Asn His
 115 120 125

Gly Phe Gln Thr Val Phe Ala Ala Ile Arg Ser Ser Asp Val Arg Phe
 130 135 140

Thr Asn Phe Ser Gln Thr Trp Val Ala Pro Lys Thr Val Asp Ile Thr
 145 150 155 160

Val Ala Asp Ala Gly Val Val Ser Gly Gln Ala Tyr Arg Ile Ile Asp
 165 170 175

30

ES 2 386 413 T3

Ile Pro Glu Thr Tyr Asp Tyr Ala Val Glu Gly Thr Ser Val Arg Trp
180 185 190

Asn Gly Glu Arg Gly Pro Ala Thr Gly Gln Pro Tyr Trp Thr Gly Thr
195 200 205

Asn Ser Phe Asp Tyr Ser Gln Val His Asp Pro Ala Thr Asn Arg Thr
210 215 220

Trp Arg Thr Ser Asn Pro Val Phe Pro Glu Arg His Glu Asp His Arg
225 230 235 240

Pro Arg Arg Arg Gln Val Arg Ile Thr Tyr Gly Asp Ser Thr Ala Pro
245 250 255

Gly Asp Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Met Arg Glu Val Thr Arg Asp Thr
260 265 270

Pro Gly Ala Leu Phe Trp Glu Ser Ser Arg Val Thr Val Asp His Leu
275 280 285

Arg Leu Gly Tyr Leu His Gly Phe Gly Ile Val Gly Gln Leu Ser Glu
290 295 300

Asp Ile Gly Ile Asp Ser Val Thr Phe Lys Ala Asp Arg Gly Ser Gly
305 310 315 320

Arg Val Thr Ser Gly Phe Ala Asp His Ile Gln Met Ser Gly Val Lys
325 330 335

Gly Thr Val Arg Ile Thr Asn Ser Val Phe Asp Asn Pro Gln Asp Asp
340 345 350

Pro Ile Asn Ile His Gly Thr Tyr Leu Gln Ala Thr Ala Ala Glu Arg
355 360 365

Glu Thr Leu Gln Leu Arg Tyr Met His Asn Glu Thr Ser Gly Phe Pro
370 375 380

Gln Phe Tyr Pro Gly Asp Thr Ile Glu Leu Val Asp Lys Arg Thr Met
385 390 395 400

Leu Ala Ala Pro Gly Ala Thr Ala Lys Val Val Ser Val Thr Gly Pro
405 410 415

Thr Gly Ser Gly Val Pro Ala Gly Thr Asp Pro Asp Thr Tyr Leu Arg
420 425 430

Thr Met Thr Val Val Leu Asp Arg Thr Leu Pro Ala Ala Val Leu Ala
435 440 445

ES 2 386 413 T3

Ala Pro Gly Asp Tyr Val Ala Glu Asn Thr Thr Tyr Thr Pro Thr Val
 450 455 460

Glu Ile Thr Gly Asn Thr Phe Gln Ala Val Pro Thr Arg Gly Ile Leu
 465 470 475 480

Val Thr Thr Arg Arg Pro Val Arg Ile Glu Asn Asn Arg Phe Asp Gly
 485 490 495

Met Ser Met Ala Ser Ile Tyr Ile Ser Ser Asp Ala Arg Ser Trp Tyr
 500 505 510

Glu Ser Gly Pro Val Arg Asn Val Thr Ile Arg Gly Asn Val Phe Asp
 515 520 525

Arg Pro Ala Ser Pro Val Ile Phe Phe Asp Pro Thr Asn Gln Asp Phe
 530 535 540

Val Ala Gly Gln Pro Val His Arg Asn Val Leu Ile Glu Asp Asn Asp
 545 550 555 560

Phe Asn Leu Thr Gly Gly Thr Ile Leu Ser Gly Arg Gly Val Gly Gly
 565 570 575

Leu Thr Phe Arg Asp Asn Arg Val Glu Arg Tyr Pro His Leu Arg Leu
 580 585 590

Thr Gly Pro Ser Arg Ala Leu Arg Val Gly Asp Thr Thr Thr Val Thr
 595 600 605

Thr Asp Ala Pro Pro Pro Ser His Thr Ser Pro Leu Phe Thr Phe Asp
 610 615 620

Gly Ala Asp Asp Ile Thr Leu Ala Asn Asn Thr Tyr Gly Asn Gly Phe
 625 630 635 640

Asn Lys Arg Val Asn Thr Ala Asn Met Asp Val Ser Glu Ile Thr Val
 645 650 655

Thr Ala Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Asp Ser Ile Ser Ser Ala Pro
 660 665 670

Val Ala Val Ser Tyr Ser Ser Ser Arg Pro Lys Val Ala Thr Val Asp
 675 680 685

Ser Glu Gly Val Val Lys Ala Leu Ser Gly Gly Thr Thr Ser Ile Thr
 690 695 700

Ala Arg Ala Thr Ile Gly Gly Val Arg Val Thr Ser Asn Pro Val Lys
 705 710 715 720

Val Val Val Ala Thr Glu Arg
 725

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Etiqueta de 6xHis sintética

<400> 29

His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un tejido para xenotrasplante, que comprende las etapas de:

- 5 (i) incubar el tejido con una enzima que tiene actividad α -galactosidasa, escindiendo de ese modo los residuos de galactosa terminales unidos en α 1-3 inmunodominantes del tejido, y
 (ii) aislar el tejido de la enzima y los residuos de galactosa inmunodominantes escindidos enzimáticamente,

10 haciendo por ello que el tejido sea adecuado para xenotrasplante;

en el que la enzima comprende al menos 10 aminoácidos en la siguiente secuencia numerada consiguientemente cuando se alinea con SEQ ID NO:2:

15 M en el residuo 10; G en el residuo 47; G en el residuo 84; Y en el residuo 86;

Y en el residuo 99; N en el residuo 102; K en el residuo 114; T en el residuo 127;

20 G en el residuo 130; G en el residuo 132; G en el residuo 139; N en el residuo 156;

D en el residuo 160; P en el residuo 164; G en el residuo 205; R en el residuo 277;

R en el residuo 281; F en el residuo 287; G en el residuo 308; Q en el residuo 312;

25 I en el residuo 317; R en el residuo 333; D en el residuo 340; G en el residuo 346;

G en el residuo 349; G en el residuo 360; D en el residuo 363; D en el residuo 364;

30 N en el residuo 367; H en el residuo 369; G en el residuo 370; T en el residuo 371;

G en el residuo 396; E en el residuo 462; N en el residuo 463; T en el residuo 465;

T en el residuo 467; P en el residuo 468; R en el residuo 483; G en el residuo 484;

35 L en el residuo 486; T en el residuo 489; N en el residuo 498; I en el residuo 508;

D en el residuo 513; W en el residuo 517; E en el residuo 519; G en el residuo 521;

D en el residuo 525; I en el residuo 528; N en el residuo 531; F en el residuo 533;

40 I en el residuo 549; P en el residuo 553; I en el residuo 573; A en el residuo 590;

G en el residuo 595; N en el residuo 601; e I en el residuo 629;

45 y en el que la enzima tiene una identidad de al menos el 20% con SEQ ID NO:2 cuando se alinea con SEQ ID NO:2, y en el que la enzima tiene actividad alfa-galactosidasa.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la enzima comprende nueve aminoácidos contiguos que tienen la secuencia DD(P/A)(V/I)N(V/I)HGT (SEQ ID NO:10).

50 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la enzima comprende veintiún aminoácidos contiguos que tienen la secuencia: DXXXW(Y/F)E(S/T)GXXXD(L/V)(L/T)I(K/R)XNXF (SEQ ID NO:11), en la que X puede ser cualquier aminoácido.

55 4. El método según la reivindicación 1-3, en el que la enzima comprende una secuencia especificada por SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, y en el que la enzima presenta actividad alfa galactosidasa con especificidad por sustratos ramificados, especificidad por sustratos lineales o ambas y un óptimo de pH neutro.

60 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el tejido es tejido conjuntivo.

6. El método según la reivindicación 5, en el que el tejido conjuntivo es un ligamento.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el tejido es un órgano.

65 8. El método según la reivindicación 7, en el que el órgano se selecciona del grupo que consiste en: hígado, riñón y

corazón.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el tejido es del grupo que consiste en:
5 colágeno inyectable no inmunogénico; xenoinjertos óseos; tejido blando y xenoinjertos de tejido blando reducido en proteoglicano; válvulas cardíacas de xenoinjerto; xenoinjertos de menisco; y matrices de tejido.

FIG. 1.

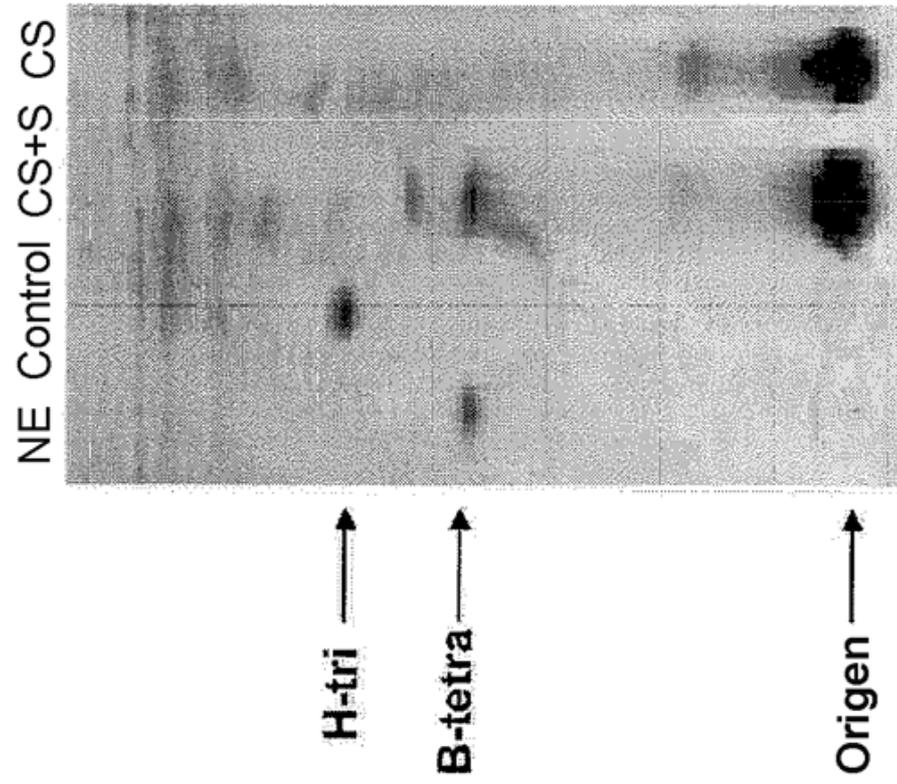


FIG. 2.

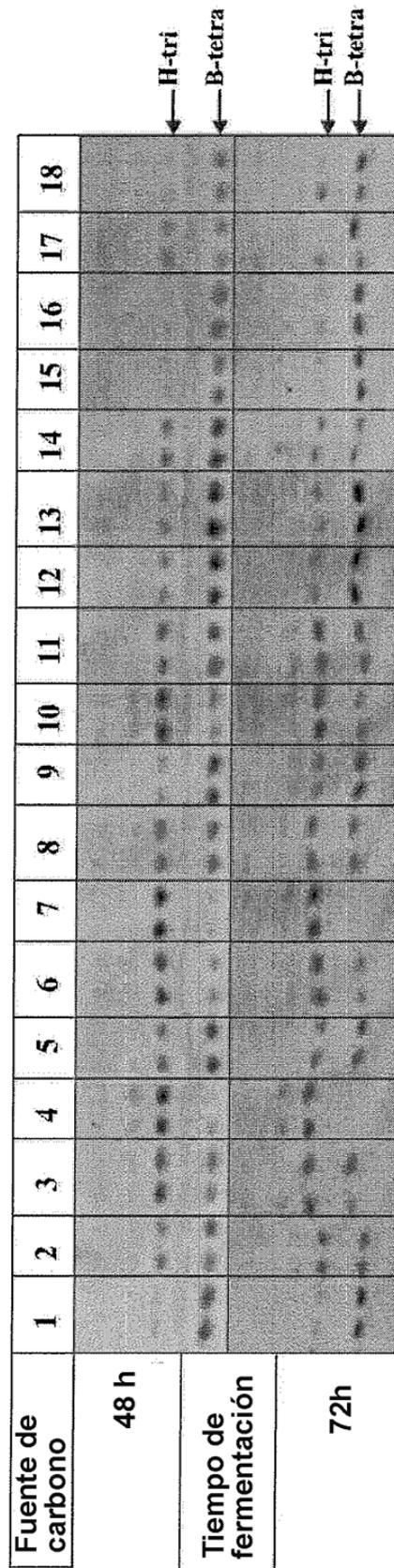


FIG. 3.

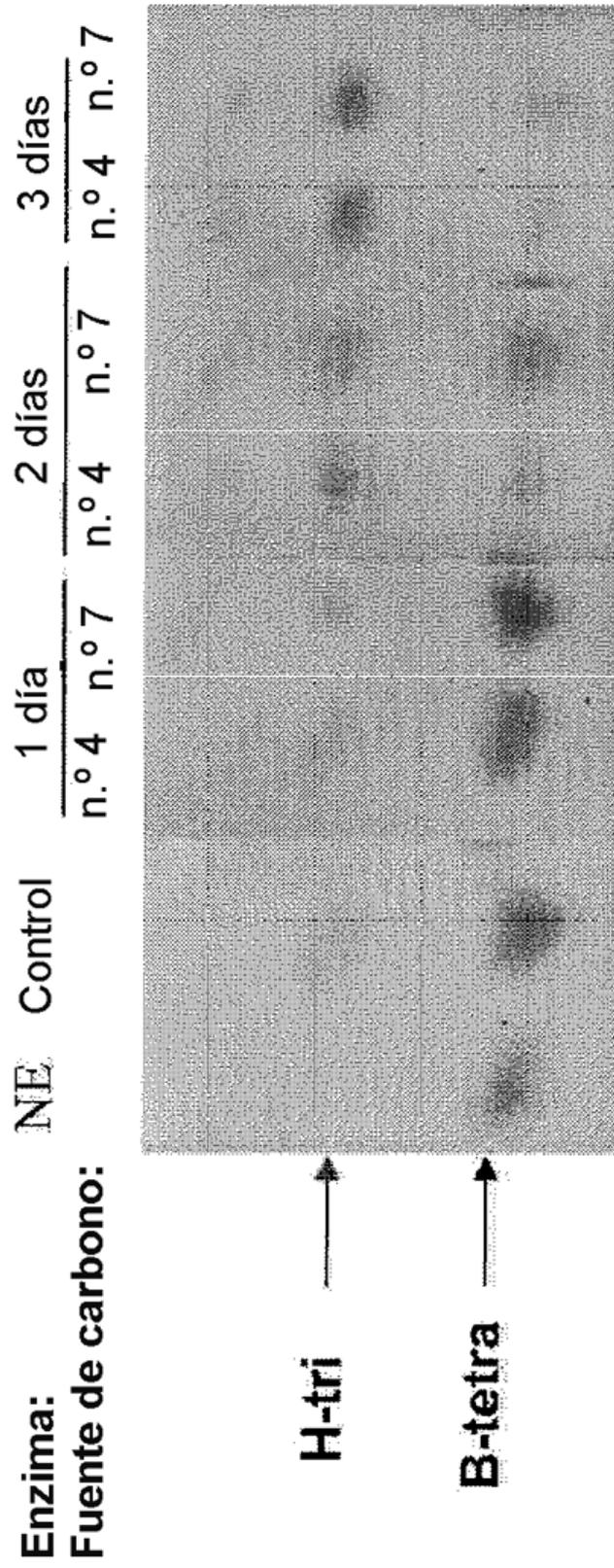


FIG. 5.

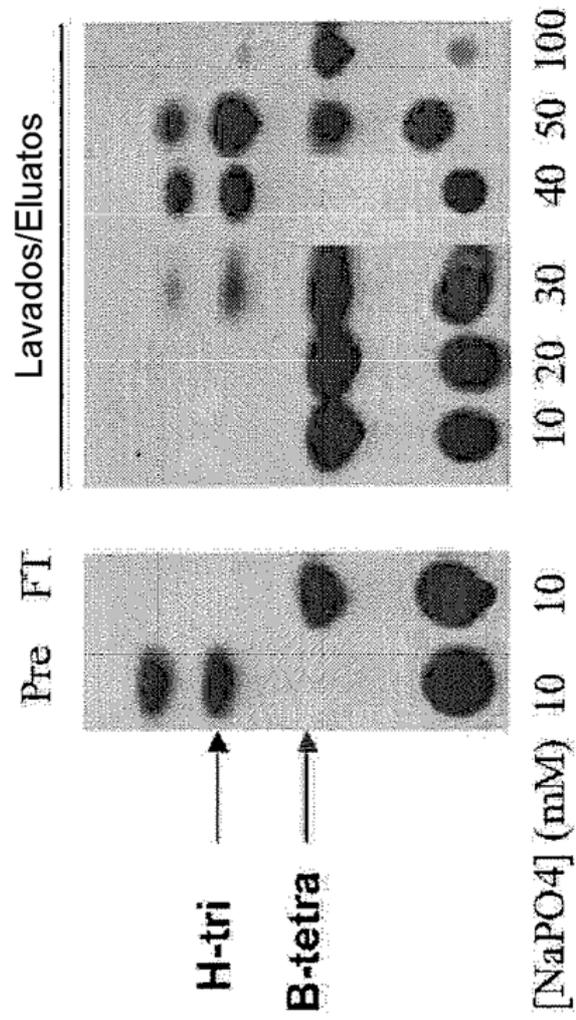


FIG. 6.

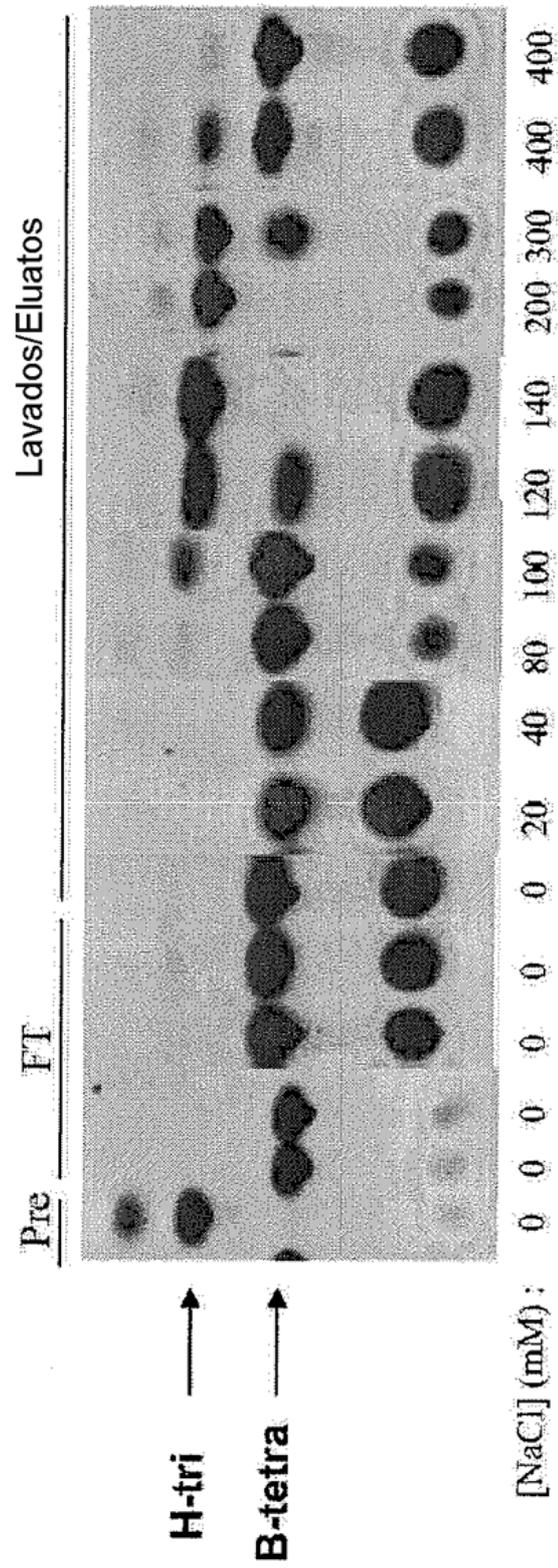
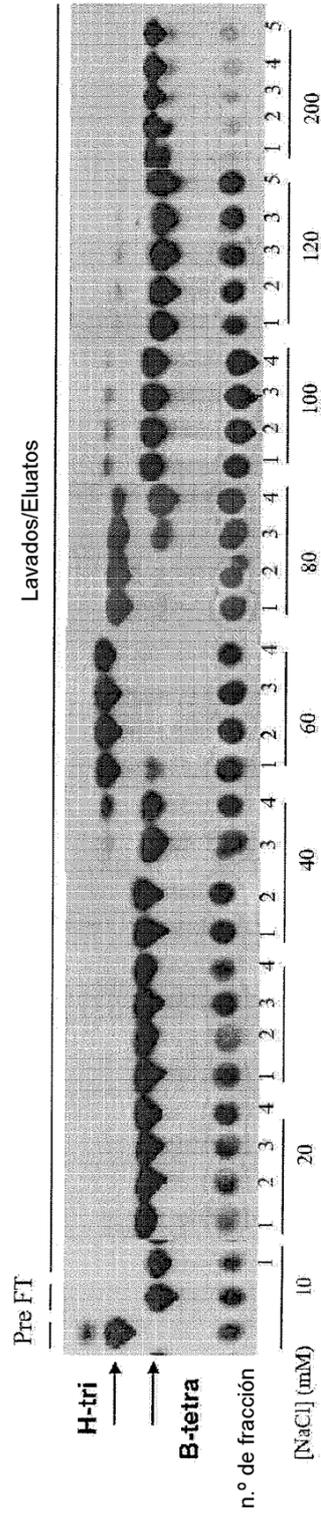
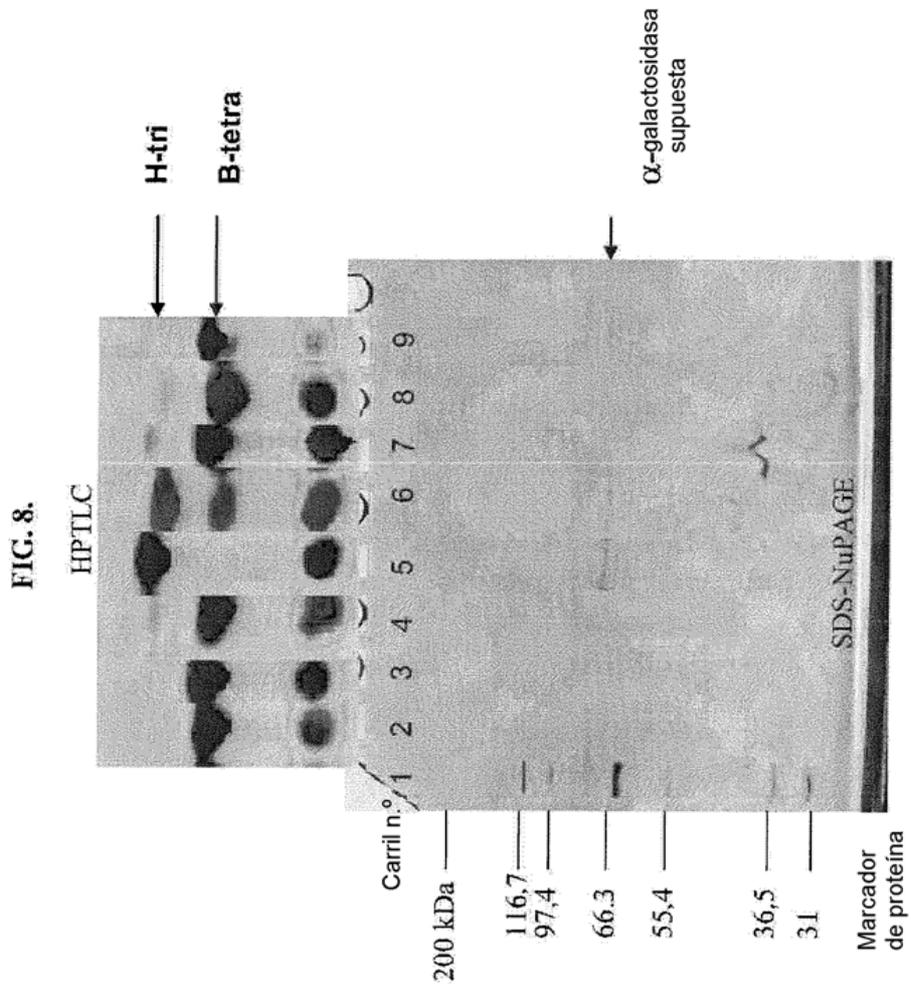


FIG. 7.





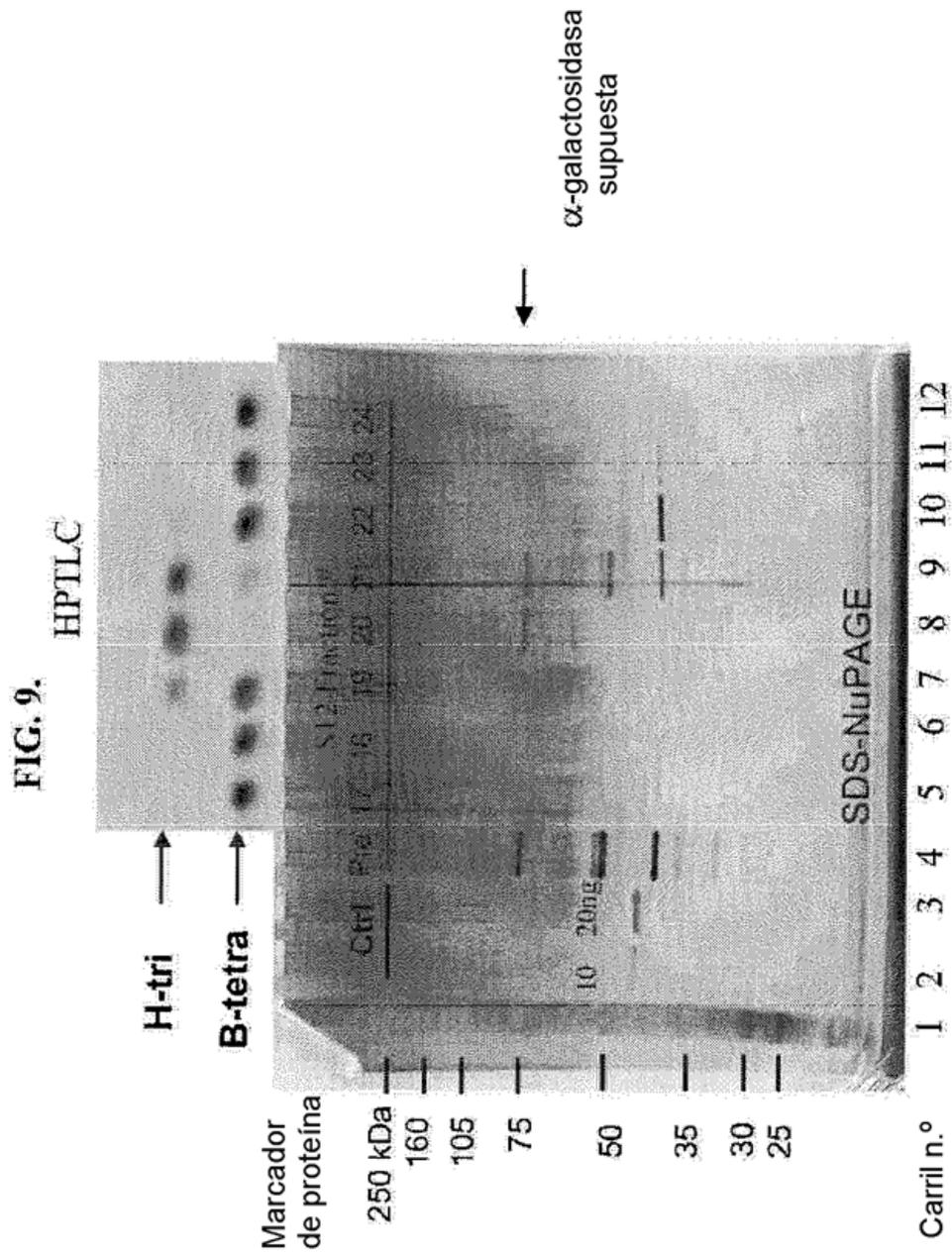


FIG.10.

1 MAHGCGGAM SREVELGVAL ALLGGATSPA AAAPRVTPY VDVADYGADP TGR~~EDS~~EPAY AAALHAKSV DRPVRIVFSK
 81 GTYQLYPERA ETRRELYMSNT VGADQRYRDK KIGLLVEDMH DVTVDDGGGAK LVHHGLQATF ASIRSTDVTF QNESEDYAAP
 161 EVIDATVATT GVTDGHAYRV LKTPAGSPYR VNGTHITWLG ETSPAIGOPY WSGVDGLOYT QIHDPEAORT WRGDNPLEND
 241 VAAVTDLIGR RIRIDYTTAA REPADAGLVYQ MRLLERTIEG AFIMESKNVT MRSMNAYYLO SFGVVGQFSE NISIDKVNFA
 321 PPRSGRSTA SFADFCQMSG VRGKVSITRS LEDGPHDDRI NIHGTYLEW GKPGPSTLTL AYKHPQTAGE POFAPGDEVE
 401 FATKRTMPL ADAHAQVTAV DGPSGMDHTK PLTMTMTED RVPAGVETG GTVVENITAT PSVVISGNVE RNVPTRGILY
 481 TTRKPVLLTG NREDCNSMAS IYVSADAYQW YESGRVADLE IRGNSEFRPS GPVIEVEPTN QVIDPATPVH HNISVEHNSF
 561 DIGDVTVVNA KSVGGEAETG NTVRRLLDQAD HPPYTSPLEV FHGSSGIRIA RNHYDKGLNT SVVID

FIG. 11.

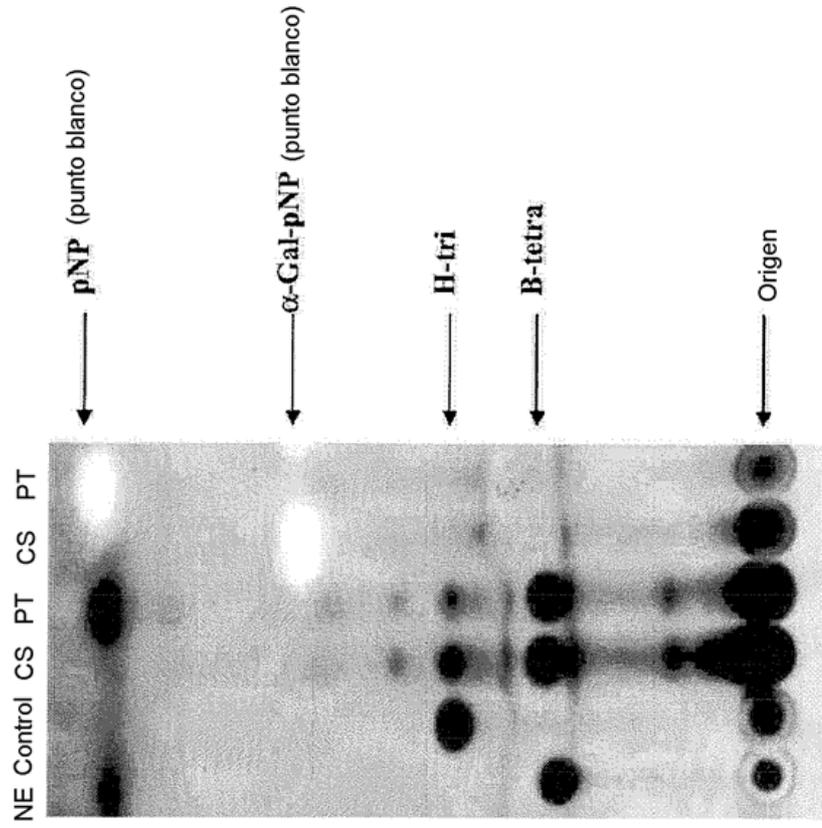


FIG.12.

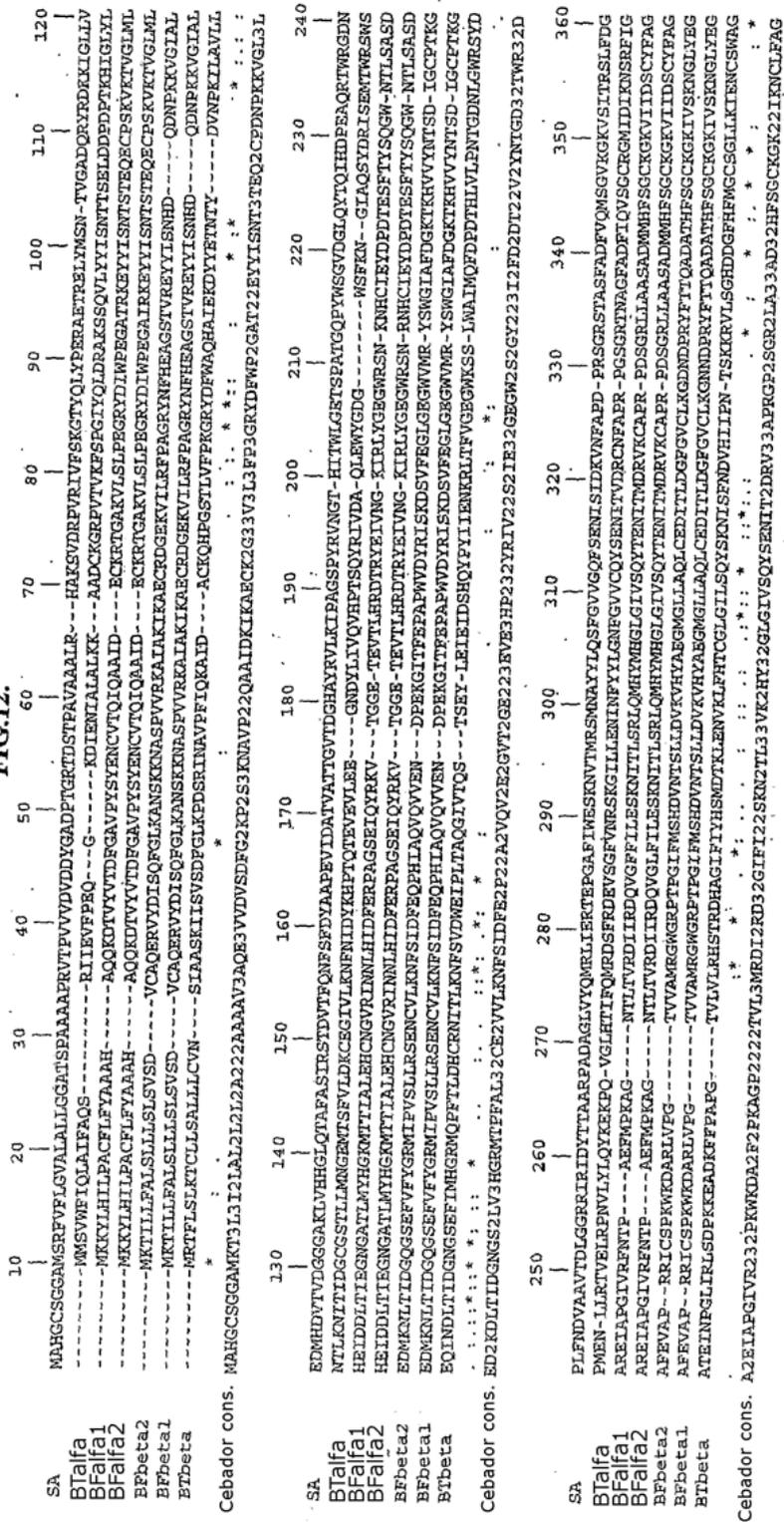


FIG.12. continuación

```

370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480
SA  PHDDPINIHGTYILEVVGKPGSEITLTKYKHPQTAFQFAPGQDEVEFAKRTMPTPIADAHQAQVAVDGFSGMDHTKPLTMTVTFDRPVE--AGVEITGGTVVENITATPSVVISGNNVFRNV
B1alfa AHDDP INIHGTHLRVIEFLSDNRLKRFMHQTFGEAFKGGDDLELVDSSLVAVGKCKREAKLVTREMLTSLSSPLSSEVMQQ-----KDLVLENTVTPVEVLITNNYFARV
B2alfa AQDDPVNVHGTNLRALAKIDAQTLKLRMHGQSYGFNAYFKGDTVAFTAAATMERFASA-----TVR-----DVRRLSDRIVEVRFDRDIP--TSLELNHDCVENMTCTPEVEIRNSYFTRT
B3beta AQDDPVNVHGTNLRALAKIDAQTLKLRMHGQSYGFNAYFKGDTVAFTAAATMERFASA-----TVR-----DVRRLSDRIVEVRFDRDIP--TSLELNHDCVENMTCTPEVEIRNSYFTRT
B4beta MDDDALNVHGTYLKVIKRVDHHTLIGRVMHDQSWGFWRGPDQVQFVRSWETMELIGKQNIITARP--YDKGEIRGAREFSITFKEADIPALNEKSGFLENLWTPEVLFAGNTIRNN
B5beta MDDDALNVHGTYLKVIKRVDHHTLIGRVMHDQSWGFWRGPDQVQFVRSWETMELIGKQNIITARP--YDKGEIRGAREFSITFKEADIPALNEKSGFLENLWTPEVLFAGNTIRNN
B6beta LAMDDPINIHGTCRSRIMEVLSPTRLKCKFMQDMSEGMWGRPDDETIETHEKTMRTVATG---KMN-----XFEALNKAFFIILELSVPLE--AGVEAGYVLENTCTPDAEIRNCHFGSC
**:*:*:**
Cebador cons. AMDDPINVHGTILRVIEK3DD2TLKLFMHMQS2GFE2G2PGD2V3FVRS3TME23AKANQIIT2R2P2PYDK2E32S2REFS2TFDR3IPPA22E22G2VIENLT2TPEVEIRNRYFR23

490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600
SA  PTRGILLVTRKPFVLTGNRFDMGSMASLYVSADAYOWYESGVPVADITIRGNSFTR-----PSGPIVLFVRETNQVIDPATFVPHN-----ISVEHNSFDIGDVTVWNAKSVGGFAFTG
B1alfa PTRGILLVTRKPSLLEGNTFYGMQMSGLFVADDGLSWYESGVPVADITIRGNSFTR-----PSGPIVLFVRETNQVIDPATFVPHN-----ISVEHNSFDIGDVTVWNAKSVGGFAFTG
B2alfa STRGTLVTPTRKVVVIEENNYKTKGMSALLIADAEAGWYEGSVPKDVLLKGNFTID--CAYNGGPGHAVLAIHPSNKIIDAERPVHQN-----TRIEDNTFRFTFDYVLYAKSTAGLLFRN
B3beta STRGTLVTPTRKVVVIEENNYKTKGMSALLIADAEAGWYEGSVPKDVLLKGNFTID--CAYNGGPGHAVLAIHPSNKIIDAERPVHQN-----TRIEDNTFRFTFDYVLYAKSTAGLLFRN
B4beta RARGTLESTPKTIVVEDNLFDHTSGTALLCGDCMGWETFACRVDVTRRNFIN--ALTNMFQFTNAVISIVPEIENLKDQKQYFHHGKGGVIEDNEFTDAPILYAKSVDGLIFRN
B5beta RARGTLESTPKTIVVEDNLFDHTSGTALLCGDCMGWETFACRVDVTRRNFIN--ALTNMFQFTNAVISIVPEIENLKDQKQYFHHGKGGVIEDNEFTDAPILYAKSVDGLIFRN
B6beta RARGLLVSTFGKVIENNVFB--SSGSALLIADANAWYESGAVKDVLIENNDFRFCNSIYQFCEAVISIDPEIFTEQKYPFHRN-----IRIMDNTHFLFDYPIILFARSVNGHLLTFSS
**:*:*:**
Cebador cons. RTRGTLVTP2KVVIEENNF23TMSAALI32DANGWYEGSVPKDVIRGNTFINPA2222Q2G3AVISI3PENP2I2232P2HNGKDGGRIEDNTE2TFDYVLYAKSVDGL2FRN

610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660
SA  NTVRELDGADHPPYTSPLFVPHGSSGIRIARNHYDKGLNTSVVTD-----
B1alfa NLIYSIDTEKQK--ESDFIQMNCNEVTKENRVQLHHLFK-----
B2alfa NTIVRTETFFAASGNPVYVYLANGCKKAVIEGTVPKGETPROSIKTKENMKRDLKTIK-----
B3beta NTIVRTETFFAASGNPVYVYLANGCKKAVIEGTVPKGETPROSIKTKENMKRDLKTIK-----
B4beta NVLKTNTFKPFHWNKDRFLLEVRVNVKISE-----
B5beta NVLKTNTFKPFHWNKDRFLLEVRVNVKISE-----
B6beta NTLIRDTTIQPIHYRKEGITHLEACKSVVVISNNKLEGDVLGRIIVTIEKMKPSDVKISKNPFKLLK
*
Cebador cons. NTLI2R3TTEKPFH3NKD2F2LEGCK2VVISENVFEGET2RQ2S2TENMKRDLKTIKPFKLLK

```

FIG. 13

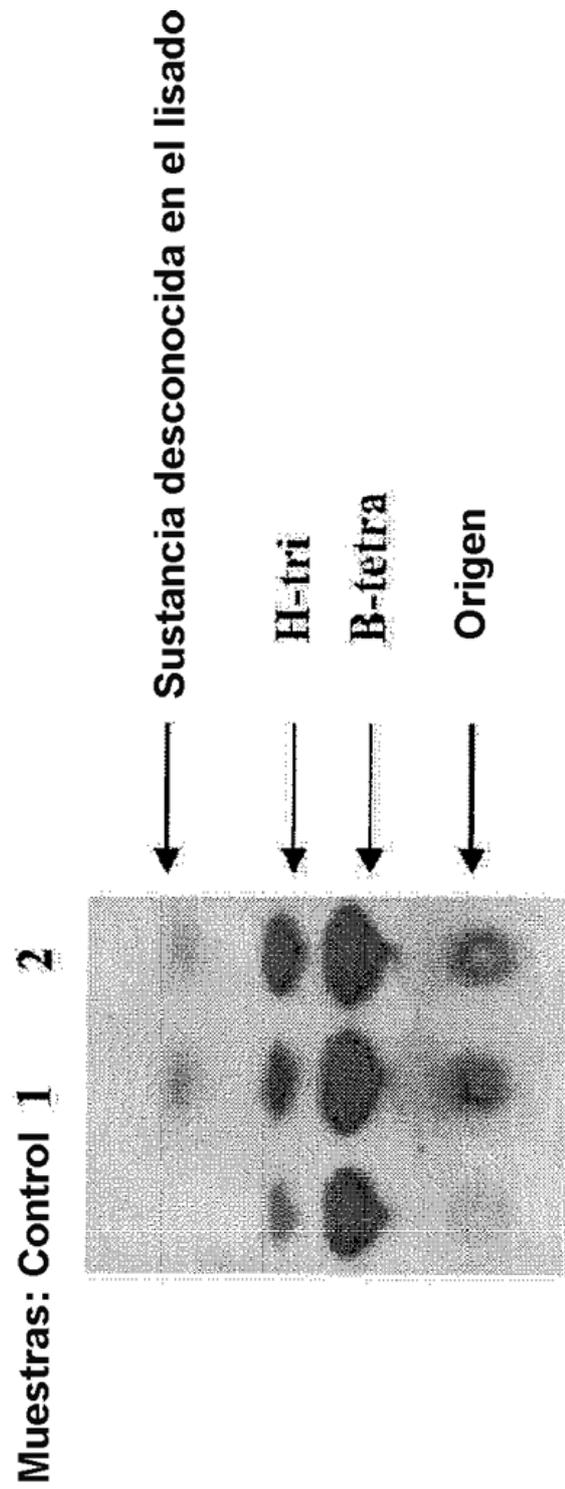


FIG. 14.

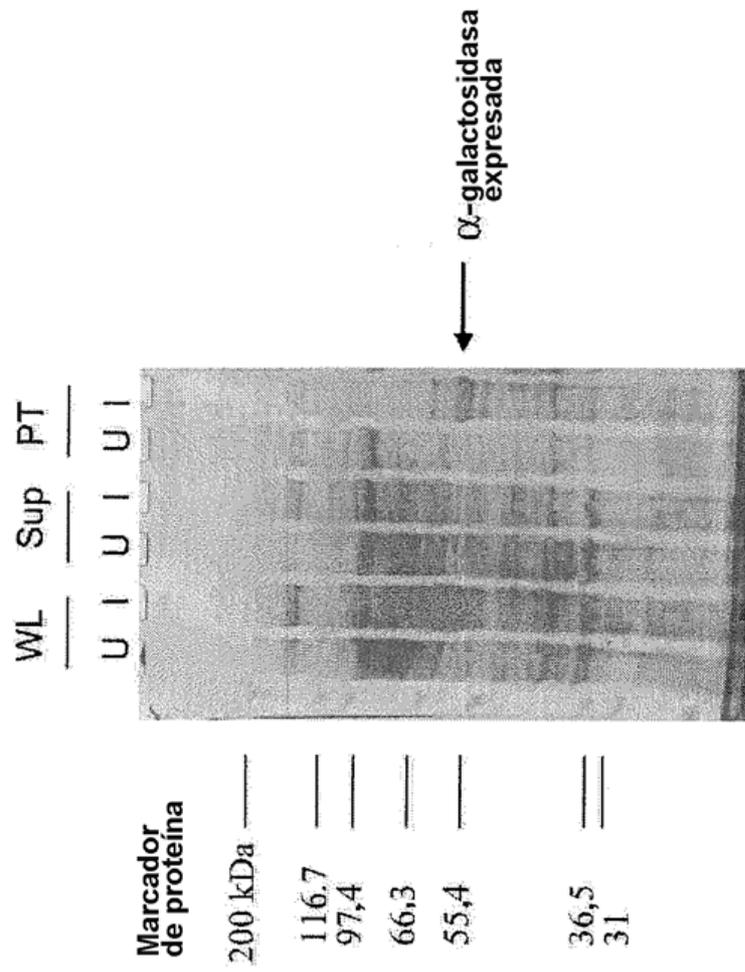


FIG. 15.

```

1 MAHCSSGGLSRFVYLGWVLAALGGATSAZAAAPAVTPVVVDVDFGADTGRDSTPAVAALR---HKRSVDRPVRIVVSGTQCLYFPRRRETRRLELMSN-TV
1 ---MSYMFIQLEAFAS---RIIEVEEQGDIEKALAKK---ADCKGPRVTVMSVSGHLDRAKSSOVLLKXLSNTIS
1 ---MKYHILPACGFLFYAAAH-AQQED---TVYVDFGAVSVSYNCTVQAAITD---ECKRTGAKVFLPEAGYDFMFGATKREKYEVSNTST
1 ---KTIPLFAESGLLSLVSVD-VCAQER---VYDISEGGLKANSKMASPVYKAKAKIKAKRSDGKVIPLPAGYDFMFGAGETVEEYVLSNDD-
1 ---KRTPLSLKTCGLSALLLCVNSIAASE---LISVDFEGLELDSRINAVPFAQAKAD---ACKQHFGSTLVPFRGRIDFNAQCHLEKDYIFENTY-
SA
102 CADQRYRDKIGLVEDEMDVTVDCGAGVHHGQTAFAASIRGTDVTFQNFSPDYAAKBEVIDATVATTGVDGHAAYRVLKKIPACGSPVYNGTHITWLQGTSPAT
75 ELDDPPTTHRIGLVNITLENITIDCGSGLMNGEITSEVDDKCEGIVLKNFNIDVKKPPTOTEVEVLEE---GHDYLIYQVHPPTSOYRVDAOLEWYCGEG---
87 EQCPGKVTVGLMHEIDNLTIDCGSGLMNGEITSEVDDKCEGIVLKNFNIDVKKPPTOTEVEVLEE---GHDYLIYQVHPPTSOYRVDAOLEWYCGEG---
91 ---QDNPKVGIAGLDMKMLTIDCGSGLMNGEITSEVDDKCEGIVLKNFNIDVKKPPTOTEVEVLEE---GHDYLIYQVHPPTSOYRVDAOLEWYCGEG---
98 ---DVNPLAVLEQINDLTIDCGSGLMNGEITSEVDDKCEGIVLKNFNIDVKKPPTOTEVEVLEE---GHDYLIYQVHPPTSOYRVDAOLEWYCGEG---
SA
207 GPYXWSPGVDLQYTIHDPDAQKMRGDMPLFNVAAVTDLGGRKIRIDYITARPADAGLVIYORLIERTEPEGAIWESKNVTKMSMNAVYLOSEFVGVQFSEK
172 ---WSEFN---GIAOSYDRISEMWRSMNEN-LLRVTVELRPVLYLOKKEKO-VGLHRTIFORSDSPDEVSQVNEKGIENINMYVLCHEGVCVQYSEK
184 ---RNSNKHCEIYEDDESFTYSOKNT-LASDAFELAGIVENTP---RFPFKAQNTLIRADIDQVDFEFLSEKNTLSRLOMHRMHLGIVGIVCYTEN
186 ---WMPYSGIAPDCKIKAUVYNGE-IGCFYKGEVVA---RSCSPKAKDARLVPG---TVVAKRGWGPPTGRTMSRDVNTBLLDKVYVREMGILLALQLED
182 ---KSSLWALMQPFDIHLVYLFNGLNLOWESYDAEIRREGLIRUSDEKKAEPFAPGTVLYVYRHSITDHAGFIYHSDTINENYKLFHICGLGILLQYSKN
SA
312 ISIDKVNFAIDPRSC-RSTASFAIDFVQMSGKVKYSITRSLFDGPHDDPNIIEGTVLEVYKPGPSTLNTAYKHPCTAGPQOFAPGDDVYEAATKSTMTPLADAH
269 ITVDRCNFAPRPGSC-RTWAGFAFPIQVCGEGMTDIKSRFETSHDDPANIKGHLAIEFISDNRELKRFRMDQTEGEEAFAGDDILEVDSSELLVVYKCKV
282 ITMDRQVYKAPEDSC-RILASAMMHFSGCKGVTIDCYPACADDDQNVNCHN-RALEKIDAOFLKRFMHCQSGYGNAYFPAGDVTVAEIRAAFMERFASAT-
284 ITMDRQVYKAPEDSC-RILASAMMHFSGCKGVTIDCYPACADDDQNVNCHN-RALEKIDAOFLKRFMHCQSGYGNAYFPAGDVTVAEIRAAFMERFASAT-
285 ISPADVHIIPN-TERKRVLSGHDDGCFHFNGCSGLLKIENCSWAGLMDPDPNIHGCSRLMEVLSPTRIKCKPMDQISEGEMWGRDFTYGLIHRMRTVATG---
SA
416 QVTAVDQPSGMDHKKPLTMTVTDQRFVDAQVETG-GTVVENITATPVSUIGCVERNVDTROGIVTTRKPVITCNRFPGMSASIVYDADAYQVYESGQVADL
373 KEALVTPR---SMELMSSPLSEVMOCKDLLENLWTPENITNNRARPVTRGLITLKRSLIGNTFYGNQMSGIFVADDLSELYESGQVADL
385 ---VDRVRLSDRIVEVDRDITFSELEN-HDCVENLWTPPEVIRNFTSTRTGRTVTRKVVIEENTYKTCMGAILLIADAEQVYESGQVADL
389 ITAIR---PYDKGEIQGAREFSITKRAIDPAINEKSGFGENLWTPPEVIRNFTSTRTGRTVTRKVVIEENTYKTCMGAILLIADAEQVYESGQVADL
387 ---KMNKPEALNKAEPIIELSVDLPAGVZAGVLENLCTDPAEIRNCHGCSGARQELVSIPEKVIHNNVEP-SSCEAILLAGDANKMYESGQVADL
SA
520 TIRGMSFTK---PQGVIVPEPTEQVIDPATFTEHN---ISVERNSEDIGVTVVNAKSVGCAFETGRTVRLDGDHPPTXTEPLFVHSGSGIRIAR
469 TIRGMSFTK---PQGVIVPEPTEQVIDPATFTEHN---ISVERNSEDIGVTVVNAKSVGCAFETGRTVRLDGDHPPTXTEPLFVHSGSGIRIAR
481 LIKGTIFDCAYN---GGCHAVIIEHPSKRIIDARVYPCN---IRIEDNTERITFDVLYAKSTAGLFRNNTIIVREIFFAASGNFYVFMNGCKKAVIEG
492 TIRGMSFTK---PQGVIVPEPTEQVIDPATFTEHN---ISVERNSEDIGVTVVNAKSVGCAFETGRTVRLDGDHPPTXTEPLFVHSGSGIRIAR
482 LIENNDFRYPCNSSIYQCEAVISIDPEPTPOKYPTERN---IRAMDNTHELEDDVILFASVNSLTPSSNTIIDPTVQYPHYKNEGIPEACKSIVVLSN
SA
612 NHYDEGLHNTSVYTD-----
561 VQLEHLFK-----
579 TVFKGTEPKQSIKTENMKKDLKTIK-----
596 -----
582 NKIEGDVYLGRIYTIKMKPFDVKISKNPFFKLIK-----

```

←dAVER 9

dAVER 7

Fig. 16

```

1  MGTATAQPAL RPQTSTVIGG LHGAAVLDNT GRTVIDVTDG GADPSGKADS
51  AAVSAAMAH AKTVGGPTTL HFPTGTYHIW PERTPKRELY VSNTVGSDDQA
101 FRTKNIGILV EDMRDVVVDG GGSRIVNHGF QTVFAAIRSS DVRETNESQT
151 WVAPKTVDIT VADAGVVSGQ AYRIIDIPET YDYAVEGTSV RWNGERGPAT
201 GOPYWTGTNS FDYSQVHDPV TNRTWRTSNP VFPERHEDHR FRRRQVRITY
251 GDSTAPGDRG YVYQMRVTR DTPGALFVES SRVTVDHLRL GYLHGEVVC
301 QLESDIGLES VTEKEDRGSG RVTSGFADHI QMSGVKGTVR ITNSVFDNPQ
351 DDEPNIHGTY LQATAAERET LQLRYMHNET SGFPQFYPGD TIELVDKRTM
401 LAAPGATAKV VSVTGPTGSG VPAGTDPDTY LRTMTVVLDR TLPAAVLAAP
451 GDYVAENTTY TPTVEITGNT EQAVPTRGIL VTTRRPVRIE NNRFDGMSMA
501 SIYISSDARS WYESGPVRNV TIRGNVEDRF ASPVIFFDPT NQDFVAGQV
551 FENVLEDND FNLTGSTILS GRGVGGLTFR DNRVERYPHL RLTGFSRALR
601 VGDPTTVTTD APPPSHTSPL FTFDGADDIT LANNTYGNNGF NKRVTANMD
651 VSEITVTADG LALNADSISS APVAVSYSSS RPKVATVDSE GVVKALSGGT
701 TSITARATIG GVRVTSNPVK VVVATER

```

FIG.17

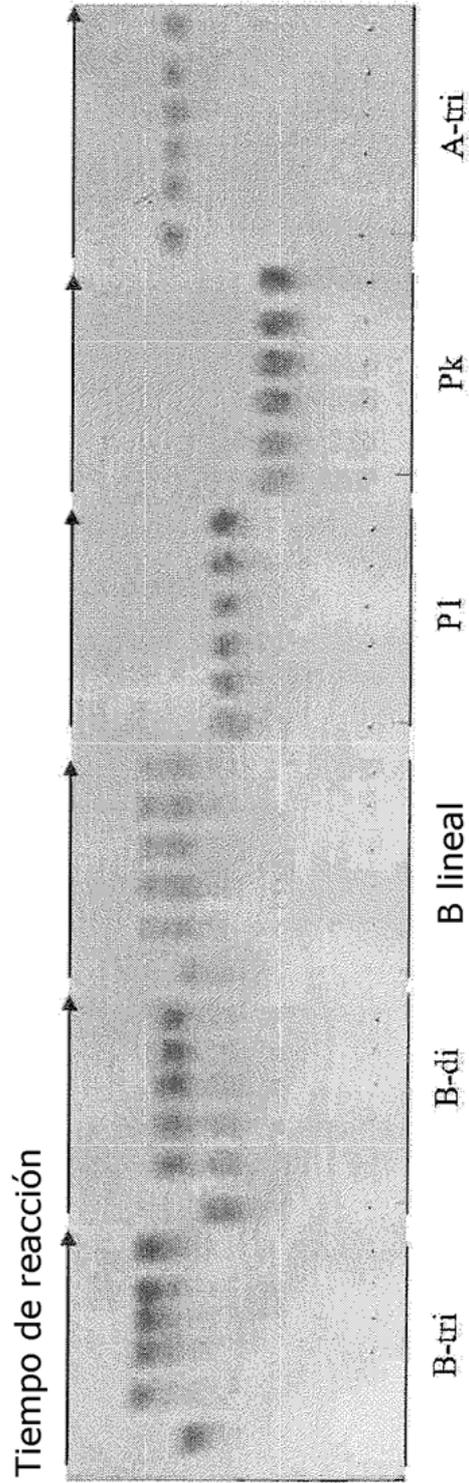


FIG. 18

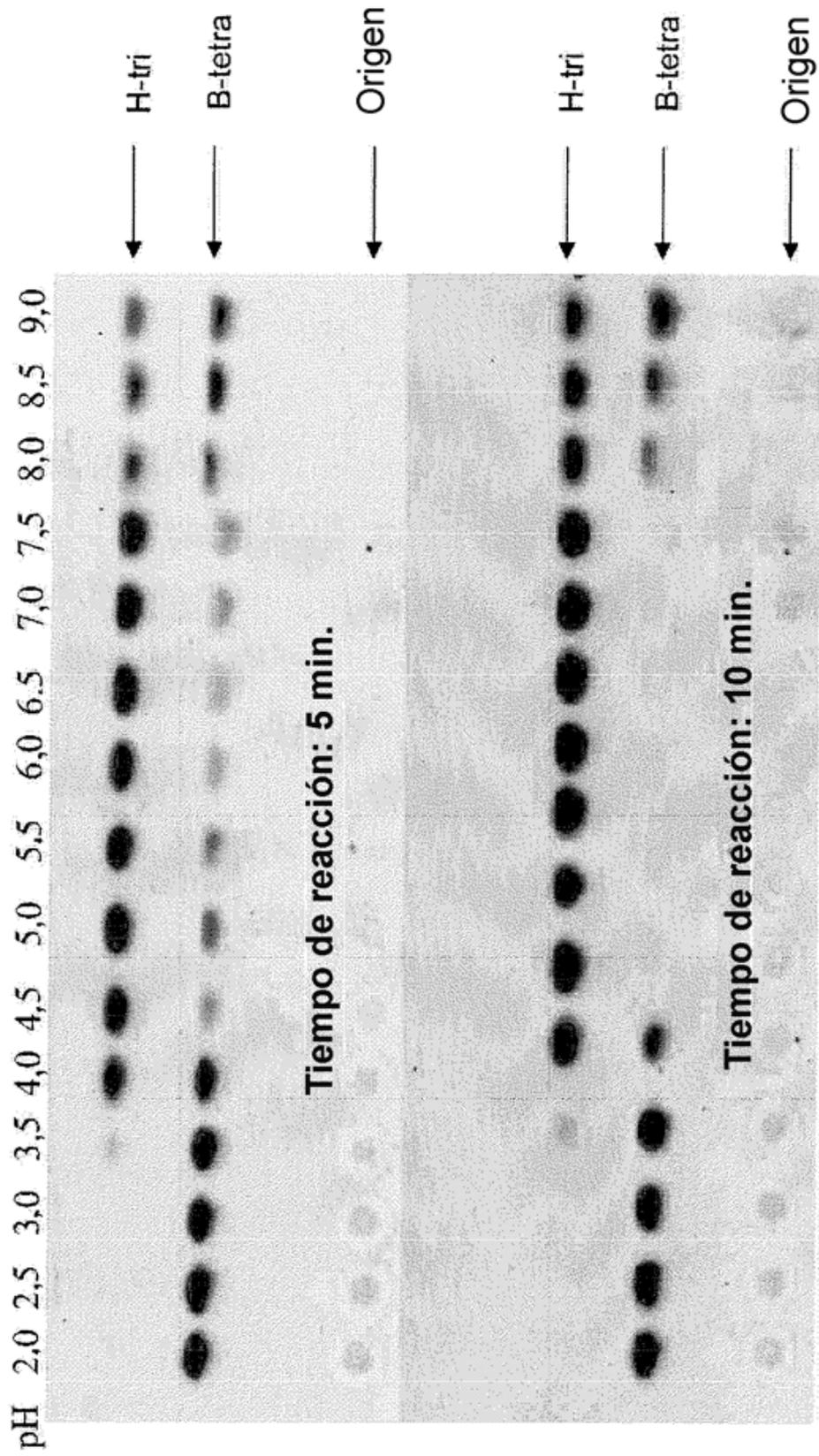


FIG. 19

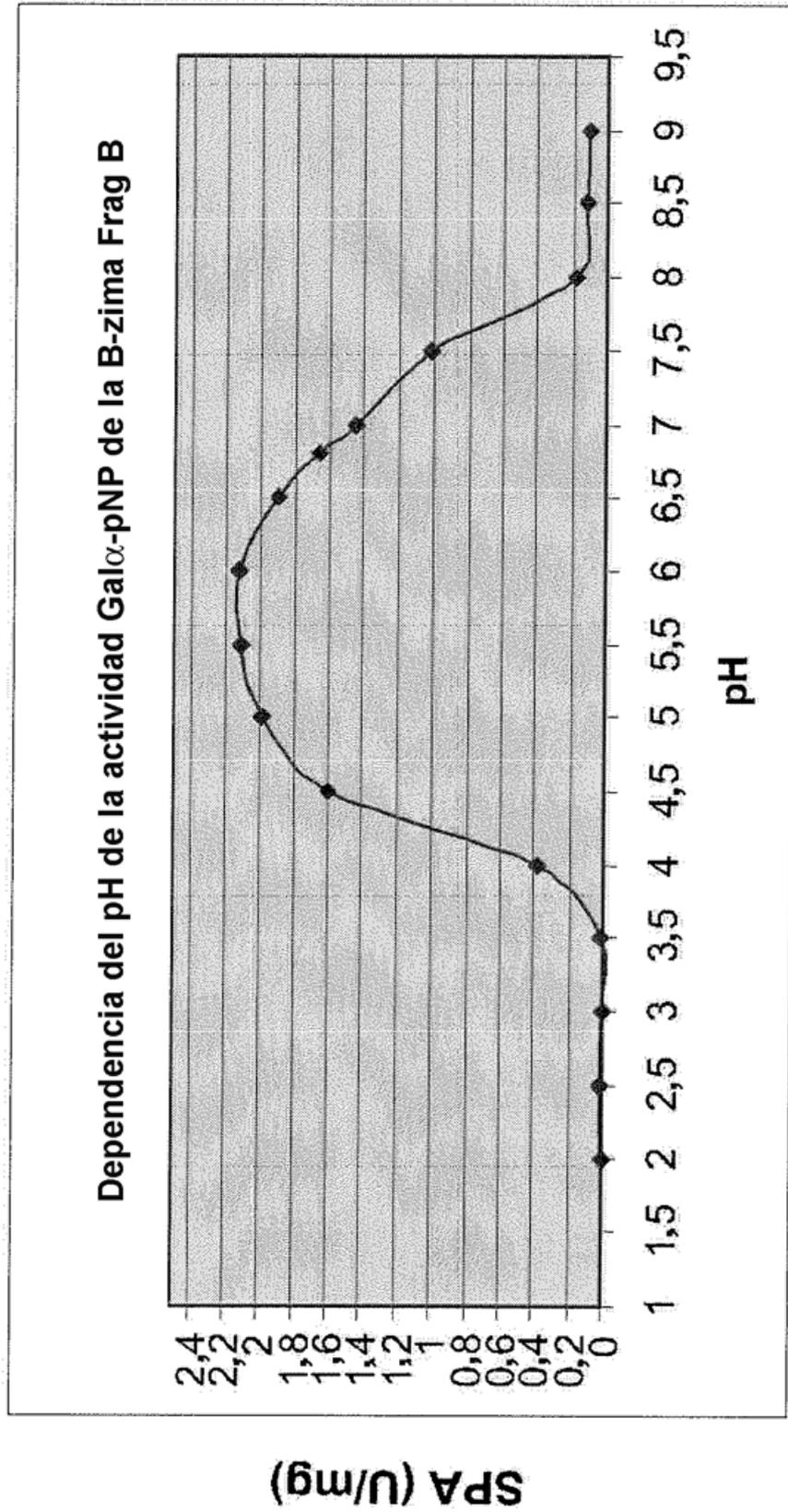
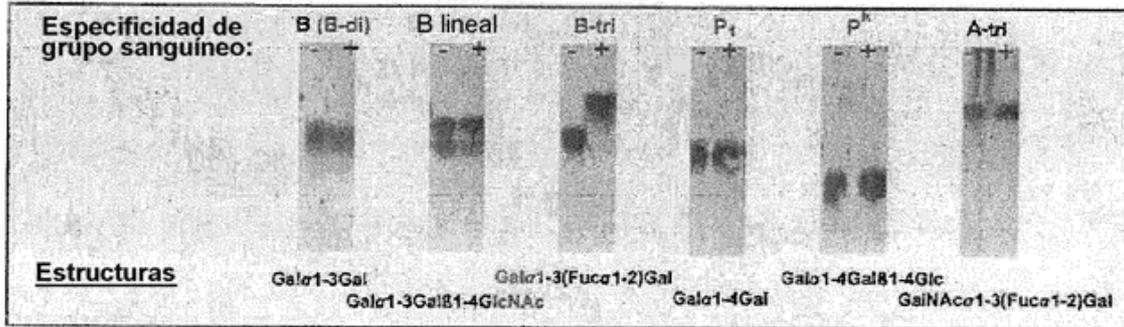


Fig. 20.

A. Especificidad de sustrato de la α -galactosidasa BF α 2 (FragA).



B. Especificidad de sustrato de la α -galactosidasa BF β 1 (FragB).

