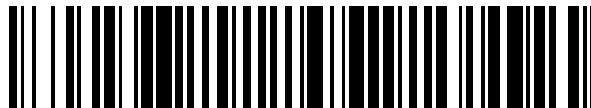


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 838**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006 E 10165154 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2250884**

54 Título: **Nuevas alfa-galactosidasas**

30 Prioridad:

31.10.2005 US 731845 P
07.08.2006 US 836000 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2013

73 Titular/es:

VELICO MEDICAL, INC. (100.0%)
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 2 400 838 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

Nuevas alfa-galactosidasas

5 Esta invención se refiere a un grupo de polipéptidos que tienen actividades α -galactosidasa, demostrando especificidades de sustrato únicas y propiedades cinéticas superiores, que se usan para eliminación de monosacáridos inmunodominante en productos sanguíneos y tejidos. Específicamente esta invención proporciona una nueva familia de α 3 glucosidasas, usada para la retirada enzimática de antígenos de tipo B a partir de los productos sanguíneos reactivos de los grupos B y AB y el antígeno Galili a partir de tejidos de origen animal no humano, convirtiendo de este modo estos a células no inmunogénicas y a tejidos adecuados para trasplante.

Antecedentes de la invención

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

Hay más de treinta sistemas de grupos (o tipos) sanguíneos, de los que uno de los más importantes es el sistema AB0. Este 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 como así como en la superficie de células endoteliales y en la mayoría de las células epiteliales. El principal producto de la transfusión de sangre es eritrocitos, que son células sanguíneas rojas que contienen hemoglobina, de las que la función principal es el transporte de oxígeno. La sangre de grupo A contiene antígeno A en sus eritrocitos. De forma similar, la sangre de grupo B contiene antígeno B en sus eritrocitos. La sangre de grupo AB contiene ambos antígenos y la sangre de grupo 0 no contiene ningún antígeno.

25 Las estructuras del grupo sanguíneo son glucoproteínas o glucolípidos y se ha realizado un trabajo considerable para identificar las estructuras específicas que componen los determinantes o antígenos A y B. La especificidad del grupo sanguíneo ABH se determina por la naturaleza y unión de monosacáridos en los extremos de las cadenas de carbohidratos. Las cadenas de carbohidratos se unen a un armazón peptídico (glucoproteína) o lípido (glucoesfingolípido), que están unidos a la membrana celular de las células. El monosacárido inmunodominante que determina especificidad de tipo A es una N-acetilgalactosamina α 1-3 enlazada terminal (GalNAc), mientras que el monosacárido correspondiente de especificidad de tipo B es una galactosa α 1-3 enlazada (Gal). Las células de tipo 0 carecen de cualquiera de estos monosacáridos en los extremos de cadenas oligosacáridicas, que en cambio están terminadas con residuos de fucosa (Fuc) α 1-2 enlazada.

35 Se encuentran una gran diversidad de estructuras de carbohidratos ABH de grupos sanguíneos debido a variaciones estructurales en las cadenas oligosacáridicas que llevan sacáridos inmunodominantes de ABH. La tabla 1 enumera las estructuras descritas en el hombre y aquellas que se han encontrado en extractos de glóbulos rojos humanos o en extractos de sangre. Para una revisión, véase, Clausen y Hakomori, Vox Sang 56 (1): 1-20,1989). Los glóbulos rojos contienen antígenos ABH de glicoproteínas N-ligadas y glucoesfingolípidos, mientras que se cree generalmente que los glucanos O-enlazados en glucoproteínas eritrocíticas, principalmente glucoforinas, están terminadas por ácido siálico y no con antígenos ABH. Los glucoesfingolípidos de cadena de tipo 1 no son productos endógenos de glóbulos rojos, pero se adsorben más a partir de plasma.

Tabla I:

Determinantes inmunorreactivos ABH de grupos sanguíneos de histocompatibilidad de células humanas¹

Nombre	Estructura hapténica	Tipo de glucoconjugado	Hallado en los glóbulos rojos	n.º
Tipo 1 de A, ALe ^G	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	1
Tipo 1 de A, ALe ^b	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	2
A tipo 2, A	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido N-ligado	3
Tipo 2 de A, ALe ^y	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	¿Glucolípido?	4

ES 2 400 838 T3

Tipo 3 de A, O-ligado	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuc α 1	O-ligado		5
A tipo 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	Glucolípido	Glucolípido	6
Tipo 4 de A, Globo	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido	¿Glucolípido?	7
Tipo 4 de A, Ganglio	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido		8
Tipo 1 de B, BLe ^d	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	9
Tipo 1 de B, BLe ^b	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	10
Tipo 2 de B, B	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido N-ligado	11
Tipo 2 de B, BLe ^y	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	¿Glucolípido?	12
Tipo 3 de B, O-ligado	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuc α 1	O-ligado		13
Tipo 4 de B, Globo	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuc α 1	¿Glucolípido?	¿Glucolípido?	14
Tipo 4 de B, Ganglio	Gal α 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-R 2 Fuc α 1	¿Glucolípido?		15
Tipo 1 de H, Le ^{α}	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	16
Tipo 1 de H, Le ^b	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R 2 4 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido	17
Tipo 2 de H, H	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	Glucolípido N-ligado	18
Tipo 2 de H, Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 3 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido N-ligado O-ligado	¿Glucolípido?	19
Tipo 3 de H, O-ligado	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr 2 Fuc α 1	O-ligado		20
Tipo 3 de H, H-A	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 2 Fuc α 1 Fuc α 1	Glucolípido	Glucolípido (A RBC)	21

Tipo 4 de H, Globo	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido	Glucolípido	22
Tipo 4 de H, Ganglio	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido		23
Thomsen-Frie Denrich Tf, T	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr	O-ligado	O-ligado (+SA)	24
Gal-A, reactividad cruzada de T	Gal β 1-3GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R 2 Fuc α 1	Glucolípido	Glucolípido (A RBC)	25
Tn, reactividad cruzada de A	GalNAc α 1-O-Ser/Thr	O-ligado	O-ligado (+SA)	26

¹ Adaptado de Clausen y Hakomori, Vox Sang 56 (1): 1-20,1989. Designaciones: "?" indican estructuras glicolípídicas potenciales que no se han comunicado hasta la fecha.

- 5 La sangre de grupo A y B existe en varios subtipos. Los subtipos del grupo sanguíneo A son los más frecuentes y hay tres subtipos reconocidos de tipo A de sangre. 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 de A₁ tienen más sitios A antigénicos, *es decir*, residuos N-acetilgalactosamina terminales, que eritrocitos de A_{int} que a su vez tienen más sitios A antigénicos que los eritrocitos de A₂. Cualitativamente, los eritrocitos A1 tienen una estructura A repetida dual en un subgrupo de glucoesfingolípidos, mientras que las células A₂ tienen una H en una estructura interna de un subgrupo similar de glicolípidos (Clausen y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82 (4): 1199-203, 1985, Clausen y *cols.*, J. Biol. Chem. 261 (3): 1380-7,1986). Estas diferencias entre A₁ y subtipos A débiles se piensa que se refieren a las diferencias en las propiedades cinéticas de variantes de isoenzima A de grupo sanguíneo responsables de la formación de antígenos A (Clausen y *cols.*, J. Biol. Chem. 261 (3): 1388-92,1986). Las diferencias de los subtipos del grupo B se cree que son exclusivamente de naturaleza cuantitativa.

La sangre de grupo A contiene anticuerpos frente al el antígeno B. A la inversa, la sangre del grupo B contiene anticuerpos frente al antígeno A. La sangre del grupo AB no contiene ningún anticuerpo y el grupo sanguíneo 0 tiene ambos. Los anticuerpos frente a estos y otros antígenos de grupos sanguíneos definidos de carbohidratos se cree que se facilitan por exposición continua a organismos microbianos que portan estructuras de carbohidratos 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 contenga el/los antígenos correspondientes. Si una persona recibe una transfusión de sangre de un grupo incompatible, los anticuerpos del receptor de la transfusión de sangre revisten las células sanguíneas del grupo incompatible transfundido y causan que los glóbulos rojos sanguíneos se aglutinen, o se peguen conjuntamente. Pueden resultar de ahí reacciones de transfusión y/o hemólisis (la destrucción de los glóbulos rojos).

Con el fin de evitar reacciones de transfusión graves debidas a la presencia de anticuerpos frente a los antígenos de grupos sanguíneos A y B el grupo sanguíneo del donante y el receptor se hacen coincidir antes de transfusiones sanguíneas por procedimientos de tipificación. Por ejemplo, un receptor de tipo A de sangre puede transfundirse con seguridad con sangre de tipo A, que contiene antígenos compatibles, pero no con sangre de tipo B, que activaría una respuesta inmune adversa en el receptor. Debido a que la sangre de grupo 0 no contiene antígenos A o B, ella se puede transfundir en cualquier receptor con cualquier tipo de sangre, *es decir*, en receptores con tipos de sangre A, B, AB o 0. Así, la sangre de grupo 0 se considera "universal" y se puede usar para todas las transfusiones. Así, es deseable para los bancos de sangre mantener grandes cantidades de sangre de tipo 0. Sin embargo, existe una escasez de donantes de sangre de tipo 0. Por lo tanto, es deseable y útil eliminar los antígenos A y B inmunodominantes en la sangre de tipos A, B y AB con el fin de mantener cantidades grandes de productos sanguíneos universales.

En un intento de incrementar el suministro de sangre de tipo O, se han desarrollado procedimientos para convertir sangre de tipo A, B y AB a sangre de tipo 0. Aunque la conversión enzimática tanto de glóbulos rojos del grupo B como de glóbulos rojos del grupo A se ha logrado en el pasado, estos procedimientos más antiguos tienen varias desventajas, en particular que requieren cantidades excesivas de enzima y las especificidades de muchas enzimas modificadoras de glucano no están restringidas a escisión de solamente el grupo sanguíneo de los antígenos A o B.

Como se explicará más adelante, la presente invención proporciona una familia de polipéptidos que tienen especificidades de sustrato altamente refinadas y mejores propiedades cinéticas que se pueden usar para generar tejidos y productos sanguíneos que carecen de antígenos inmunodominantes, proporcionando de este modo un

procedimiento comercial eficiente y rentable para suministrar, *por ejemplo* células sanguíneas universales (no inmunogénicas) para trasplante de células sanguíneas e incluso tejidos animales para xenotransplante en seres humanos.

5 Conversión de células del grupo B sanguíneas:

La conversión enzimática de sangre de tipo B usando α -galactosidasa de grano de café (*Coffea canephora*) recombinante se ha logrado usando 100-200 U/ml (Patente de los EE.UU. n.º: 4.427.777; Zhu y cols., Arch Biochem Biophys 1996; 327 (2): 324-9; Kruskall y cols., Transfusión 2000; 40 (11): 1290-8). La actividad específica de α -galactosidasa de grano de café se comunicó que es 32 U/mg usando p-nitrofenil- α -D-Gal con una unidad (U) definida como un nmol de sustrato hidrolizado por minuto.

(Zhu y cols., Arch Biochem Biophys 1996; 327 (2): 324-9). Se hicieron conversiones enzimáticas a pH 5,5 con aproximadamente 6 mg/ml de enzima a hematocrito al 80-90 % y las células 0 convertidas resultantes funcionaron normalmente en experimentos de transfusión y no se observaron parámetros clínicos adversos significativos (Kruskall y cols., Transfusión 2000; 40 (11): 1290-8). Este dato junto con publicaciones anteriores, demuestran claramente que la conversión enzimática de glóbulos rojos es factible y que tales células de grupo convertidas en células del grupo 0 (B-ECO) por la enzima 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 la producción recombinante de la enzima, vuelven a este procedimiento para generar células ECO impracticable principalmente por razones económicas.

Las reivindicaciones de protocolos con una conversión mejorada de células B usando α -galactosidasa de Glycine max con una actividad específica de aproximadamente 200 U/mg, se han comunicado usando 5-10 unidades de enzima/ml de sangre (con hematocrito al 16 %) (véanse, Patentes de los U.S. n.ºs: 5606042; 5633130; 5731426; 6184017). La α -galactosidasa de Glycine max se usó así a 25-50 μ g/ml, que representa una reducción significativa en las cantidades de proteína enzimática requeridas (50-200 veces) (Davis y cols., Biochemistry and Molecular Biology International, 39 (3): 471-485,1996). Esta reducción se debe en parte a la actividad específica más alta de la α -galactosidasa de Glycine max (aproximadamente 6 veces) así como a los procedimientos diferentes usados para conversión y evaluación. Los 200 U/ml de la enzima usada en el estudio de Kruskall y cols., (Transfusión, 40 (11): 1290-8, 2000) se calcularon para conversiones de unidades enteras (aproximadamente 220 ml de células envasadas) a hematocritos del 80-90 % y se analizaron cuidadosamente por clasificación de banco de grupos sanguíneos estándar así como por análisis de reactividad cruzada más sensible. Además, la eficiencia de conversión fue evaluada por el análisis de la supervivencia y la inmunidad inducida en pacientes que reciben transfusiones múltiples de células convertidas. Las conversiones enzimáticas se hicieron en tubos de prueba en escala de ml a hematocrito al 16 %, según se describe en la Patente de los EE.UU. n.º: 5606042 (y en las Patentes de los EE.UU. n.ºs: 5633130; 5731426; 6184017) con α -galactosidasa de Glycine max y la eficiencia de conversión no se evaluó por análisis de reactividad cruzada. La conversión de las células a hematocrito al 16 % requirió 10 U/ml, mientras que las conversiones al 8 % requirieron 5 U/ml, indicando que convertir a hematocrito incrementado requiere más enzima aunque no se probaron concentraciones de células más altas. Así, parte de la reducción en cantidades de proteína enzimática requerida comparada con protocolos comunicados por Kruskall y cols., (Transfusión 2000; 40 (11): 1290-8), está relacionada con la concentración (hematocrito) de células usadas en conversión y esto puede representar más de 5-10 veces, aunque la comparación directa no es posible sin experimentación adicional. La Patente de los EE.UU. n.º: 5606042 (y las Patentes de los EE.UU. n.ºs: 5633130; 5731426; 6184017) proporcionan adicionalmente mejoras en el tampón de conversión usando citrato de Na y glicina a pH menos ácida (preferentemente pH 5,8) e incluyendo proteína adicional en forma de BSA (albúmina de suero bovino) para la estabilización. De forma interesante, el tampón de conversión desarrollado para la α -galactosidasa de Glycine max se encontró que no era aplicable a la α -galactosidasa de grano de café. Aunque una cierta mejora en la conversión de células B puede proporcionarse por la Patente de los EE.UU. n.º: 5606042 (y por las Patentes de los EE.UU. n.ºs: 5633130; 5731426; 6184017), es evidente que se requieren al menos más de 0,5 mg de enzima por mililitro de glóbulos rojos de tipo B envasados usando el protocolo revelado. Es probable que se requiera considerablemente más enzima que esto para obtener células plenamente convertidas a células 0 por los procedimientos más sensibles de clasificación usados en protocolos de clasificación de banco de grupos sanguíneos estándar. Además, el protocolo requiere introducción de proteína extraña (BSA o albúmina de suero humano) así como exponer productos sanguíneos a un pH ácido significativo.

Bakunina y cols. (Bakunina y cols. Biochemistry (Moscú) 1998, p. 1420) han reivindicado la identificación y el aislamiento de una nueva α -galactosidasa a partir de la bacteria marina *Pseudoalteromonas* spp. (KMM 701). La preparación de enzima aislada se purifica a una actividad específica de 9,8 U/mg, usando el sustrato pNP-Gal y tenía un peso molecular aparente por filtración de gel 195 kD. La preparación de enzimas escindió eficientemente el sustrato de monosacáridos pNP-Gal con una Km evidente por pNP-Gal de 0,29 mM así como varios disacáridos no ramificados con α -galactosa terminal que incluyen melibiosa y Gal α 1-3Gal y por tanto, no muestran una gran especificidad por el grupo sanguíneo B. Esta enzima escindirá por lo tanto oligosacáridos no ramificados con α -Gal tal como la estructura lineal B así como el antígeno PT. La enzima se comunicó para tener un pH neutro óptimo (*es decir*, el pH óptimo que varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,7) y células del grupo B con tiempo de reacción de incubación 24 horas para clasificar células como células del grupo 0. Sin embargo, los detalles del procedimiento de conversión y del

consumo de enzimas no se describieron y la eficiencia de conversión evaluada por procedimientos de clasificación estándar con reactivos de clasificación autorizados sigue sin ponerse a prueba. La purificación a homogeneidad, clonación y expresión recombinante de la enzima se requerirá probablemente para proporcionar las cantidades y la calidad de proteína enzimática requerida para la conversión enzimática de los glóbulos rojos.

5 Los autores de la presente invención han revelado (documento U.S.S.N. 10/251271) la identificación y caracterización parcial de una actividad α -galactosidasa novedosa con actividad específica alta y especificidad de sustrato altamente restringida para el antígeno B de grupo sanguíneo. La actividad enzimática se identificó rastreando más de 2400
10 aislados bacterianos y fúngicos y se encontró en solamente unas pocas bacterias. La enzima estaba parcialmente purificada a partir de lisados celulares de cepa n.º: 2357 de *Streptomyces griseoplanus* (n.º de depósito en ATCC PTA-4077) y se obtuvo información de secuencia de aminoácidos parciales.

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

Ensayos para determinar α Gal escindiendo actividades glucosidasa:

20 Los procedimientos anteriores de búsqueda, identificación y caracterización de exo-glucosidasas dependen del uso de derivados de monosacáridos simples como sustratos para identificar especificidad de sacáridos y especificidad de unión potencial. Sustratos de monosacáridos derivatizados, o raramente oligosacáridos derivatizados incluyen sin
25 limitación p-nitrofenilo (pNP), bencilo (Bz), 4-metil-umbeliferilo (Umb), y 7-amino-4-metil-cumarina (AMC). El uso de tales sustratos proporciona herramientas fáciles, rápidas y económicas para identificar actividades glucosidasa y realiza rastreo a gran escala de diversas fuentes de enzimas aplicables en la práctica. Sin embargo, las propiedades
30 cinéticas y las especificidades de sustrato buenas de enzimas glucosidasa pueden no reflejarse necesariamente en ensayos con tales estructuras simples. También es posible que las enzimas novedosas con alto grado de especificidad y/o eficiencia selectiva para oligosacáridos de complejo y estructuras de glucoconjugados únicas existan, pero que éstas pueden haberse pasado por alto y permanezcan sin reconocer debido a los procedimientos de análisis. Por lo tanto, con el fin de identificar y seleccionar la exo-glucosidasas óptima para una estructura de oligosacárido o
35 glucoconjugado complejo particular es preferible usar tales estructuras complejas en ensayos usados para rastrear fuentes de enzimas. Además, los ensayos preferidos usados para rastreo incluyen la selección para propiedades cinéticas preferibles tales como requerimiento de pH y actuación sobre sustratos, *por ejemplo*, unidos a la membrana de células.

En estudios previos, todas las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y α -N-acetilgalactosaminidasas (EC 3.2.1.49) usadas para retirar los antígenos B y A de células sanguíneas se hubieron identificado y caracterizado usando principalmente
40 derivados de p-nitrofenilmonosacáridos. De manera interesante, la mayoría de estas enzimas α -galactosidasa y α -N-acetilgalactosaminidasa usadas en estudios pasados son homólogos evolutivos como se evidencia por similitudes de secuencias de ADN significativas y de secuencias de aminoácidos significativas. Por lo tanto, la α -galactosidasa y la α -N-acetilgalactosaminidasa son homólogos cercanos (Wang y cols., J Biol Chem, 265: 21859-66,1990) y otras enzimas previamente usadas en la conversión de células sanguíneas, incluyendo la α -N-acetilgalactosaminidasa de hígado de pollo, la α -N-acetilgalactosaminidasa de acremonium fúngica y las α -galactosidasas bacterianas presentan todas similitudes de secuencia significativas. El análisis de secuencias de todas las hidrolasas de O-glicósido
45 conocidas se ha agrupado en 85 familias distintas basadas en análisis de secuencias y las α -galactosidasas y α -acetilgalactosaminidasas anteriormente mencionadas se agrupan en la familia 27 (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/32.html> ghf_). Estas enzimas se caracterizan por tener un mecanismo de retención de catálisis y por usar ácido aspártico ácido como el nucleófilo catalítico (Henrissat, Biochem Soc. Trans, 26 (2): 153-6, 1998; Rye y Withers, Curr Opin Chem Biol, 4 (5): 573-80, 2000). La estructura primaria de una
50 α -N-acetilgalactosaminidasa bacteriana de *Clostridium perfringens* se comunicó que es distinta y no homóloga a α -N-acetilgalactosaminidasas eucariotas (Calcutt y cols. FEMS Micro Lett 214: 77-80, 2002) y se agruparon en una familia 36 de glucosidasas relacionada de forma distante, que contiene también α -galactosidasas y α -N-acetilgalactosaminidasas (http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_32.html). El mecanismo catalítico de este grupo de enzimas se predice que sea similar a aquel de enzimas de la familia 27 debido a que existe alguna similitud
55 de secuencia entre las enzimas de las dos familias.

Sumario de la invención

60 La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para la retirada enzimática de antígenos de tipo B de los productos sanguíneos reactivos de grupos sanguíneos B y AB. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para la eliminación enzimática de los monosacáridos inmunodominantes especificando los antígenos de grupos sanguíneos B, a saber α 1,3-D-galactosa.

65 En una realización, esta invención proporciona una familia novedosa de polipéptidos homólogos, que tienen 20 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos general con SEC. n.º: 2). Estos polipéptidos presentan actividad

α -galactosidasa a través de un pH neutro óptimo y demuestran especificidad de sustrato alta para para grupo sanguíneo B o estructuras antigénicas de Galili y ninguna actividad o actividad insignificante con sustratos monosacáridicos de α Gal o de α GalNAc-pNP. Ciertos miembros de esta familia no muestran ninguna actividad o muestran actividad insignificante con Gal unida en α 1-3 lineal. Otros polipéptidos en esta familia escindirán estructuras lineales, pero no mostrarán ninguna actividad o mostrarán actividad insignificante con antígenos P y uniones Gal α 1-4. Los polipéptidos novedosos y la familia de genes novedosa desvelados por la presente invención tiene aplicaciones para usar en la retirada de monosacáridos inmunodominantes, α Gal y Galili, a partir de los objetivos oligosacáridicos de complejos tales como aquellos cerca de los antígenos carbohidratos A y B verdaderos de la superficie de células en productos sanguíneos y el antígeno de Galili de tejidos animales.

En otro aspecto, esta invención proporciona procedimientos para la seroconversión de todos los glóbulos rojos del grupo sanguíneo AB y B, dando como resultado la eliminación de antígenos B inmunodominantes del tipo B y AB. La eliminación de los antígenos se puede determinar, por ejemplo por clasificación serológica en banco de grupos sanguíneos estándar. De acuerdo con los procedimientos de esta invención, los antígenos B se eliminan usando los polipéptidos descritos, que (i) tienen especificidad altamente restringida para antígenos del grupo sanguíneo B, (ii) tienen actuación óptima a pH neutro con oligosacáridos de grupos sanguíneos y (iii) son activos en conversión de glóbulos rojos a un pH ligeramente ácido a ligeramente básico y preferentemente a un pH neutro (pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8). Estos procedimientos comprenden las etapas de: (a) poner en contacto un producto sanguíneo con uno o más de estos polipéptidos, en condiciones de pH aproximadamente neutras, durante un periodo de tiempo suficiente para retirar los antígenos B dominantes, y (b) retirar el polipéptido y los fragmentos de antígeno digeridos del producto sanguíneo seroconvertido.

En otra realización, esta invención proporciona procedimientos para la retirada de todos los antígenos B de los grupos B o AB, usando α -galactosidasas que (i) tienen especificidad altamente restringida para antígenos de grupo sanguíneo B; y (ii) son activos en conversión de glóbulos rojos con oligosacáridos de grupo sanguíneo, por encima de un intervalo de pH aproximadamente neutro (pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8).

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan eritrocitos sero-convertidos. En una realización, los eritrocitos seroconvertidos se caracterizan como: (i) que se ha convertido de un eritrocito de tipo B a un eritrocito de tipo AB a un eritrocito no-B (que no tiene antígenos B detectables, según se determina por clasificación serológica de banco de grupos sanguíneos) seroconvertido usando un polipéptido de la familia descrita en el presente documento.

En aún otro aspecto, la invención incluye un glóbulo rojo modificado que comprende: un eritrocito de grupo B o un eritrocito de grupo AB que carece de epítomos B inmunodominantes pero presenta epítomos de α 1-4Gal, incluyendo los antígenos de grupo sanguíneo P1 y P^k. En una realización, la célula sanguínea carece sustancialmente de epítomos inmunodominantes B según se determina por clasificación serológica o por ensayos de hemaglutinación, y también carece de estructuras de Gal unidas en α 1-3 lineales. En otra realización, la célula sanguínea carece sustancialmente de epítomos B inmunodominantes según se determina por clasificación serológica o por ensayos de hemaglutinación, pero retiene estructuras de Gal unidas en α 1-3 lineales.

En aún otro aspecto, la invención incluye un glóbulo rojo modificado preparado por el procedimiento que comprende: obtener un eritrocito de grupo B o un eritrocito de grupo AB, suspendiendo el eritrocito en una solución tampón que tiene un pH aproximadamente neutro (aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 8) y poner en contacto el eritrocito con polipéptido de con la actividad eritrocitaria de un polipéptido de alfa galactosidasa escindiendo por tanto sustancialmente los epítomos B inmunodominantes del eritrocito. En diversas realizaciones, la *enzima* usada para procesar a los eritrocitos incluye al menos 10 aminoácidos contiguos del polipéptido (o la secuencia de nucleótidos que codifica los mismos) como se especifica por: SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8. En ciertas realizaciones, el procesamiento de la actividad enzimática del eritrocito se lleva a cabo a desde aproximadamente pH 6,0 hasta aproximadamente pH 8,0, preferentemente aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, o más preferentemente aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,5. En realizaciones preferidas actualmente, el procesamiento enzimático del eritrocito se lleva a cabo usando 0,01-1.000 μ g de enzima por ml de células sanguíneas, preferentemente 0,1-500 ng de enzima por ml de células sanguíneas, más preferentemente de 1-100 μ g de enzima por ml de células sanguíneas. Lo más preferentemente el procesamiento enzimático de antígenos de la preparación de eritrocitos se lleva a cabo usando 1-10 ng de enzima/ml de células sanguíneas.

En aún otro aspecto, la invención incluye un procedimiento de modificar un glóbulo rojo, que comprende: obtener un eritrocito de grupo B o de grupo AB, suspendiéndolo en una solución tampón que tiene aproximadamente pH neutro y ponerlo en contacto con una enzima que tiene al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia polipeptídica especificada como o codificada por: SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8, escindiendo por tanto los epítomos B inmunodominantes en el eritrocito de grupo B o de grupo AB según se determina por ensayos de clasificación serológica o de hemaglutinación. En una realización, la célula sanguínea carece sustancialmente de epítomos inmunodominantes B según se determina por clasificación serológica o por ensayos de hemaglutinación, y también carece de estructuras de Gal unidas en α 1-3 lineales. En otra realización, la célula sanguínea carece sustancialmente de epítomos B inmunodominantes según se determina por

clasificación serológica o por ensayos de hemaglutinación, pero retiene estructuras de Gal unidas en α 1-3 lineales.

En aún otro aspecto, la invención incluye un procedimiento de tratar un sujeto, que comprende: identificar un sujeto en necesidad de sangre de tipo A, O o AB, siendo el sujeto seropositivo para anticuerpos anti-B; obtener una preparación de células sanguíneas modificadas de células B seroconvertidas, u obtener la misma por los procedimientos descritos en el presente documento y; transfundir la preparación de células sanguíneas modificadas en el sujeto, en el que el sujeto no rechaza inmunológicamente las células sanguíneas transfundidas.

En aún otro aspecto, la invención incluye un polipéptido purificado, teniendo el polipéptido al menos 10 aminoácidos contiguos de las secuencias: SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8, en el que la enzima muestra actividad α 3 galactosidasa y un pH neutro óptimo. En ciertas realizaciones, la enzima purificada, comprende: un polipéptido que tiene al menos 10 aminoácidos de la siguiente secuencia numerada de acuerdo con ello con SEC. ID. n.º: 2: M en residuo 10; G en residuo 47; G, en residuo 84; Y en residuo 86; Y en residuo 99; N en residuo 102; K en residuo 114; T en residuo 127; G en residuo 130; G en residuo 132; G en residuo 139; N en residuo 156; D en residuo 160; P en residuo 164; G en residuo 205; R en residuo 277; R en residuo 281; F en residuo 287; G en residuo 308; Q en residuo 312; I en residuo 317; R en residuo 333; D en residuo 340; G en residuo 346; G en residuo 349; G en residuo 360; D en residuo 363; D en residuo 364; N en residuo 367; H en residuo 369; G en residuo 370; T en residuo 371; G en residuo 396; E en residuo 462; N en residuo 463; T en residuo 465; T en residuo 467; P en residuo 468; R en residuo 483; G en residuo 484; L en residuo 486; T en residuo 489; N en residuo 498; I en residuo 508; D en residuo 513; W en residuo 517; E en residuo 519; G en residuo 521; D en residuo 525; I en residuo 528; N en residuo 531; F en residuo 533; I en residuo 549; P en residuo 553; I en residuo 573; A en residuo 590; G en residuo 595; N en residuo 601; e I en residuo 629; donde el polipéptido tiene al menos identidad del 20 % con la SEC ID n.º: 2 y donde el polipéptido tiene también actividad α 3-galactosidasa. En una realización, el polipéptido demuestra especificidad de estructuras de galactosa alfa ramificadas pero no estructuras de alfa galactosa lineales. En otra realización, el polipéptido demuestra especificidad de estructuras de galactosa alfa lineales pero no de estructuras de α 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 (SEC ID n.º: 10). En otra realización, la enzima purificada comprende un polipéptido que incluye veintidós aminoácidos contiguos que tienen la secuencia: DXXXW(Y/F)E(S/T)GXXXD(L/V)(L/T)I(K/R)XNXF, (SEC ID n.º: 11) donde X puede ser cualquier aminoácido. En una realización, la enzima purificada incluye equivalentes funcionales de la misma que tienen actividad α 3 galactosidasa. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye una variante truncada que carece de una secuencia señal.

En otro aspecto, la invención incluye un procedimiento de producir una enzima recombinante, que comprende: obtener un ácido nucleico que codifica: SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8; expresar el ácido nucleico en una célula transfectada con las mismas; inducir expresión del ácido nucleico que codifica la enzima; y purificar la enzima expresada a partir de la célula. En diversas realizaciones, la invención incluye una célula procariota que no se da en la naturaleza, comprendiendo: un vector de expresión no hallado en una célula procariota de tipo silvestre, teniendo el vector de expresión una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia especificada por: SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8. Se apreciará que debido a la degeneración del código genético, la enzima recombinante puede optimizarse para expresión en el organismo huésped particular, como se conoce generalmente por aquellos 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 estas para catalizar la eliminación de sustancialmente todos los antígenos B inmunodominantes sobre eritrocitos B y AB. Las α -galactosidasas más preferidas son aquellas que son activas a un pH neutro y catalizan la eliminación de los antígenos B inmunodominantes en eritrocitos B y AB y ningún otro epítipo de α Gal de carbohidratos de cadena lineal unido a lípidos, tales como, antígeno P1 (Gal α 1,4 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 Glc β 1 ceramida) y antígeno Pk (Gal α 1,4 Gal β 1,4 Glc β 1 ceramida, también conocido como globotriosilceramida (Gb3Cer)/CD77). α -galactosidasas particulares de esta familia son como se describen más adelante como, SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7, SEC ID n.º: 8, el fragmento SEC ID n.º: 1 y la secuencia consenso de SEC ID n.º: 9.

En aún otro aspecto, esta invención proporciona procedimientos para el rastreo y la selección de enzimas con las características únicas preferidas descritas anteriormente y para procedimientos de purificación y secuenciación de aminoácidos útiles para clonación y expresión de los genes que codifican estas enzimas. Estos procedimientos proporcionan aislados bacterianos que producen tales enzimas preferidas. Tales otras aplicaciones y características de la invención serán patentes a partir de la descripción detallada que sigue.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para la retirada enzimática de los monosacáridos inmunodominantes en tejidos, tales como un tejido para xenotransplante. Específicamente la presente invención proporciona una familia novedosa de α 3-glucosidasas (como se describe anteriormente), usadas para la retirada enzimática del antígeno Galili de tejidos animales no humanos, convirtiendo por tanto estos a tejidos no inmunogénicos adecuados para trasplante. Los ejemplos de una α 3-galactosidasa incluyen, pero no se limitan a, de cualquiera de SEC ID n.º: 2-9.

El procedimiento de preparar un tejido para xenotrasplante comprende obtener un tejido de fuente animal no humana, incubar los tejidos con un polipéptido que tiene α 3-galactosidasa retirando por tanto residuos de galactosa terminales unidos en α 1-3 del tejido y aislar el tejido del polipéptido y la galactosa eliminada enzimáticamente, volviendo de este modo al tejido adecuado para xenotrasplante en seres humanos. En una realización, el tejido de una fuente animal no humana es el tejido conectivo porcino. En otra realización, el tejido conectivo porcino es un ligamento.

En otra realización, el tejido de una fuente animal no humana es un órgano que incluye hígado, riñón, o corazón. En aún otra realización, el tejido de una fuente animal no humana es colágeno inyectable no inmunogénico; xenotrasplantes óseos; xenotrasplantes de tejidos blandos y xenotrasplantes de tejidos blandos de proteoglicano reducido; válvulas cardíacas de xenoinjertos; xenoinjertos de meniscos; y matrices tisulares, en los que los tejidos son tejidos deficientes en α 1,3-galactosa que se han modificado usando una α 3-galactosidasa. Los ejemplos de una α 3-galactosidasa incluyen, pero no se limitan a, ejemplos de cualquiera de SEC ID n.º: 2-9.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el análisis de HPTLC de actividad α -galactosidasa en el sobrenadante de cultivo de *Streptomyces griseoplanus* en medios ricos (véase la tabla II para las formulaciones) con el sustrato tetrasacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC. La fermentación se lleva a cabo durante 1 día en medios YM y durante 3 días en medios BP, a 30 °C, 220 rpm. Se llevaron a cabo 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 hora. Se tomó muestra de un μ l de cada reacción y se aplicó rápidamente en HPTLC. Designaciones: NE, sin control enzimático; Ctrl, reacción de control positivo usando la α -galactosidasa de grano de café; CS, sobrenadante del cultivo de *S. griseoplanus*; S, sustrato, es decir, tetrasacacárido B; B-tetra, tetrasacacárido B; H-tri, H-trisacárido; Origen: la posición en HPTLC donde se aplicaron las muestras. La placa de TLC se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (volumen/volumen/volumen: 60/35/8). La placa se exploró y se fotografió por Bio-Rad Fluor-S Multilmager con un software Quantity One-4.1.1.

La figura 2 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos de sobrenadantes de cultivo de *Streptomyces griseoplanus*, recuperados de cultivos cultivados en medios mínimos con 18 fuentes de carbono diferentes, con el sustrato de tetrasacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se llevaron a cabo 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 muestra de un μ l de cada reacción a 1 hora y se salpicó sobre placa de TLC. Las fuentes de carbono, indicadas por número 1-18 en la parte superior del panel, son 18 azúcares diferentes usados en la fermentación como se muestra en la tabla III. Designaciones: B-tetra: tetrasacacárido B, el sustrato; H-tri: trisacárido H, el producto del sustrato B-tetra por escisión con α -galactosidasa (los productos que se mueven deprisa por encima de H-tri indican la presencia de fucosidasa y β -galactosidasa en los sobrenadantes de cultivos que causan degradación adicional de trisacárido H en di- y monosacáridos). Fermentaciones: se descongelaron reservas criogenizadas de *Streptomyces griseoplanus* y se inocularon en YM (~1:5-10, v/v) y se incubaron a 30 °C, 220 rpm, durante 24 horas. El cultivo se hizo pasar sobre medios BP (~1:20, v/v) y la fermentación se continuó durante 72 horas. Los micelios, recogidos de 100 ml de cultivo BP por centrifugación, se lavaron 3 veces usando medios mínimos basales (los medios mínimos carecen de fuente de carbono y de aditivos de metales traza/vitaminas) para eliminar los medios ricos tanto como sea posible. El sedimento se resuspendió después en 100 ml de medios basales mínimos 2X con aditivos. La suspensión de micelios se alícuotó después en tubos cónicos de 50 ml a 2,5 ml/tubo. Las diferentes fuentes de carbono y agua se añadieron después a una concentración final del 0,5 % y a un volumen final de 5,5 ml. Cada fuente de carbono se puso a prueba por duplicado. Los 36 cultivos de 5,5 ml de cada una, con 18 diferentes fuentes de carbono diferentes se incubaron a 30 °C, 220 rpm. Se tomaron muestras alícuotas de 0,16 ml de cultivo de cada tubo a 43 y 71 horas.

La figura 3 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos enzimáticos del sobrenadante de cultivo de *Streptomyces griseoplanus* cultivado en medios mínimos bien con galactosa o bien con lactosa como la única fuente de carbono con el sustrato tetrasacacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC. Se llevaron a cabo 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 tomaron muestras de un μ l a partir de cada reacción a 20 minutos y se aplicaron sobre una placa de HPTLC para análisis. Designaciones: B-tetra: tetrasacacárido B, el sustrato; H-tri: trisacárido H, el producto del sustrato B-tetra por escisión con α -galactosidasa (los productos que se mueven deprisa por encima de H-tri indican la presencia de fucosidasa y β -galactosidasa en los sobrenadantes de cultivos que causan degradación adicional de H-trisacárido en di- y monosacáridos); fuente de carbono: n.º: 4, galactosa; n.º: 7, lactosa; NE, sin control enzimático; Ctrl, reacción de control positivo usando la α -galactosidasa de grano de café.

La figura 4 ilustra un análisis de HPTLC del ensayo enzimático de actividad de α -galactosidasa en la solución de proteínas después de pasar con sustrato de B-tetra columna CEX o columna DEAE. Aproximadamente 450 ml de sobrenadante de *Streptomyces griseoplanus*, cosechados a partir de 800 ml de cultivo en una fermentación de 1 litro de fermentador cultivados en medios mínimos con galactosa, se almacenaron congelados a -80 °C, se descongelaron durante 24 horas a 4 °C y se centrifugaron durante 30 minutos a 4 °C, 20.000 rpm. El sobrenadante recuperado se hizo pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 15 ml (CEX) (Macro-Prep High S Support,

BioRad, n.º de Cat. 156-0031), pre-equilibrada con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8). Se recogió el flujo dinámico que contenía la actividad de la enzima. La columna se lavó secuencialmente con 40 ml de tampón de equilibración, 40 ml del mismo tampón con un pH ligeramente incrementado (7,3). El flujo dinámico y los lavados se almacenaron y se cargaron directamente sobre una columna de DEAE de 2,5 ml (DEAE Sepharose, Sigma, n.º de Cat. DEF100) pre-equilibrada con tampón de equilibración de CEX y el flujo dinámico se recogió. La columna se lavó con 50 ml de tampón de equilibración CEX para eliminar la enzima residual de la columna. La solución de proteína almacenada de flujo dinámico de DEAE y lavado (600 ml) se concentró usando dispositivos de filtro Centricon Plus 80 Centrifugal (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 el análisis de HPTLC de actividad de α -galactosidasa en diversas fracciones de etapa de hidroxiapatita con sustrato de B-tetra. La muestra de proteínas en NaPO₄ 10 mM, pH 7,0, se cargó en una columna de hidroxiapatita de 2,5 ml (Bio-Gel HT Hydroxyapatite, Bio-Rad, n.º de Cat. 130-0150), pre-equilibrada con NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). La columna se lavó con tampón de equilibración y se lavó/eluyó etapa a etapa con cantidad creciente de NaPO₄ (10 a 100 mM). No se puede detectar ninguna actividad en el flujo dinámico, indicando la unión efectiva de la enzima a la columna en la presencia de NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). La aparición de actividad enzimática en lavado de NaPO₄ 30 mM y la casi completa carencia de actividad en lavado de NaPO₄ 100 mM indican elución simple de la enzima a partir de la columna de hidroxiapatita simplemente usando NaPO₄ 30-50 mM (pH 7,0). Designaciones: Pre, solución proteica antes de que se cargue sobre la columna; FT, flujo dinámico.

La figura 6 ilustra el resultado de análisis de HPTLC de actividad de α -galactosidasa en fracciones de etapa de Cibacron Blue 3GA con sustrato de B-tetra. Las fracciones de actividad almacenadas de etapa de hidroxiapatita se diluyeron 1:1 con H₂O y se aplicaron sobre una columna de Cibacron Blue de 2,5 ml (Cibacron Blue 3GA, Sigma, n.º de cat. C-1285), equilibrada con Tris 10 mM (pH 7,5). La columna se lavó con el tampón de equilibración y se lavó/se eluyó adicionalmente con tampón de equilibración con cantidad incrementada de sal según se indica al fondo del panel. La actividad enzimática se distribuyó entre lavados de NaCl 100 mM y de NaCl 400 mM. Designaciones: Pre, solución proteica antes de que se cargue sobre la columna; FT, flujo dinámico.

La figura 7 ilustra el análisis de HPTLC de actividad de α -galactosidasa en diversas fracciones de etapa de AEX con sustrato de B-tetra. La reserva de las fracciones de actividad enzimática de Cibacron Blue se concentraron y se sometieron a intercambio de tampón con Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5), a un volumen final de 3,7 ml. La solución de proteína se cargó en un 1 ml de columna AEX (Macro-Prep High Q Support, Bio-Rad n.º de Cat. 156-0051), pre-equilibrada con Tris 40 mM, NaCl 10 mM, pH 8,5. La columna se lavó en primer lugar con tampón de equilibración y después se lavó/eluyó con el mismo tampón conteniendo cantidad incrementada de sal según se indica el fondo del panel. Designaciones: Pre, solución de proteína antes de que se cargue en la columna; FT, flujo dinámico; Lavados/Eluidos, muestras de lavado o de elución de la columna; [NaCl] (mM), la concentración de sal en el tampón de lavado/elución; 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 causa degradación de trisacárido H a disacárido).

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

La figura 9 ilustra el análisis comparativo de fracciones cromatográficas S12 de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* parcialmente purificada por SDS-NuPAGE y ensayo de actividad enzimática usando tetrasacárido B, analizado por HPTLC. La α -galactosidasa de 70 kD teórica está indicada por una flecha en el lado derecho del panel usando marcador de peso molecular Rainbow (Amersham, n.º de Cat. RPN800). Designaciones: Ctrl, A-zima de NEB de concentración conocida; B-tetra, tetrasacárido B, el sustrato; H-tri, trisacárido H, el producto.

La figura 10 ilustra la alineación del péptido obtenido por secuenciación de Edman de digestión de tripsina fraccionada de HPLC de una α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* novedosa (SEC ID n.º: 1), con una proteína hipotética de *Streptomyces avermitilis* (n.º de acceso de GENBANK BAC74979.1, G 1:29610934, SEC ID n.º: 2). Los aminoácidos en SEC ID n.º: 2 que se corresponden con los de la SEC ID n.º: 1 están subrayados. La alineación se obtuvo por análisis de BLAST del péptido usando "búsqueda en corto, coincidencias casi exactas" frente a la base de datos NCBI nr [(Puntuación = 51,5 bits (114), Espera = 3e-06; Identities = 18/29 (82 %), Lucas = 24/29 (82 %), Huecos = 0/29 (0 %)]. La secuencia de aminoácidos se muestra en un código de letras individuales. Los residuos idénticos se indican por letras mayúsculas en negrita, residuos similares se indican por letras normales y residuos diferentes se indican por letras minúsculas.

La figura 11 ilustra un análisis de los ensayos enzimáticos de HPTLC del lisado del sobrenadante y del sedimento del cultivo de *Streptomyces avermitilis* cultivados en medios YM (véase la tabla II para formulaciones) con sustratos de tetrasacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC y de α -D-galactopiranosido (α -Gal pNP). La fermentación se llevó a cabo durante 3 días a 30 °C, 220 rpm. Se llevaron a cabo 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 toda una noche. Se tomó muestra de un μ l de cada reacción y se aplicó rápidamente en HPTLC. Designaciones: NE, sin control enzimático; Ctrl, reacción de control positivo usando α -galactosidasa de grano de café; CS, sobrenadante de cultivo de *S. avermitilis*, PT, lisado de precipitado; B-tetra, B tetrasacárido, H-tri, trisacárido H; MU, 4-metilumbeliferona, el producto de escisión de α -Gal pNP; Origen: la posición en HPTLC donde se aplicaron las muestras. La placa de TLC se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (volumen/volumen/volumen: 60/35/8). La placa se exploró y se fotografió por Bio-Rad Fluor-S Multilmager con un software Quantity One-4.1.1.

La figura 12 ilustra la alineación de secuencia de proteínas de la α -galactosidasa novedosa teórica de *Streptomyces avermitilis* (SEC ID n.º: 2) con un número de serie de impactos de la primera proteína de funciones desconocidas sometiendo a BLAST la SEC ID n.º: 2 frente a bases de datos de NCBI nr. Se llevó a cabo el alineamiento usando alineamiento múltiple de CLUSTALW (NPS@: Network Protein Sequence Analysis, TIBS 2000: 25; 147-150, Combet C., C. Blanchet, C. y Geourjon Deléage G.). Datos de alineación: Longitud de alineación: 665; Identidad (*): 59 es 8,87 %; Fuertemente similar (:): 86 es 12,93 %; Débilmente similar (.): 42 es 6,32 %; Diferentes: 478 es 71,88 %. Las secuencias son como sigue: SA (625 residuos SEC ID n.º: 2); BT α (568 residuos SEC ID n.º: 3); BF α 1 (605 residuos SEC ID n.º: 4); BF α 2 (605 residuos SEC ID n.º: 5); BF β 1 (595 residuos SEC ID n.º: 6); BF β 2 (595 residuos SEC ID n.º: 7); BT β 615 residuos SEC ID n.º: 8). SEC ID n.º: 9 es una secuencia consenso de las secuencias SEC ID n.ºs: 2-8. Designaciones: SA, BT y BF, las α -galactosidasas teóricas 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 diferentes *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 de *Streptomyces avermitilis*), con el sustrato tetrasacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC. Un ml de medio TB con antibióticos (48,2 g de Caldo EZmix Terrific, Sigma T-91790, 8 ml de glicerol, 34 mg de cloranfenicol y 30 mg de kanamicina por litro de medio) se añadió a cada 1,5 ml de microtubo conteniendo la clavija de agar que lleva una colonia individual. La tapa se cerró y la incubación se llevó a cabo durante toda una noche a 37 °C, 250 rpm. Medio ml de un cultivo durante toda una noche se inoculó en un tubo cónico de 50 ml y la inoculación se llevó a cabo en las mismas condiciones. La densidad celular alcanzó D.O a 600 nm de 0,3-0,6 en aproximadamente 2 horas a 220 rpm. El cultivo se retiró del agitador y se mantuvo a temperatura ambiente durante ~ 20 minutos. Mientras tanto, la temperatura de la incubadora se bajó a ~ 26 °C. Se añadió después IPTG a cada cultivo a una concentración de 0,1 mM y todos los cultivos se re-situaron en el agitador y se agitaron a 220 rpm, para comenzar la inducción de proteínas. Se retiró una alícuota de 0,5 ml asépticamente de cada tubo en 1 hora y las células se sedimentaron con una centrifuga de mesa a su ajuste más alto durante 5 minutos. Se añadieron veinte μ l 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 benzonasa, 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 arriba y abajo unas pocas veces. La lisis se completó durante 5-10 minutos. Una parte alícuota (2,2 μ l) del lisado total en bruto se analizó subsiguientemente mezclando con igual volumen de una solución de sustrato conteniendo 0,1 mM de B-tetra en NaPO₄ 100 mM (pH 6,8) y se incubó a temperatura ambiente. Un μ l de la digestión se retiró en 10 minutos y se salpicó sobre una placa de HPTLC. Designaciones: Ctrl, reacción de control positivo usando la α -galactosidasa de grano de café; 1 y 2: los lisados completos de dos colonias individuales de la misma construcción que expresan la galactosidasa novedosa de longitud total de *Streptomyces avermitilis*; B-tetra, tetrasacárido B; H-tri, trisacárido H; Origen: la posición en HPTLC donde se aplicaron las muestras. La placa de TLC se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (volumen/volumen/volumen: 60/35/8). La placa se exploró y se fotografió por un Bio-Rad Fluor-S Multilmager con software Quantity One -4.1.1. La figura 14 confirmó que la B-zima novedosa se puede expresar eficientemente en *E. coli*, pero como cuerpos de inclusión. Por lo tanto, la expresión necesita optimizarse o un procedimiento de replegamiento eficiente necesita desarrollarse para la aplicación de esta B-zima novedosa.

La figura 14 ilustra un análisis SDS-NuPAGE de α -galactosidasa (SEC ID n.º: 2) expresado en *E. coli* (gel de Bis-Tris al 4-12 % Novex con tampón MOPS, teñido con kit de tinción de Azul Coloidal, Estándar no Teñido Mark12, todos productos de Invitrogen). El lisado de cada cultivo se preparó de forma similar como se describe en la leyenda de la figura 13 con una escala incrementada. Una alícuota de cada lisado completo se centrifugó a 14000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó. Doce μ l de lisado o sobrenadante completo se mezcló con 4 μ l de tampón LDS 4X, β -mecaptoetanol suplementado al 10 % (v/v). El sedimento se suspendió en tampón de muestra LDS 1X, suplementado con β -mecaptoetanol al 2,5 % (v/v), a una proporción de 16 μ l de tampón de muestra/12 μ l de lisado completo. Todas las muestras se calentaron a 70 °C durante 10 minutos para 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.

5 La figura 15 ilustra alineación de secuencia de proteínas ClustaW Múltiple (BoxShade 3.21) de la familia de α -galactosidasa novedosa para identificar las regiones conservadas para el diseño de cebadores degenerados. Los restos idénticos y las sustituciones conservadas se destacan en negro y gris oscuro. Las secuencias alineadas son de *S. avermitilis* MA-4680, *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 y *B. fragilis* NCTC 9343. Las dos secuencias de *B. fragilis* YCH624, casi idénticas a aquellas de *B. fragilis* NCTC 9343, no están incluidas. Las regiones conservadas usadas para diseñar un par de cebadores degenerados para clonar el gen de α -galactosidasa parcial de *S. griseoplanus* 2357 están indicadas con una flecha hacia delante para cebador directo y con una flecha hacia atrás para cebador inverso.

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

15 La figura 17 ilustra un análisis de HPTLC de ensayos de enzima de FragB α -galactosidasa recombinante purificada con un panel de oligosacáridos de diversas estructuras. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con 10 nmoles de sustrato y 21 ng de enzima en 10 μ l de NaPO_4 10 mM, pH 6,8/ NaCl 2,5 mM, suplementado con 0,25 mg/ml de BSA. Un μ l de los ensayos enzimáticos se retiró en los puntos temporales deseados y se salpicó sobre una placa de TLC revestida de gel de sílice (EMD Chemicals, NJ), que se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (vol./vol./vol.: 30/60/10) durante 15 minutos y los desarrollos de producto se detectaron por tinción de Orcinol/ H_2SO_4 .
20 Designaciones: Tiempo de reacción para cada sustrato de izquierda a derecha: 0 (muestra tomada de la reacción control no conteniendo ninguna enzima), 5, 10, 20, 40 y 80 minutos. Las estructuras detalladas de los sustratos se describen en la tabla V. La escisión del sustrato dio como resultado migración incrementada como se observa para B-tri, B-di y B lineal, pero no para P_1 , P^k y A-tri, indicando la falta de escisiones.

25 La figura 18 ilustra un análisis de HPTLC de análisis enzimático de B-zima de FragB recombinante purificado con AMC-B-tetra a pH diferente. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con 1 nmol de sustrato y ~ 8 ng de enzima en 10 μ l de tampón a pH 2,0 a 9,0, suplementado con 0,25 mg/ml de BSA. Un μ l de los ensayos enzimáticos se retiró en los puntos temporales deseados y se salpicó sobre una placa de HPTLC, que se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (vol./vol./vol.: 60/35/8). La placa se exploró y se fotografió por Bio-Rad Fluor-S Multilmager con un software Quantity One-4.1.1. Los tampones 1 X usados en las reacciones se derivaron de tampones 2 X descritos 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, Na_2HPO_4 0,2 M/ NaH_2PO_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 donde se aplicaron las muestras.

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

40 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 a ~ 1,0 mM en 10 μ l de NaPO_4 10 mM, pH 6,8, NaCl 2,5 mM, suplementado con 0,25 mg/ml de BSA. Las reacciones sometieron a seguimiento por TLC durante incubación a 26 °C y se muestra el punto temporal de 2 horas. Las escisiones del trisacárido de grupo sanguíneo B ramificado (B-tri) al disacárido de H (H-di) por α -galactosidasa de BFa2 (FragA) y de todas las estructuras de B por α -galactosidasa de BFR1 (FragB), se completaron en 20 minutos (no mostrado), mientras que no se detectó ninguna escisión de otros sustratos oligosacáridicos después de 2 horas de incubación. Las placas de TLC se desarrollaron 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

55 Esta invención se refiere al desarrollo y aplicación de una estrategia de rastreo y selección para α -galactosidasas novedosas con especificidades preferidas para las estructuras de grupo sanguíneo B y con realización preferida en la conversión enzimática de los productos de sangre y tejidos animales, a lo largo de un intervalo de pH aproximadamente neutro. La tabla 1 enumera las estructuras complejas de antígenos halladas en las células sanguíneas.

60 Para el propósito de esta invención, los derivados de oligosacárido activo de grupo B se sintetizaron o produjeron por retirada enzimática de α Gal desde distintos sustratos. Adicionalmente, los glucoesfingolípidos con estructuras 3, 6, 21 y 25 se purificaron a partir de eritrocitos humanos o se produjeron de los mismos por tratamientos de glucosidasa como se describe previamente (Clausen y *cols.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82 (4): 1199-203, 1985, Clausen y *cols.*, J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen y *cols.*, Biochemistry 25 (22): 7075-85, 1986, Clausen y *cols.*, J Biol Chem.

262(29): 14228-34, 1987). Se desarrollaron ensayos de cromatografía en capa fina para determinar cuantitativamente la retirada de α Gal o α GalNAc de los derivados de AMC o glucoesfingolípidos.

Las α -galactosidasas preferidas tienen especificidad de sustrato alta para estructuras de sacáridos ramificadas de grupo sanguíneo B, un pH óptimo generalmente neutro y se pueden producir de forma rentable como proteínas recombinantes en organismos unicelulares tales como bacterias y levadura. La solicitud de patente anterior de los autores de la presente invención (documento U.S.S.N. 10/251271), desarrolló un ensayo de rastreo para las actividades enzimáticas preferidas usando sustratos derivados de AMC de tetrasacárido B y midió actividades enzimáticas a pH neutro. Adicionalmente, se compararon actividades con actividades usando derivados monosacáridicos de p-nitrofenilo para identificar actividades con preferencia o exclusividad por los sustratos complejos, en esa solicitud, los autores de la presente invención revelan el uso de este ensayo de rastreo en un panel grande de aislados bacterianos y fúngicos (3100) y en ella los autores de la presente invención identificaron varios aislados bacterianos que expresan actividades α -Ngalactosaminidasa o α -galactosidasa medidas con sustratos de AMC de tetrasacárido A o B, pero ningún nivel o niveles insignificantes de actividad con los sustratos de monosacáridos correspondientes. Una de cada de estas actividades se analizó adicionalmente después de serotipar y genotipar estos aislados en forma de cepas de *Streptomyces*. El análisis de la cepa n.º: 8 que se determinó para tener actividad α -N-acetilgalactosaminidasa reveló que la actividad era insoluble y estaba asociada con la masa celular. La cepa n.º: 8 se depositó el 14 de febrero de 2002 con la American Type Culture Collection (ATCC) y se le hubo asignado el número de depósito de ATCC PTA-4076. En contraste, la cepa n.º: 2357 se determinó que tenía actividad α -galactosidasa y la actividad se determinó que era soluble, encontrada en el sobrenadante de células transformadas lisadas por prensa francesa. La cepa n.º: 2357 se depositó el 14 de febrero de 2002 con la American Type Culture Collection y se le asignó el n.º de Depósito de ATCC PTA-4077. Debido a que es en gran parte más simple purificar una proteína soluble, los autores de la presente invención eligen purificar y secuenciar inicialmente la proteína a partir de la cepa n.º: 2357.

La enzima que los autores de la presente invención encontraron en la fracción soluble de la cepa n.º: 2357 se purificó parcialmente. El análisis detallado de la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa purificada parcialmente demostró una especificidad buena sin precedentes por las estructuras de grupo sanguíneo de cadena B ramificadas, pero no se escindió ninguna estructura lineal provista de caperuza por residuos de α 1,3 o α 1,4 galactosa por esta enzima. El análisis de su pH óptimo mostró que las condiciones preferidas son pH 5,5 a 7,0. La actividad α -galactosidasa identificada se prefiere altamente por lo tanto por encima de enzimas conocidas en la técnica anterior debido a su especificidad de sustrato restringida, su alta actividad específica para estructuras de grupo y su pH óptimo. El análisis por SDS-PAGE del extracto en bruto parcialmente purificado resultante reveló 3-4 bandas de proteína en la región de 40-80 kDa que tienen la actividad de α -galactosidasa. El análisis de filtración de gel de la preparación mostró la actividad migrada comparable con 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 (SEC ID n.º: 1).

Después de estos estudios y como se describe en la presente invención, hemos descubierto una nueva familia de polipéptidos, que tienen actividades α -galactosidasa y han desarrollado procedimientos para su inducción, purificación, secuenciación y clonación. Como se discute más adelante, la familia polipeptídica es distinta de la proteína purificada parcialmente previamente de la cepa n.º: 2357 y notablemente estos miembros de la familia no contienen la secuencia mostrada como SEC ID n.º: 1. La nueva estrategia de inducción implica crecimiento de la bacteria apropiada en fuentes de carbono definidas y medio mínimo, lo que da como resultado un incremento significativo en producción de los polipéptidos de α -galactosidasa. Los α -galactósidos conocidos (que generalmente tienen un pH óptimo ácido y especificidad de sustrato por Gal α -pNP u otros monosacáridos simples) no se segregan en *S. griseoplanus* y en cepas de *Streptomyces* relacionadas en las mismas condiciones de cultivo que producen estos polipéptidos novedosos.

La presente invención proporciona por lo tanto un procedimiento novedoso para la expresión recombinante y la purificación de ciertos polipéptidos α -galactósidos. Esta estrategia de purificación aplicada en combinación con los procedimientos de cultivo e inducción novedosos dio como resultado purificación exitosa a homogeneidad aparente de los polipéptidos de α -galactosidasa en cantidades suficientes para la secuenciación de aminoácidos y conversiones tisulares y de producto sanguíneo.

Las siguientes etapas sucesivas se usaron para lograr purificación a homogeneidad aparente: sobrenadante de caldo celular derivado de cultivos de *S. griseoplanus* n.º: 2357 se hizo pasar primero no unido exitosamente a través de columnas CEX y DEAE (figura 4). Subsiguientemente la actividad se une y se eluye sucesivamente en una columna de hidroxapatita (figura 5), una columna Cibacron Blue (figura 6) y finalmente una columna AEX (figuras 7 y 8). Por todo el esquema de purificación la proteína se siguió por un análisis de su actividad enzimática en diversas fracciones; el producto de proteína final se analizó también por SDS-NuPAGE. Se obtuvo identificación de la proteína α -galactosidasa por comparación del patrón de bandas de proteínas por tinción de plata de SDS-NuPAGE y por cromatografías de filtración de gel de AEX y de S12 (figuras: 8-9). Solamente una banda que migra como 70 kD por SDS-NuPAGE y por filtración de gel de S12, correspondió con la actividad α -galactosidasa observada. La proteína identificada según se describe, se separó finalmente por electroforesis en gel NuPAGE y se cortó la banda de 70 kD

teñida por Coomassie del gel y se sometió a análisis de secuencia de aminoácidos. Se obtuvo información de secuencia de aminoácidos interna por análisis espectrométrico de masas (MALDI-TOF) y degradación de Edman después de digestión con tripsina. Ninguna de las secuencias cortas obtenidas mostró un alto grado de identidad con secuencias conocidas en bases de datos públicas (GenBank). Una búsqueda de bases de datos de Blast de un péptido de 30 aminoácidos (la secuencia de péptidos más larga obtenida por secuenciación interna y confirmada por EM/EM, usando "Búsqueda en corto, coincidencias casi exactas") identificó una fase de lectura abierta teórica predicha para codificar una proteína (SEC ID n.º: 2) a partir de la secuencia del genoma *Streptomyces avermitilis* (n.º de acceso de Genbank: BAC74979.1, Gl.: 29610934). El genoma completo de *Streptomyces griseoplanus* no está disponible y ninguna secuencia relacionada derivada de este género se identificó en búsquedas de bases de datos. *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces griseoplanus* están estrechamente relacionados. Los autores de la presente invención pusieron a prueba por lo tanto si *Streptomyces avermitilis* contenía también la actividad α -galactosidasa identificada, que previamente se demostró que es muy rara entre aislados bacterianos incluyendo muchos aislados de *Streptomyces*.

El sobrenadante de cultivo de *Streptomyces avermitilis* (ATCC 31267) se sometió a ensayo para la α -galactosidasa segregada y como se muestra en la figura 11, se observó evidencia clara de la presencia de actividades α -galactosidasa tanto en sobrenadante de cultivo como en lisado de sedimento, según se determinó por digestión de sustratos oligosacáridicos B-tetra. Sin embargo, la escisión de un sustrato simple (α -Gal pNP) por la α -galactosidasa de *Streptomyces avermitilis* segregada fue insignificante. En contraste, la escisión completa de α -Gal pNP se observó para la α -galactosidasa de *Streptomyces avermitilis* obtenida a partir de la fracción celular. Por lo tanto, las α -galactosidasas segregadas y celulares no son probablemente de las mismas identidades. Parte de la galactosidasa segregada es probable que sea la α -galactosidasa novedosa que prefiere sustrato ramificado a sustratos simples (lineales), mientras que la mayoría de las actividades de α -galactosidasa celular si no todas se observa que tienen actividades glucosidasa convencionales. Las similitudes del polipéptido de *S. avermitilis* (SEC ID n.º: 2) a la α -galactosidasa de *S. griseoplanus* con respecto a la secreción en caldo de cultivo, peso molecular predicho y las similitudes de secuencia con *S. griseoplanus*, indica que la proteína de *S. avermitilis* representa un homólogo de la α -galactosidasa derivada de *S. griseoplanus* identificada originalmente.

El polipéptido identificado a partir de *S. avermitilis* (SEC ID n.º: 2) consiste en 625 aminoácidos y no mostró ninguna similitud significativa con cualesquiera otras proteínas conocidas. Búsquedas de nuevo con la SEC ID n.º: 2 identificaron varias secuencias de proteínas novedosas (SEC ID n.º: 3-8) a partir exclusivamente de genomas procariontes, con similitudes de secuencia mostradas como sigue en la tabla 1A:

Tabla 1A:

Identidad (en % general) de α -galactosidasa de *Bacteroides* frente a la enzima de *S. avermitilis*.

SEC ID n.º	GI n.º	Abreviat	Aminoácidos	Identidad a secuencia de <i>S. avermitilis</i> (%)
2	gi 29833810 ref NP_828444.11 <i>S. avermitilis</i>	SA	625	100
3	gi 29340474 gb AA078266.11 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	BT α	568	30,35
4	gi 53715733 ref YP_101725.11 <i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	BF α 1	605	30,23
5	gi 60495103 emb CAH09922.11 <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	BF α 2	605	29,30
6	gi 60491830 emb CAH06588.11 <i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	BF β 1	595	24,30
7	gi 53712216 ref YP_098208.11 <i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	BF β 2	595	24,30
8	gi 29341569 gb AA079356.11 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	BT β	615	22,82

Todos los polipéptidos identificados se analizaron por alineamientos de secuencias múltiples como se muestra en la figura 12; se proporciona una secuencia consenso como SEC ID n.º: 9. Estos polipéptidos representan una familia nueva de α -galactosidasas novedosas, que tienen especificidad de sustrato única descrita en más detalle más adelante y que tienen la característica común de un pH óptimo aproximadamente neutro.

Las secuencias génicas de estos miembros de esta familia de α -galactosidasas han permitido desarrollo de sistemas de expresión recombinante para estos polipéptidos, usando una diversidad de células procariotas y eucariotas y de sistemas de expresión procariotas y eucariotas, y permiten purificación de formas recombinantes de estas enzimas usando procedimientos de purificación establecidos (por ejemplo sistemas de expresión de marca His y sistemas de purificación).

Ejemplos

Ensayos enzimáticos:

Los sustratos constituidos por una serie de estructuras oligosacáridicas de grupos sanguíneos ABH complejas, tales como derivados de 7-amino-4-metil-cumarina se sintetizaron a medida por Alberta Chemical Research Council (véase, documento U.S.S.N. 10/251271). Otros sustratos estaban disponibles a partir de los diferentes proveedores (Sigma-Aldrich). Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica o mayor. Se llevaron a cabo estudios enzimáticos estándar como sigue con los diferentes sustratos. Se llevaron a cabo ensayos típicos por el siguiente procedimiento: Se incubaron muestras proteicas con oligosacárido marcado con AMC a concentración 0,05 mM, con monosacárido marcado con MU a concentración 2,5 mM, en 2.2-10 μ l de reacción en NaPO_4 50 mM (pH 6,8) durante el tiempo deseado a 26 °C o a temperatura ambiente. Se tomó alícuota de un μ l a diversos puntos temporales y se salpicó sobre HPTLC siguiendo el desarrollo de productos. La placa de TLC se desarrolló en cloroformo-metanol-agua (volumen/volumen/volumen: 60/35/8). La placa se exploró y se fotografió por Bio-Rad Fluor-S Multilmager con un software Quantity One-4.1.1. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para escindir 1 μ mol de sustrato por minuto en las condiciones experimentales.

Fermentaciones:

Las formulaciones de diversos medios se enumeran en la Tabla II. Fermentaciones en matraz y tubos cónicos de 50 ml se llevaron a cabo en condiciones convencionales: 30 °C, 220 rpm durante el periodo de tiempo deseado. La fermentación se llevó a cabo a pH 6,8, 30 °C, 300-600 rpm, O.D. = 50 %.

Tabla II

Formulaciones de medios¹ para cultivar *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_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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 a 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
Suplemento de mineral traza (ATCC n.º de Cat. MD-TMS) ²	10 ml
Suplemento de vitaminas (ATCC n.º de Cat. MD-TMS) ²	10 ml

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

2. Los componentes se esterilizaron por filtración de 0,22 µm y se añadieron a la receta deseada después de la esterilización.

Ejemplo 1: inducción de expresión en α-galactosidasa en *Streptomyces griseoplanus*

5 *S. griseoplanus* se mostró en el pasado que era capaz de producir una α-galactosidasa novedosa segregada cuando se cultivó en medios apropiados, aunque esta enzima nunca se purificó hasta homogeneidad. Una reserva criogenizada de este microorganismo se inoculó en 5 a 10 volúmenes de medios YM y se cultivó durante 24 horas a 30 °C, 200 rpm, en matraces en agitación o en tubos cónicos de 50 ml en agitación dependiendo de la escala del cultivo. El cultivo de YM se inoculó después en aproximadamente 20 volúmenes de medios BP continuando incubación en las mismas condiciones, induciendo producción de la galactosidasa. La actividad enzimática asociada con el cultivo usualmente presenta su pico en tres días. El sobrenadante de cultivo que contiene la actividad enzimática se recogió por centrifugación. La figura 1 muestra un análisis de HPTLC del ensayo enzimático de un sobrenadante de medios de cultivo gastados típicos 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 se segregó en el medio (aproximadamente -0,1 U/l de cultivo según se analizó por el ensayo enzimático de B-tetra descrito en procedimientos generales). Por lo tanto, era grandemente imposible aislar suficiente cantidad de proteína pura para la secuenciación (véase, documento U.S.S.N. 10/251271). El nivel de expresión bajo de la proteína deseada, la heterogeneidad y la riqueza proteica de los medios ricos se consideró que representaban los factores principales dificultando purificar actividad suficiente para identificación de proteínas.

20 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 mayor. Una aproximación fue usar una fuente de carbono alternativa en lugar de glucosa. Otra aproximación fue reducir la complejidad de los medios usando medios homogéneos con materiales orgánicos pequeños en particular el contenido en proteínas, *es decir*, el medio mínimo. El aislamiento de la actividad enzimática de tales medios se espera que sea más fácil y se espera que los rendimientos de enzima en cada etapa se incrementen.

30 Considerando que el crecimiento del microorganismo en medios mínimos es muy lento y considerando la sensibilidad de producción de α-galactosidasa a la composición de medios de crecimiento, *S. griseoplanus* estuvo en primer lugar en medios ricos tras el protocolo estándar, *es decir*, 24 horas en YM, 72 horas en BP. Los micelios se recogieron después del cultivo por centrifugación. Los micelios sedimentados se lavaron intensamente con medios mínimos basales (los medios mínimos carecen de fuente de carbono y aditivos) eliminando los medios ricos residuales tanto como sea posible. El sedimento de micelios se resuspendió en medios mínimos carentes de una fuente de carbono, que pueden distribuirse fácilmente rastreando fuentes de carbono como se detalla en la figura 2. Los cultivos de tubos a pequeña escala se llevaron a cabo en condición de fermentación estándar. Se tomaron muestras alícuotas pequeñas en diferentes puntos temporales y se recuperaron los sobrenadantes para análisis de α-galactosidasa. Se estudiaron

un total de 18 fuentes de carbono como se muestra en la Tabla III. Se muestran análisis de los ensayos enzimáticos de HPTLC de sobrenadantes de cultivos con B-tetra en la figura 2. La desaparición completa de los sustratos usando sobrenadantes de fermentación de 70 horas en carril 4 y 7 distinguieron claramente galactosa y lactosa de otras fuentes de carbono en su capacidad produciendo la α -galactosidasa. En la condición del ensayo actual, 25 pmol de sustrato/ μ l de muestra proteica, NaPO₄ 50 mM (pH 6,8), 1 h a temperatura ambiente, el rendimiento volumétrico de la actividad α -galactosidasa puede calcularse como sigue:

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

- 10 El rendimiento es mucho más grande que un rendimiento típico obtenido de cultivo de medios ricos (-0,1 U/l). Además, el rendimiento está probablemente subestimado dado que carece de punto temporal antes de 1 hora puede haberse perdido en punto final de la reacción. El resultado preliminar muestra gran potencial de usar medios mínimos facilitando producción y purificación de α -galactosidasa.
- 15 Para confirmar la observación remarcable usando medios mínimos, los autores de la presente invención reevaluaron la fuente de carbono líder galactosa y lactosa para una 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 temporales en medios mínimos por galactosa y lactosa como fuentes de carbón. Aproximadamente el 90 % del sustrato se escindió por muestras de cultivo de 3 días, que traducen aproximadamente 4 U/l de sobrenadante de cultivo. Por lo tanto, como se muestra en la figura 3, galactosa (carril n.º: 4) y sorprendentemente lactosa (carril n.º: 7) inducen actividad α -galactosidasa significativa. Después las condiciones para el crecimiento e inducción usando galactosa identificada anteriormente se usaron sin optimización adicional desarrollando fermentaciones a gran escala de la cepa de *Streptomyces* n.º: 2357 para el aislamiento de la enzima. Como será evidente a partir de los siguientes ejemplos estas condiciones eran esenciales para el aislamiento exitoso y la identificación exitosa de la proteína α -galactosidasa resultante, que fue diferente de la enzima descrita originalmente por el documento U.S.S.N. 10/251271. Tabla III.
- 25 Fuentes de carbón usadas rastreando inducción de α -galactosidasa novedosas 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(+) Monohidrato de lactosa
8	Extracto de malta
9	D(+) Monohidrato de maltosa
10	D-manitol
11	D(+) Manosa
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 cepa de *Streptomyces griseoplanus* n.º: 2357

Una nueva estrategia de purificación se desarrolló para la enzima novedosa, ya que el material de partida era sustancialmente diferente que aquel usado para la purificación parcial descrita previamente (véase, documento U.S.S.N. 10/251271). Se usaron las siguientes etapas lograr la purificación hasta homogeneidad patente: sobrenadante de caldo celular (450 ml), derivado de 800 ml de cultivo llevado a cabo en un fermentador de 1 l según se describe en el ejemplo 1, se sometió a 30 minutos de centrifugación a alta velocidad a 20000 rpm, 4 °C. El sobrenadante se aplica a una columna CEX de 15 ml (soporte Macro-Prep High S, BioRad, n.º de Cat. 156-0031), pre-equilibrada con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8) y se lavó con 40 ml de tampón de equilibración y PO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 7,3), respectivamente. El flujo dinámico y los dos lavados que contienen la actividad α -galactosidasa se almacenaron (figura 4, panel A) y se aplican sobre una segunda columna de 2,5 ml de DEAE (DEAE Sefarosa, Sigma, n.º de Cat. DEF100) pre-equilibrada con NaPO₄ 40 mM, NaCl 10 mM (pH 6,8). La columna se lavó después con 50 ml de tampón de equilibración. Se recogieron un total de 600 ml que contenían la actividad α -galactosidasa del flujo dinámico y el lavado (figura 4, panel B). Se almacenaron, se concentraron con dispositivo de filtro de Centricon Plus 80 Centrifugal (n.º de Cat. de Millipore UFC5LGC02) y se intercambió el tampón a NaPO₄ 10 mM (pH 7,0) en el mismo dispositivo hasta un volumen final de 23 ml.

La muestra de tampón intercambiado de 23 ml se aplicó a una columna de hidroxapatita de 2,5 ml (BioRad, n.º de Cat. 103-0150) pre-equilibrada con NaPO₄ 10 mM (pH 7,0). La columna se lavó con 5 ml de tampón de equilibración y se eluyó la actividad α -galactosidasa etapa a etapa con un tampón de gradiente de NaPO₄ (10 mM/etapa) a partir de 20 a 100 mM (pH 7,0). La actividad de α -galactosidasa eluyó en fracciones con NaPO₄ 30-50 mM (figura 5). Las fracciones activas se almacenaron y diluyeron 1:1 con H₂O y se aplicaron a una columna Cibacron Blue de 2,5 ml (Sigma, n.º de Cat. C-1285) pre-equilibrada con Tris 10 mM (pH 7,5). La columna se lavó con 10 ml de Tris 10 mM (pH 7,5) y 5 ml de Tris 10 mM, NaCl 80 mM (pH 7,5). La actividad α -galactosidasa se eluyó con 25 ml de tampón de elución conteniendo Tris 10 mM (pH 7,5) con una cantidad incrementada de sal (figura 6). El eluato de enzima se concentró y se sometió a intercambio de tampón en Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5) con dispositivos de filtro de centrifuga Centricon YM10 (n.º de Cat. de Millipore 4205) hasta un volumen final de 3,7 ml. Finalmente, el eluato sometido a intercambio de tampón se aplicó a columna de AEX de 1 ml (BioRad, n.º de Cat. 156-0031), pre-equilibrada con Tris 40 mM, NaCl 10 mM (pH 8,5). La columna se lavó con 5 ml de tampón de equilibración y la actividad α -galactosidasa se eluyó con un gradiente de NaCl en Tris 40 mM (figura 7).

Los análisis de las fracciones de eluato de la columna de AEX se llevaron a cabo por SDS-NuPAGE y una banda individual con un peso molecular aparente de 70 kD se observó después de tinción con plata (SilverQuest, Invitrogen, n.º de Cat. LC6070) (figura 8). La verificación posterior de la identidad de la α -galactosidasa aislada se proporcionó por cromatografía de filtración de gel. Se equilibró una columna de S12 (Superose 12™, Amersham, n.º de Cat. 17-5173-01) y se puso en funcionamiento con acetato de amonio 150 nM. Se aplicó la α -galactosidasa parcialmente purificada como se describe anteriormente (volumen de 250 μ l) y se recogieron 45 fracciones (0,5 ml/fracción en caudal de 1 ml/minuto) (figura 9). Las fracciones n.ºs 19-21 contenían el pico de proteína principal (UV 280 nm). Se analizaron las fracciones 19-22 de α -galactosidasa con AMC B-tetra y 10 μ l de cada una se analizaron por un gradiente de SDS-NuPAGE al 4-12 % usando 10 y 20 ng de NEB A-zima como controles (carril 2 y 3). Como se muestra en la figura 9 el pico α -galactosidasa correlaciona plenamente con la banda de 70 kD por SDS-PAGE.

Ejemplo 3: secuenciación de aminoácidos de α -galactosidasa purificada a partir de cepa de *Streptomyces griseoplanus* n.º: 2357

Aproximadamente 1 ng de proteína α -galactosidasa como se estima por NuPAGE se preparó como se describe en el ejemplo 2. La proteína se separó por NuPAGE al 4-12 % y se tiñó con Kit de Tinción de Azul Coloidal (Invitrogen, n.º de Cat. LC6025). Después de desteñir el gel con H₂O, las bandas de 70 kD teñidas se escindieron y lavaron con H₂O de calidad HPLC y acetonitrilo al 50 % en H₂O. El gel de sílice se sometió a análisis de secuencia directa en la Instalación de Microquímica de Harvard, Universidad de Harvard. Brevemente, las láminas de gel se redujeron con DTT y se alquilaron con yodoacetamida y después se digirieron con tripsina en tampón de bicarbonato de amonio 25 mM. La digestión con tripsina se analizó por espectrometría de masas en tándem de nanoelectropulverización de HPLC en fase reversa microcapilarmente (μ LC/EM/EM) en un espectrómetro de masas de trampa iónica cuadrupolar LCQ DECA XP Plus de Finnigan. La secuenciación preliminar de péptidos se facilitaron por correlación de la base de datos con el algoritmo SEQUEST. Las secuencias peptídicas de EM/EM se revisaron después por consenso con proteínas conocidas y los resultados se confirmaron manualmente para fidelidad. Ninguna de las secuencias de NCBI nr o bases de datos est correlacionó con estos datos.

Varios intentos para obtener la secuencia N-terminal de la proteína no digerida habían fallado en generar cualquier información de secuencia, sugiriendo que se bloqueó el extremo N-terminal. A fin de obtener la información de secuencia interna de los péptidos a partir de la digestión con tripsina de las láminas de gel NuPAGE conteniendo ~ 5 μ g de la proteína deseada se fraccionaron mediante HPLC en una columna C18 de 0,3 x 150 mm. Se monitorizaron tres longitudes de onda; 205 nm (por enlaces de amida), 277 nm y 292 nm (para aminoácidos aromáticos Trp y Tyr) por medio de un detector de red de diodos. Unas pocos de los mejores picos/fracciones se rastrearon por MALDI

seleccionando picos por secuenciación de Edman. Las búsquedas de bases de datos de Blast usando "búsqueda en corto, coincidencias casi exactas" frente a la base de datos de NCBI no identificaron secuencia idéntica alguna con cualquiera de las secuencias peptídicas obtenidas. Sin embargo, la búsqueda usando secuencia peptídica de 30 aminoácidos mostrada como SEC ID n.º: 12, la secuencia peptídica más larga secuenciada y confirmada por EM/EM, identificó una proteína teórica candidata (SEC ID n.º: 2) predicha a partir de la secuencia del genoma de *Streptomyces avermitilis* (n.º de acceso de Genbank BAC74979.1, GI: 29610934) que muestra similitud de secuencia débil con SEC ID n.º: 12, la secuencia peptídica de *Streptomyces griseoplanus* obtenida (ilustrada en la figura 10).

SEC ID n.º: 12: TVIDVTDFGADPSGKADSAAVSAAMAHAK

El genoma de *Streptomyces griseoplanus* no está disponible y no se han identificado secuencias relacionadas en búsquedas en bases de datos. Notablemente, esta secuencia no está compartida por la α -galactosidasa descrita en nuestra revelación anterior (y en el presente documento como SEC ID n.º: 1). *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces griseoplanus* están estrechamente relacionados. Por lo tanto los autores de la presente invención deberían analizar si *Streptomyces avermitilis* también contiene la α -galactosidasa novedosa, dado que se demostró que la α -galactosidasa anterior es muy rara entre muchos de los aislados de *Streptomyces* puestos a prueba (véase, documento U.S.S.N. 10/251.271).

Streptomyces avermitilis (ATCC 31267) se cultivó en medios YM y el sobrenadante de cultivo se sometió a ensayo para α -galactosidasa segregada usando el tetrasacárido B marcado con AMC y un monosacárido α -Gal pNP como sustratos. Como se muestra en la figura 11, se analizó una clara evidencia de la presencia de actividades de α -galactosidasa tanto en sobrenadante de cultivo como en lisado de sedimento como se analiza por oligosacárido B-tetra. Sin embargo, la escisión de un sustrato simple α -Gal pNP es despreciable por las actividades α -galactosidasa segregadas. En contraste, la escisión completa de α -Gal pNP se observó para la(s) α -galactosidasa(s) celular(es).

La proteína teórica identificada consistió en 625 aminoácidos (SEC ID n.º: 2) y no mostró ninguna identidad significativa para cualesquiera otras proteínas conocidas. Búsquedas de nuevo con la secuencia de proteínas identificada identificaron muy pocas secuencias de proteínas con similitudes de secuencia bajas exclusivamente a partir de genomas procariotas. Todas las secuencias identificadas se analizaron por análisis de secuencias múltiples como se muestra en la figura 12.

Ejemplo 4: expresión recombinante y caracterización de gen de α -galactosidasa identificado a partir de *Streptomyces avermitilis*

La secuencia codificante predicha completa del gen de *Streptomyces avermitilis* identificado, de 1878 pares de bases en longitud, que codifica la proteína teórica (SEC ID n.º: 2) de 625 aminoácidos (longitud completa) se amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando el par cebador AVER1 (5'-GCGAATTCCCATGGCTCACGGATGCTCCGGAGG-3', SEC ID n.º: 13)/AVER3 (5'-GCCTCGAGAAGCTTCTAGTCCGTGACCACGGAGGTGTC-3', SEC ID n.º: 14), se digirió con enzimas de restricción NcoI/HindIII (sitios de restricción en cebadores subrayados) y se clonó en el sitio de NcoI/HindIII del vector de expresión bacteriano pPET28 (Novagen, n.º de Cat. 70777-3) formando la construcción pZQ-B002a. Dado el hecho de que el gen posee un sitio NcoI interno en posición 1490, se llevó a cabo inserción de la construcción genética de longitud total usando un procedimiento de clonación de dos etapas. La construcción de expresión se secuenció por completo para confirmación. La construcción de expresión de longitud total generada pZQ-B002a se usó transformando la cepa de *E. coli* Rosetta (BL21-DE3)pLysS (Catálogo de Novagen, n.º: 70956-3) y se plaqueó aparte 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 proteína, se llevó a cabo la inducción a 26 °C en lugar de a los más comunes 37 °C con una concentración baja de inductor (IPTG 0,1 mM), una afección que favorece la formación de proteínas solubles. El sedimento celular inducido se lisó por un procedimiento químico detergente y el lisado completo se ensayó directamente en condición convencional para la actividad de B-zima estándar sin aclararse. Como se muestra en la figura 13, la escisión del sustrato tetrasacárido de grupo sanguíneo B marcado con AMC fue fácilmente detectable como se indica por la formación de trisacárido H usando lisado crudo generado a partir de cultivos inducidos solamente durante 1 hora. Este resultado demuestra sin ambigüedades que la proteína de *Streptomyces avermitilis* (SEC ID n.º: 2) es de hecho una galactosidasa novedosa, una actividad característica compartida por otros miembros de esta familia de proteínas. La figura 14 confirma que la SEC ID n.º: 2 puede expresarse eficientemente en *E. coli*, pero se recupera en cuerpos de inclusión. Por lo tanto, la desnaturalización, la extracción de la enzima de cuerpos de inclusión y el repliegado son necesarios primero, produciendo este polipéptido en *E. coli*.

Ejemplo 5: Conversión enzimática de glóbulos rojos B a células de fenotipo O usando α -galactosidasa como se evalúa por protocolos de clasificación de rutina

Protocolo de Conversión Uno - Se llevaron a cabo reacciones de conversión enzimática en mezclas de reacción de 1 ml conteniendo glicina 200 mM, pH 6,8 y NaCl 3 mM con glóbulos rojos concentrados al 30 % (pRBC) y enzima según se indica. La sangre completa reciente se obtuvo del Oklahoma Blood Institute (Oklahoma City, OK) y se retiró la linfa

cuajada. Se prelavaron RBC 1:1 y 1:4 volumen/volumen en tampón de conversión antes de adición de enzima y las reacciones se incubaron durante 60 minutos con mezclado suave a 26 °C, seguido por cuatro ciclos de lavado repetidos con 1:4 volumen/volumen de solución salina por centrifugación a 1.000 rpm. Los B-ECO RBC tratados con enzima lavados se clasificaron en grupos sanguíneos ABO de acuerdo con técnicas de banco de sangre estándar usando diversos reactivos de anticuerpos monoclonales disponibles estándar ((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)).

Protocolo de Conversión Dos - Se llevan glóbulos rojos B (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos de EDTA y se almacenan a 4 °C durante hasta siete días y se lavan tres veces en PBS (Medio Salino Tamponado con Fosfato, pH 7,4) y se resuspenden al 10 % en una solución de PBS y PEG al 7,5 % (pH 7,4). Las células se tratan con α -galactosidasa recombinante (10-500 U/ml) a 30 °C durante 180 minutos agitando mientras. Las células se lavan tres veces en solución salina al 0,9 % y se resuspenden al 3-5 % en solución salina para clasificación.

Protocolo de Conversión Tres - Se llevan glóbulos rojos B (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) en tubos de EDTA y los glóbulos rojos B leucorreducidos (Cruz Roja Americana, Región de Nueva Inglaterra, Dedham, MA) se congelan en Glycerolyte 57, (Baxter Healthcare Corporation, Fenwal División: Deerfield, IL) de acuerdo con el Manual Técnico AABB, 13ª edición, Procedimiento 6.6 y se almacenan a -70 °C. Antes del tratamiento enzimático las células se desglícerolizan usando solución salina al 9,0 %, solución salina al 2,5 % y solución salina al 0,9 % (véase, Procedimiento 125 del documento Immunohematology Methods por la Cruz Roja Americana), después se resuspenden a un hematocrito del 50 % en una solución de PBS y PEG al 7,5 % (pH 7,4) y se añade α -galactosidasa recombinante (200 U/ml). Las reacciones se incuban 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 clasificando.

Protocolo de Conversión Cuatro - El origen y el almacenamiento de las células es el mismo que se describe en el protocolo B. Los glóbulos rojos desglícerolizados se lavan dos veces en PCI (pH 7,4) con NaCl 150 mM y se resuspenden a un hematocrito del 50 % en PCI (pH 7,4) con NaCl 150 mM. Las células se trataron 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 clasificación.

Los reactivos de clasificación autorizados usados en los ensayos de hemaglutinación son anticuerpos monoclonales murinos y lectinas de plantas obtenidos a partir de Ortho Diagnostics, Raritan, N.J.; Gamma Biologicals/Immucor, Norcross, Ga. Los reactivos no autorizados por la FDA incluyen anticuerpos anti-B monoclonales murinos para las variantes de grupo sanguíneo B producidas por H. Clausen (Clausen y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82 (4): 1199-203, 1985, Clausen y cols., J Biol Chem. 261(3): 1380-7, 1986, Clausen y cols., Biochemistry 25 (22): 7075-85, 1986, Clausen y cols., J Biol Chem. 262(29): 14228- 34, 1987). Los reactivos de clasificación se usan de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes y otros anticuerpos monoclonales según se determinan por valoraciones.

Ensayo de hemaglutinación (temperatura ambiente).

Se prepara una suspensión al 3-5 % de glóbulos rojos lavados en medio salino de banco de sangre isotónico. Se añade una gota (aproximadamente 50 microlitros) de reactivo de anticuerpo anti-B. Se añade una gota (aproximadamente 50 microlitros) de la suspensión de glóbulos rojos. Los tubos se mezclan y se centrifugan durante 15 segundos a 3500 rpm. Las células se resuspendieron por agitación suave y se examinaron macroscópicamente para aglutinación. La aglutinación se clasificó de acuerdo con el Procedimiento 1.8 en el Manual Técnico AABB, 13ª edición.

Como se describe en los ejemplos anteriores, las enzimas preferidas para usar en eliminar epítomos del grupo sanguíneo B de glóbulos rojos es probable que tengan propiedades cinéticas particularmente buenas con sustratos oligosacáridicos semejantes a los antígenos del grupo B. Tales propiedades cinéticas preferidas podrían representarse por especificidades de sustrato preferidas o exclusivas para los oligosacáridos del grupo sanguíneo B y escasa o ninguna actividad con derivados monosacáridicos simples tales como sustratos de monosacárido-pNP. Las propiedades cinéticas preferidas podrían representarse también por una Km particularmente baja para sustratos relevantes. Las propiedades cinéticas preferidas adicionales consisten en un pH óptimo neutro de reacciones con sustratos activos de grupo sanguíneo y otras condiciones de reacción que son compatibles con la integridad y las funciones de los glóbulos rojos. Otras propiedades preferidas de la enzima tales como tamaño, carga, solubilidad y otras propiedades físico-químicas también pueden estar relacionadas con la actuación en la conversión enzimática de glóbulos rojos. La α -galactosidasa con propiedades cinéticas mejoradas se identificó a partir de diversas cepas bacterianas según se describe y proporciona una enzima con las características preferidas mencionadas anteriormente, que presentan actuación superior en conversiones de glóbulos rojos.

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

Protocolo de conversión de rutina	Immucor	Diagast
-----------------------------------	---------	---------

(200 Glicina, pH 6,8, NaCl 3 mM)		Anti-B		Anti-B	
Enzima de FragB	Dosis µg/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 de 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+

Ejemplo 6: clonación y secuenciación de ADN de α -galactosidasa desde cepa de *Streptomyces griseoplanus* n.º: 2357 y deducción de su secuencia de aminoácidos

- 5 El aislamiento y purificación de la α -galactosidasa endógena de *S. griseoplanus* 2357 se describió en el ejemplo 2. La secuenciación aminoacídica parcial de α -galactosidasa que generó un péptido de 30 aminoácidos se describió en el ejemplo 3. La búsqueda de Blast usando este péptido frente a la base de datos "nr" (GenBank) identificó una familia de α -galactosidasas teórica. Las secuencias para las 5 α -galactosidasas se sometieron a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ y se les asignaron los siguientes números de acceso: AM109953 (*Streptomyces avermitilis*),
- 10 AM109954 y AM109955 (*Bacteroides fragilis*), AM109956 y AM109957 (*Bacteroides thetaiotaomicron*). La alineación de secuencias múltiples de α -galactosidasas teóricas identificó unas pocas regiones conservadas (figura 15). La fase de lectura abierta que codifica una α -galactosidasa teórica de *Streptomyces griseoplanus* se clonó en base a la amplificación rápida 5' y 3' de extremos genómicos (RAGE). Los cebadores degenerados iniciales estaban basados en las regiones conservadas determinadas de alineamiento de secuencia múltiple de secuencias de α -galactosidasa teóricas. Los cebadores en sentido correcto y antisentido degenerados dAVER7
- 15 (5'-TTCGGXGTGXGXKXGKAGTWCAGXGAGAA-3' SEC ID. n.º: 15)/dAVER9 (5'-GTXCCXTGXATXTTXATXGGXTCXTCGTG-3' SEC ID. n.º: 16), donde X = inosina y K = G o T, se usaron amplificando por PCR un fragmento de ADN específico de B-zima de 185 pares de bases a partir de ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus*. El producto de PCR se clonó en vector pCR4 (Invitrogen) y se secuenció generando
- 20 pCR4-dAVER7/9. Los cebadores específicos de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* GRIS10 (5'-ATCGACTCGGTCACCTTCAAGGCCGAC-3' SEC ID n.º: 17) y GRIS11 (5'-AAGACGCTGTTGGTGTGCGTACGGTGC-3' SEC ID. n.º: 18) se derivaron de pCR4-dAVER7/9. El ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus* se trató con endonucleasas hasta finalización con la endonucleasa de restricción Haell, fraccionada en tamaño por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % y ADN de 2-3 kpb fraccionado se purificó por purificación de Quiagel (Qiagen). El ADN purificado se ligó a un adaptador Haell de doble hebra
- 25 EBRETTE3 (5'-GCGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGGGAATTCGGTACCCTCGAGGCGC-3' SEC ID n.º: 19)/EBRETTE4 (5'-CTCGAGGGTACCGAATTCGGAA-3' SEC ID n.º: 20) que codifica un sitio de unión T7 (subrayado) y saliente de restricción de Haell (mostrado en cursiva). ADN ligado a adaptador se usó en 5' RAGE usando ADN ligado a adaptador de 10 ng, T7/GRIS11 o 3' RAGE usando 10 ng de T7/GRIS10. Los productos 5' RAGE
- 30 y 3' RAGE generados se clonaron 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 1.593 pares de bases de la secuencia génica de B-zima codificante completa. La secuencia 5' y 3' que queda se obtuvo por RAGE repetida en ADN genómico de *Streptomyces griseoplanus* digerido con BamHI fraccionado, ligado a EBRETTE3/6 de adaptador de BamHI (5'-GATCGCGCCTCGAGGGTACCGAATTCGGAA-3' SEC ID n.º: 21) (saliente de BamHI
- 35 mostrado en cursiva). La secuencia 5' completa se obtuvo usando la secuencia de ADN ligado a 10 ng de adaptador y T7/GRIS22 (5'-CGCTTCGGCGTCCGTTCCGGCCAG-3' SEC ID n.º: 22) y secuencia 3' usando T7/GRIS24 (5'-CCGGTGCACCGCAACGTCCTCATC-3' SEC ID n.º: 23). Los productos 5' RAGE y 3' RAGE generados se clonaron en pCR4 generando 5'-T7/GRIS22-pCR4 y 3'-T7/GRIS24-pCR4 y se secuenciaron completamente. 5'-T7/GRIS22-pCR4 contenía una metionina de partida que inicia predicha y 3'-T7/GRIS24-pCR4 contenía un codón
- 40 de parada en fase, completando la secuencia codificante de 2184 pares de bases completa del gen de α -galactosidasa de *Streptomyces griseoplanus* (SEC ID n.º: 24) que codifica una α -galactosidasa de 727 aminoácidos (SEC ID n.º: 25).

La secuencia se sometió a GenBank (número de acceso AM259273). Las regiones en la secuencia proteica de α -galactosidasa de las que se derivaron los cebadores se describen en la figura 16.

Ejemplo 7: expresión recombinante y caracterización de gen de α -galactosidasa identificado a partir de *Bacteroides fragilis*

5 La construcción de expresión de α -galactosidasa de FragB (SEC ID n.º: 6) se clonó a partir de ADN bacteriano genómico por PCR. El gen de α -galactosidasa de FragB, que carece de la región codificante para el péptido señal aminoterminal teórico 1-24, se 24, se elevó a partir del ADN genómico de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285D) por PCR
10 usando cebadores BFRAGB (5'-GCGGGATCCCGGGATGGGACGTGTTTATGACATTTCCAGTTTGGC-3' SEC ID n.º: 24)/BFRAGB3 (5'-GCCTCGAGAAGCTTTCCTGAAATCTTCACGTTTGTCACTCG-3' SEC ID n.º: 25) y se amplificó usando polimerasa Pfu Ultra (Stratagene). Los salientes de enzimas de restricción para BamHI y HindIII en los cebadores anteriores están subrayados. Después de la digestión con BamHI y HindIII, los productos polinucleotídicos amplificados se insertaron dentro del vector de expresión bacteriano pET28 (Novagen) en fase y más adelante en la secuencia de la marca His 6x codificada por el plásmido generando plásmido pZQ-B006a. Para la construcción de un vector de expresión no marcado, la marca His 6x en vector pET28 se retiró por digestión de NcoI/BamHI seguida por inserción de un oligo de cadena doble PETNCBAF (5'-CATGGATCCCAGGCCTCCGGATG-3' SEC ID n.º: 26)/(GATCCATCCGGAGGCCTGGGATC-3' SEC ID n.º: 27) que crea plásmido pET28-5His. La construcción FragB descrita anteriormente que codifica la proteína marcada con His se subclonó en el sitio de BamHI/HindIII de pET28-8His creando plásmido pZQ-B006c para la expresión de la α -galactosidasa de FragB no marcada. Todas las construcciones se secuenciaron totalmente en un instrumento ABI Prism 377 (Applied Biosystems). Para la expresión de proteínas, se transformó pZQ-B006c en *E. coli*, Rosetta2 (DE3) (Invitrogen). El clon de *E. coli* se cultivó en caldo Terrific 1X (Sigma), se suplementó con 34 μ g/ml de cloranfenicol y 50 μ g/ml de kanamicina a 37 °C, 220 rpm a D.O. ~ 0,6 a 600 nm y se añadió IPTG a 0,5 mM induciendo la expresión de proteínas objetivo. El cultivo se recogió después de 3 horas, por centrifugación a 3000 x g durante 30 minutos. El sedimento celular se almacenó a ~ 20 °C. El sedimento celular recogido de 350 ml de cultivo se lisó usando BugBuster 1X (Invitrogen) en NaOAc 25 mM, pH 5,5/NaCl 10 mM, se suplementó con 5 μ l de Benzonasa (Invitrogen) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El lisado completo se aclaró por centrifugación a 40.000 x g, 5 °C, durante 30 minutos. Los restos celulares, conteniendo por encima del 90 % de la actividad enzimática, se resuspendieron en NaPO₄ 10 mM, pH 6,8/NaCl 400 mM NaCl y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La centrifugación de alta velocidad se repitió recuperando el sobrenadante que contenía la actividad enzimática. El sobrenadante resultante se cargó sobre una columna de hidroxipatita de 5 ml, se pre-equilibró con NaPO₄ 10 mM, pH 7,0. La columna se lavó con 20 ml de tampón de equilibración, seguido por elución usando un gradiente de NaPO₄, pH 7,0, desde 10 hasta 400 mM. Las actividades enzimáticas, eluidas entre NaPO₄ 200-400 mM, pH 7,0, se combinaron, se concentraron y el tampón se intercambió con un dispositivo de centrifuga Amicon (Grace) Plus 70, en 10 ml de Tris 40 mM, NaCl 400 mM/pH 7,5. La solución de proteína se dejó pasar a través de columna de alta resolución de fenilsefariosa (Amersham), preequilibrada con el tampón de diálisis y la columna se lavó con 10 ml de tampón de diálisis después de cargar. El flujo dinámico y el lavado se almacenaron, se ajustaron a pH 8,5 con Tris 1 M, se diluyeron con un volumen igual de H₂O. La solución de proteína resultante se sometió a otra etapa de columna de paso, 2,3 ml de Macro-Prep High Q, se pre-equilibró con Tris 40 mM, pH 8,5/NaCl 10 mM y la columna se lavó con 10 ml de tampón de equilibrio. El flujo dinámico y el lavado se almacenaron y el tampón se intercambió en 7 ml de NaPO₄ 10 mM, pH 6,8/NaCl 50 mM. La concentración de proteínas se determinó por Kit de Ensayo de Proteína BCA de Pierce.

45 La α -galactosidasa de FragB purificada se evaluó por su capacidad escindiendo el sustrato de cadena de carbohidratos ramificada B-tetra en condiciones convencionales (1 nmoles de sustrato en 10 μ l de NaPO₄ 100 mM, pH 6,8/NaCl 50 mM) y la enzima purificada demostró actividad específica extremadamente alta hacia el sustrato B-tetra: ~ 5-10 U/mg. El pH óptimo de la α -galactosidasa de FragB purificada se evaluó con el sustrato B-tetra-AMC a través de un intervalo de pH de 2,0 a 9,0 y los resultados se muestran en la figura 17. La enzima de FragB tiene un intervalo de pH óptimo amplio entre 4,5 y 7,5. El análisis con el ensayo colorimétrico más sensible/cuantitativo proporciona la conclusión similar como se muestra en la figura 18, aunque la actividad de la enzima se vio en el extremo más bajo del intervalo de pH puesto a prueba, *es decir*, se observó actividad hasta ~ pH 4,2, una sutil diferencia en la actividad que no es detectable usando el ensayo de AMC-B-tetra basado en TLC. Por lo tanto, la enzima novedosa se puede usar exitosamente en condiciones ácidas hasta en condición neutra e incluso hasta en condiciones ligeramente básicas, *es decir*, aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 7,4 o mayor. En realizaciones preferidas actualmente, la enzima se usa dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5 y más preferentemente aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5. El intervalo de pH más preferido actualmente para la enzima novedosa son aquellas condiciones que imitan el pH fisiológico de la sangre arterial o venosa circulante, con el fin de minimizar los efectos de pH sobre las células sanguíneas en sí mismas y no debido a limitaciones de pH en actividad y actuación enzimáticas.

65 La α -galactosidasa de FragA (SEC ID n.º: 5) se clonó de forma similar por PCR a partir del mismo ADN genómico como para α -galactosidasa de FragB y se expresó de forma similar a la proteína de marca His₆ en el extremo N-terminal en pLys5 de Rosetta (DE3) (Novagen). La proteína soluble expresada se purificó a homogeneidad por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada sucesiva (IMAC), cromatografía de intercambio catiónico y aniónico.

Se mostró que la proteína purificada es similar a la α -galactosidasa de *S. griseoplanus* endógena (cepa 2357) en términos de actividad específica de sustrato ramificado, especificidad de sustrato y pH óptimo. El análisis de actividad con, un sustrato tetrasacárido marcado con AMC de grupo sanguíneo B en el intervalo de pH de 2-9 mostró que la enzima tiene un óptimo amplio entre 5 y 7,5. La especificidad de sustrato de la α -galactosidasa se determinó con un panel diverso de estructuras oligosacáridicas y se encontró una especificidad restrictiva remarcable para galactosa α 1,3 unida en la estructura de grupo sanguíneo B ramificada (figura 20). La enzima no escindió ni enlaces α 4Gal encontrados en antígenos de grupos sanguíneos P1 y P^k ni el enlace α 3Gal en la estructura de B lineal sin fucosa.

Ejemplo 8: la α -galactosidasa de *Bacteroides fragilis* escinde eficientemente oligosacáridos B lineales a un pH neutro

El análisis adicional de la especificidad de sustrato de α -galactosidasa de FragB purificada recombinante sorprendentemente reveló que esta enzima (en contraste con la α -galactosidasa purificada a partir de *S. griseoplanus* anterior) presentó actividad baja con el sustrato de 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 de FragB y de α -galactosidasa de grano de café.

Sustrato	Grano de café	<i>B. fragilis</i> (FragB) ¹
Gal α -pNP	32 (pH 6.5) ²	1,6 (pH 6,8)
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.

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

³no determinado.

⁴Derivados de la solicitud de patente de los EE.UU., número de publicación 20050208655.

Esto impulsó a los autores de la presente invención a poner a prueba la especificidad de sustrato con sustratos que tienen diferentes uniones α 1-3Gal y α 1-4Gal. Como se muestra en la figura 19, el FragB mostró actividad elevada con uniones α 1-3Gal (B-di y B lineal) además de las estructuras oligosacáridicas del grupo sanguíneo B. De forma interesante, la actividad de FragB con el disacárido Gal α 1-3Gal fue muy alta (~ 12 U/mg a pH 6,8) sugiriendo que esta enzima es adecuada para escisión eficiente del antígeno lineal B (Gal α 1-3Gal β -4GlcNAc β 1-R, donde R es cualquier estructura de oligosacáridos) también conocido como el antígeno Galili (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86). El antígeno Galili es un antígeno barrera de xenotrasplante principal encontrado en la mayoría de los tejidos animales salvo en los monos del viejo mundo y en el hombre (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86). El xenotrasplante de *por ejemplo* tejidos y células de cerdo en hombre da como resultado rechazo hiperagudo debido principalmente a la presencia de altas valoraciones en hombre de anticuerpos IgG contra el antígeno Galili. Hasta la fecha solamente se han usado α -galactosidasa ampliamente reactivas tales como enzimas derivadas del grano de café con pH óptimos ácidos para escisión del antígeno Galili a partir de células y tejidos. Esto puede constituir un problema significativo dado que todas las células animales expresan cantidades elevadas de *por ejemplo* la estructura glucolípídica de serie global P^k (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-ceramida). Es más deseable usar enzimas α -galactosidasas con eficiencia más alta, especificidad más alta y pH óptimo neutro, tales como aquellas reveladas en el presente documento.

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

Tabla V. Especificidad de sustrato de las α -galactosidasas.

Sustratos	Especificidad de grupo sanguíneo	Grano de 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(Fuc α 1-2)Gal	B-tri	+	+	+

Gal α 1-4Gal	P ₁	+	—	-
Gal α 1-4Gal β 1-4Glc	P ^k	+	—	-
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal	A-tri	-	—	-
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -4Glc-AMC	B-tetra	+	+	+
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc-AMC	A-tetra	—	—	—

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

² Este trabajo.

5

³ No aplicable.

⁴ Actividad fácilmente detectable en condiciones de ensayo.

10 ⁵ Actividad no fácilmente detectable en condiciones de ensayo.

El hallazgo sorprendente de que la α -galactosidasa de FragB puede representar una enzima altamente eficiente novedosa para escisión de lineal B (epítomos de Galili) impulsó a los autores de la presente invención a poner a prueba la adecuación y eficiencia de esta enzima en retirar tales epítomos de las superficies celulares. Los glóbulos rojos de conejo contienen cadenas oligosacáridicas de glucolípidos y glucoproteínas similares a glóbulos rojos humanos, pero mientras que las cadenas oligosacáridicas en glóbulos rojos humanos terminan en estructuras ABH que dependen del estatus de grupo sanguíneo, los oligosacáridos de glóbulos rojos de conejo terminan con estructuras B lineales (epítomos de Galili) (Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc). La lectina IB4 de Bandeira (*Griffonia simplicifolia*) se usa generalmente detectando estructuras de B lineales (epítomos de Galili) (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86) y como se muestra en la tabla VI esta lectina aglutina fuertemente glóbulos rojos de conejo (pero no humanos).

Tabla VI: Aglutinación de glóbulos rojos de ser humano y de conejo con lectina IB4 y reactivos de clasificación anti-B monoclonales de rutinas

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 del grupo B de ser humano nativas	4+	4+	4+	4+	1+
Células del grupo A de ser humano nativas	0	0	0	0	0
Células del grupo 0 de ser humano nativas	0	0	0	0	0

25

Los glóbulos rojos de conejo sirven por lo tanto como un modelo excelente para análisis de la eficiencia de α -galactosidasas en la retirada del residuo α 1-3Gal inmunodominante a partir de estructuras B (epítomos de Galili) de las superficies celulares. Dado que los autores de la presente invención han desarrollado ya un procedimiento eficiente para la eliminación de los antígenos de tipo A inmunodominantes de las células sanguíneas usando una enzima α -N-acetilgalactosaminidasa de *C. meningosepticum* purificada, usando operativamente un sistema tampón de pH 6,8 de glicina, los autores de la presente invención pusieron a prueba las mismas condiciones para la escisión de FragB de glóbulos rojos de conejo en comparación con glóbulos rojos del grupo sanguíneo B humanos. Como se muestra en la Tabla VII, FragB elimina de manera eficiente aglutinación de lectina IB4 de glóbulos rojos de conejo a dosis muy bajas, casi comparables a las que se requieren para escisión de FragB del grupo sanguíneo B de glóbulos rojos humanos. La aglutinación de glóbulos rojos de conejo por la lectina IB4 casi se eliminó completamente por el tratamiento enzimático con dosis de 10 g/ml de enzima dando solamente una lectura microscópica (M+). Las concentraciones más altas de enzima o la incubación más larga eliminan completamente la reactividad. El gen homólogo FragA, sin embargo, solamente escindió el grupo sanguíneo B de las glóbulos rojos humanos.

40 Tabla VII: resultados de aglutinación de glóbulos rojos humanos y de conejo digeridas con enzimas modificadoras de glucanos FragA o FragB.

Conversión rutinaria		Anti-B de Immucor		Diagast Anti-B		Lectina B4
Enzima Frag B	Dosis ug/ml	IS	4 °C	IS	4 °C	10 ug/ml

ES 2 400 838 T3

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+

5 Esto demuestra que la isoforma del polipéptido purificado FragB descrita como parte de la familia de genes de α -galactosidasa novedosa comunicada 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, que el polipéptido FragB descrito es adecuado para la retirada enzimática de los antígenos de grupo sanguíneo B inmunodominantes de los glóbulos rojos, así como para la eliminación del antígeno Galili de xenotrasplantes de las células sanguíneas. El polipéptido purificado FragB es así superior a las otras enzimas conocidas actualmente, con respecto a su pH óptimo (lo más preferible pH 6,5 a pH 7,5), su especificidad de sustrato restringida a uniones Gal α 1-3 y su actividad específica alta observada.

10 La eliminación enzimática de la galactosa terminal α 1-3 unida inmunodominante de los antígenos Galili tiene aplicaciones importantes en el campo de xenotrasplantes. El antígeno Galili constituye la barrera más importante para xenotrasplante de órganos, tejidos, tendones, ligamentos y células de animales al hombre y es la causa principal del fenómeno del rechazo hiper-agudo (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86). Aproximadamente el 10% de IgG del suero de individuos sanos normales está dirigido al antígeno Galili. La retirada enzimática del residuo de galactosa terminal expondrá estructuras comunes encontradas en el hombre, que pueden anular el rechazo hiperagudo (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86).

20 El procedimiento descrito para la retirada enzimática del antígeno Galili en células de conejo en las que las células se lavan e incuban con la α -galactosidasa de FragB en un tampón adecuado a pH neutro durante un periodo de tiempo como resultado eliminación suficiente del epítipo de Galili (tabla VII). Un procedimiento similar aplicado a órganos, tejidos, tendones, ligamentos y células de animales, da como resultado la eliminación eficiente de antígenos Galili expuestos.

El proceso preferido implica poner en contacto los tejidos animales o las células animales con la α -galactosidasa de FragB (o miembros homólogos de la familia del gen 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 preferentemente 6,5 a 7,5. La dosis de enzima y el tiempo requerido para eliminación enzimática de la galactosa terminal α 1-3 unida inmunodominante sigue generalmente los parámetros de digestión descritos anteriormente para las células sanguíneas, pero se evalúan empíricamente, según se determina por inmunoensayos basados en lectina y en anticuerpos tales como inmunocitología, inmunohistología y ELISA usando tales lectinas adecuadas tales como la lectina IB4 o anticuerpos monoclonales adecuados reactivos con el epítipo de Galili (Galili U (2005) Immunol Cell Biol 83: 674-86). Cuando la reacción se completa, el órgano, tejido, tendón, ligamento o células de animales modificados por enzima se lavan con una solución tampón apropiada (tal como solución salina fisiológica) eliminando la solución enzimática. Los tejidos o células de animales carecen de antígenos Galili inmunodominantes y se pueden usar ahora como xenotransplante apropiado en un sujeto humano en necesidad de un trasplante tal. Un ejemplo de esto es un ligamento porcino modificado antigénicamente, que se usa para la reconstrucción de ligamento cruzado anterior roto en un paciente humano. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6.402.783.

Antes del tratamiento, la superficie externa del xenoinjerto puede perforarse opcionalmente incrementando permeabilidad a agentes usados volviendo al xenotransplante sustancialmente no inmunogénico. Una aguja quirúrgica estéril para intervenciones tal como una aguja de calibre 18 se puede usar llevando a cabo esta etapa de perforación, o, alternativamente se puede usar un aparato similar a un peine conteniendo una pluralidad de agujas. La perforación se puede llevar a cabo con diversos patrones y con diversos espaciados perforación a perforación, con el fin de establecer un acceso deseado al interior del xenoinjerto. La perforación también se puede llevar a cabo con un láser. En una realización de la invención, uno o más líneas rectas de punciones con un intervalo de aproximadamente tres milímetros están establecidas circunferencialmente en la superficie exterior del xenoinjerto.

Antes de la implantación, el xenoinjerto ligamentoso de la invención se pueden tratar con digestión limitada por enzimas proteolíticas tales como ficina o tripsina incrementando flexibilidad tisular o revestir con agentes anticalcificación, revestimientos antitrombóticos, antibióticos, factores de crecimiento, u otros fármacos que pueden potenciar la incorporación del xenotransplante dentro de la articulación de la rodilla del receptor. El xenoinjerto ligamentoso de la invención puede esterilizarse adicionalmente usando procedimientos conocidos, por ejemplo, con tratamiento de glutaraldehído o de formaldehído adicional, esterilización de óxido de etileno adicional, esterilización de óxido de propileno adicional, o similares. El xenoinjerto puede almacenarse congelado hasta que se requiere para uso.

El xenoinjerto de ligamento de la invención, o un segmento del mismo, se puede implantar en una articulación de rodilla humana dañada por aquellos de habilidad en la técnica usando técnicas quirúrgicas artroscópicas conocidas. Se conocen por aquellos expertos en la técnica instrumentos específicos para llevar a cabo técnicas artroscópicas, que aseguran la colocación segura y reproducible de implantes ligamentosos. Inicialmente, se lleva a cabo artroscopia diagnóstica completa de la articulación de la rodilla usando procedimientos conocidos. El ligamento dañado irreparablemente se elimina con una máquina de afeitar quirúrgica. Los sitios de inserción anatómicos para el ligamento se identifican y se perforan acomodando una clavija de hueso. El tamaño de la clavija de hueso puede ser aproximadamente 9-10 mm de anchura por aproximadamente 9-10 mm de profundidad por aproximadamente 20-40 mm de longitud. El ligamento xenogénico se lleva a través de los agujeros de perforaciones y se fija con tornillos de interferencia. Se lleva a cabo el cierre de rutina.

Usar los polipéptidos de la presente invención permite por lo tanto retirar el antígeno Galili de muchos tipos de tejidos diferentes, usando los procedimientos de modificación descritos en el presente documento y según puedan adaptarse adicionalmente a los tejidos particulares en vista de las enseñanzas proporcionadas, por un trabajador experto. Estos tejidos modificados se usan para una diversidad de procedimientos de trasplante donde no se requieren xenotransplantes inmunogénicos, como se describe en lo siguiente: creando *por ejemplo*, colágeno inyectable sustancialmente no inmunogénico (véase, Patente de los EE.UU. 7064187); para xenoinjertos óseos (véase, Patente de los EE.UU. 6972041); para los xenoinjertos de tejidos blandos y de tejidos blancos con el proteoglicano reducido (véanse, Patentes de los EE.UU. 6758865 y 6455309); válvulas cardíacas de xenoinjerto (véase, Patente de los EE.UU. 6383732); y xenotrasplantes de menisco (véase, Patente de los EE.UU. 6093204 y 5984858).

En otra realización particularmente preferida, la invención proporciona matrices de tejidos preferentemente aquellos fabricados a partir de tejidos deficientes en α 1,3-galactosa (véase, Patente de los EE.UU. 6933326 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20050159822 y 20050028228). Procedimientos de elaborar y usar estas matrices de tejido se describen en la patente anterior y en las solicitudes anteriores y la de-galactosilación de los tejidos se lleva a cabo usando las α 3-galactosidasas como se describe en el presente documento (SEC ID n.º: 2-9, o fragmentos activos o equivalentes funcionales de las mismas).

Listado de secuencias

<110> VELICO MEDICAL, INC.

<120> ALFA-GALACTOSIDASAS NOVEDOSAS

<130> 1156-0080
<140> JP 2008-53808
5 <150> PCT/US06/42350
<151> 31-10-2.006
10 <150> 60/836.000
<151> 7-8-2.006
<150> 60/731.845
15 <151> 31-10-2.005
<160> 29
20 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 8
25 <212> PRT
<213> Steptomyces griseoplanus
30 <400> 1
Phe Ala Asn Gly Leu Leu Leu Thr
1 5
35 <210> 2
<211> 625
40 <212> PRT
<213> Steptomyces avermitilis

ES 2 400 838 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 2 400 838 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 2 400 838 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

<210> 3

5 <211> 568

<212> PRT

<213> Bacteroides thetaiomicron

10

<400> 3

ES 2 400 838 T3

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

ES 2 400 838 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
 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 2 400 838 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

<213> Bacteroides fragilis

10

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 2 400 838 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 2 400 838 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

<213> Bacteroides fragilis

10

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

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 2 400 838 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

<213> Bacteroides fragilis

10

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 2 400 838 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 2 400 838 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

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

ES 2 400 838 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

<213> Bacterioides fragilis

10

<213> 7

```

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 2 400 838 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
 385 390 400

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 2 400 838 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

<213> Bacteroides thetaiotaomicron

10

<400> 400

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 2 400 838 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 2 400 838 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

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia consenso sintética

15

<220>

<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
5 <223> Phe, Val, Tyr o Ile
<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (15)..(15)
<223> Phe, His, Leu o Ser
15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
20 <223> Gly, Gln, Leu, Ala o Lys
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> Ala, Phe o Leu
30 <220>
<221> MOD_RES
35 <222> (23).. (23)
<223> Leu, Gln, Phe, Ser o Ala
<220>
40 <221> MOD_RES
<222> (25).. (25)
45 <223> Gly, Ala, Ser o Leu
<220>
<221> MOD_RES
50 <222> (27).. (27)
<223> Thr, Ala, Ser o Cys
55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (28).. (28)
60 <223> Se, His, Asp p Val
<220>
65 <221> MOD_RES

<222> (29).. (29)
<223> Pro o Asn
5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (35).. (35)
10 <223> Arg, Ala, Cys o Ile
<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (39).. (39)
<223> Val, Asp, Arg o Lys
20 <220>
<221> MOD_RES
25 <222> (48).. (48)
<223> Ala o leu
<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (51).. (51)
35 <223> Thr, Tyr, Asn o Asp
<220>
<221> MOD_RES
40 <222> (53).. (53)
<223> Arg, Tyr o Lys
45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (59).. (59)
50 <223> Ala, Ile, Gln, Val o Phe
<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (60).. (60)
<223> Val, Ala o Ile
60 <220>
<221> MOD_RES
65 <222> (73).. (73)

<223> Val, Lys, Arg, Asp o Gln
<220>
5 <221> MOD_RES
<222> (75).. (75)
<223> Arg, Gly, Glu o Pro
10 <220>
<221> MOD_RES
15 <222> (76).. (76)
<223> Pro, Ala, Lys o Gly
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (78).. (78)
25 <223> Arg, Thr, Val o Ile
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (80).. (80)
<223> Val, Lys, Ser o Arg
35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (83).. (83)
40 <223> Lys, Glu, Pro o Ala
<220>
45 <221> MOD_RES
<222> (91).. (91)
<223> Glu, Ala o Gln
50 <220> MOD_RES
<222> (95)..(95)
55 <223> Thr, Gln, Arg, Val o Glu
<220> MOD_RES
<221> (96)..(96)
60 <223> Arg, Val o Lys
<220> MOD_RES
65 <222> (104)..(104)

<223> Thr, Ser, Asp o Tyr
<220>
5 <221> MOD_RES
<222> (108)..(108)
<223> Asp o Glu
10 <220>
<221> MOD_RES
15 <222> (119)..(119)
<223> Tyr, Leu, Met o Ala
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (123)..(123)
25 <223> Met, Leu o Ile
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (134)..(134)
<223> Lys, Thr o Glu
35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (137)..(137)
40 <223> His, Met, Tyr o Phe
<220>
45 <221> MOD_RES
<222> (147)..(147)
<223> Ile, Asp, Glu o Leu
50 <220>
<221>
55 <222> (148)..(148)
<223> Arg, Lys o His
<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (151)..(151)
65 <223> Asp, Gly o Asn

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (163)..(163)
<223> Ala, His, Arg, Gln o Ile
<220>
10 <221> MOD_RES
<222> (165)..(165)
15 <223> Glu, Thr, Ala, His o Leu
<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (166)..(166)
<223> Val, Gln, Gly, Ile o Thr
25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (168)..(168)
30 <223> Asp, Glu o Gln
<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (172)..(172)
<223> Ala, Leu, Arg, Val o Thr
40 <220>
<221> MOD_RES
45 <222> (174)..(174)
<223> Thr, Glu, Val, Asn o Ser
<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (178)..(178)
55 <223> Asp o Thr
<220>
<221> MOD_RES
60 <222> (181)..(181)
<223> Ala, asp, Glu, Lys o Tyr
65 <220>

<221> MOD_RES
<222> (182)..(182)
5 <223> Tyr o Gly
<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (183)..(183)
<223> Arg, Leu, Thr o Ile
15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (187)..(187)
20 <223> Ile, Val, Leu o Pro
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (190)..(190)
<223> Gly, Thr, Asp, Trp o His
30 <220>
<221> MOD_RES
35 <222> (191)..(191)
<223> Ser, Thr, Val o Gln
<220>
40 <221> MOD_RES
<222> (192)..(192)
45 <223> Pro, Gln, Arg, Asp o Tyr
<220>
<221> MOD_RES
50 <222> (197)..(197)
<223> Gly, Asp, Asn, Lys o Glu
55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (198)..(198)
60 <223> Thr, Ala, Gly, Asp o Asn
<220>
65 <221> MOD_RES

<222> (200)..(200)
<223> His, Gln, Lys, Val o Arg
5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (203)..(203)
10 <223> Trp, Leu, Gly o Phe
<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (204)..(204)
<223> Leu, Tyr o Val
20 <220>
<221> MOD_RES
25 <209> (209)..(209)
<223> Pro, Arg, Val o Lys
<210>
30 <221> MOD_RES
<222> (211)..(211)
35 <223> Thr, Asn, Arg o Ser
<220>
<221> MOD_RES
40 <222> (214)..(214)
<223> Pro, Asn, Ser o Trp
45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (215)..(215)
50 <223> Tyr, His, Trp o Ala
<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (216)..(216)
<223> Trp, Cys, Gly o Ile
60 <220>
<221> MOD_RES
65 <222> (218)..(218)

<223> Gly, Phe, Glu, Ala o Gln
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (221)..(221)
 <223> Gly o Pro
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (224)..(224)
 <223> Tyr, Ile, Glu, Lys o His
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (227)..(227)
 25 <223> Ile, Ser, Thr, Val o Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (233)..(233)
 <223> Gln, Glu oAsn
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (234)..(234)
 40 <223> Arg, Met, Asn, Ile o Leu
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (238)..(238)
 <223> Gly, Ser, Ala o Thr
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (239)..(239)
 <223> Asp, Trp, Ser, Lys o Tyr
 <220>
 60 <221> MOD_RES
 <222> (242)..(242)
 65 <223> Leu, Met, Arg, Phe o Thr

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (251)..(251)
<223> Asp, Glu, Phe, Ile o Leu
<220>
10 <221> MOD_RES
<222> (251)..(251)
15 <223> Asp, Glu, Phe, Ile o Leu
<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (252)..(252)
<223> Leu, Asn, Cys o Ser
25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (253)..(253)
30 <223> Gly, Arg, Thr, Ser o Asp
<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (260)..(260)
<223> Asp, Gln, Glu, Arg o Lys
40 <220>
<221> MOD_RES
45 <222> (262)..(262)
<223> Thr, Lys, Met, Val o Phe
<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (268)..(268)
55 <223> Ala o Val
<220>
<221> MOD_RES
60 <222> (269)..(269)
<223> Asp o Gly
65 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (270)..(270)
 5 <223> Ala o Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (271)..(271)
 <223> Gly o His
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (275)..(275)
 20 <223> Gln, Thr, Ala o Val
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (280)..(280)
 <223> Glu, Phe, Ile, Gly o Thr
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (283)..(283)
 <223> Glu, Gln, Thr o His
 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (284)..(284)
 45 <223> Pro, Val o Ala
 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (289)..(289)
 <223> Trp, Asn, Leu, Ser o Tyr
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (290)..(290)
 60 <223> Glu, Arg o His
 <220>
 65 <221> MOD_RES

<222> (294)..(294)
 <223> Val, Ile o Thr
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (297)..(297)
 10 <223> Arg, Glu, Ser o Leu
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (298)..(298)
 <223> Ser, Asn, Arg o Asp
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (301)..(301)
 <223> Ala, Phe, Met, Val o Leu
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (304)..(304)
 35 <223> Leu, Met, Ala o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (305)..(305)
 <223> Gln, Gly, His, Glu o Cys
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (319)..(319)
 50 <223> Ile, Val, Met, Leu o Phe
 <220>
 55 <221> MOD_RES
 <222> (323)..(323)
 <223> Asn, Lys, Gly o His
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 65 <222> (324)..(324)

<223> Phe, Cys, val o Ile
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (330)..(330)
 <223> Arg, Gly, Asp, Asn o Ser
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (334)..(334)
 <223> Ser, Thr, Leu, Tyr o Val
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (337)..(337)
 25 <223> Ser, Gly, Ala o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (338)..(338)
 <223> Phe, Ser, Gln o His
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (341)..(341)
 40 <223> Phe, Met, Ala o Gly
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (342)..(342)
 <223> Val, Ile, Met, Thr o Phe
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (351)..(351)
 <223> Val, Ile o Leu
 <220>
 60 <221> MOD_RES
 <222> (352)..(352)
 65 <223> Ser, Asp, Ile, Val o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (379)..(379)
 <223> Pro, Leu, Ile o Val
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (382)..(382)
 15 <223> Ser, Asn, Gln, His o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (394)..(394)
 <223> Ala, Phe, Tyr, Trp o Glu
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (398)..(398)
 30 <223> Gln, Ala o Trp
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (400)..(400)
 <223> Ala, Phe o Arg
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (404)..(404)
 <223> Glu, Asp o Thr
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (406)..(406)
 55 <223> Glu, Ala, Gln o Gly
 <220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (411)..(411)
 <223> Arg, Ala, Glu o Lys
 65 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (415)..(415)
 5 <223> Pro, Val, Arg, Leu o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (416)..(416)
 <223> Leu, Val, Phe o Ile
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (424)..(424)
 20 <223> Thr, Ala o Lys
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (425)..(425)
 <223> Ala, Lys, Val, Ile o Met
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (428)..(428)
 <223> Gly o Thr
 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (433)..(433)
 45 <223> Asp, Glu, Val, Gly o Phe
 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (435)..(435)
 <223> Thr, Arg, Ile o Ala
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (436)..(436)
 60 <223> Lys, Leu, Ile, Arg o Gln
 <220>
 65 <221> MOD_RES

<222> (438)..(438)
 <223> Leu, Ser, Asp, Ala o Lys
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (443)..(443)
 10 <223> Val, Glu o Ile
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (448)..(448)
 <223> Pro, Asp o Ala
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (453)..(453)
 <223> Gly, Ser, Ile o Ala
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (454)..(454)
 35 <223> Val, Leu, Asn o Gly
 <220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (456)..(456)
 <223> Thr, Leu, Lys o Glu
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (457)..(457)
 50 <223> Gly, Lys, Asn, Ser o Ala
 <220>
 55 <221> MOD_RES
 <222> (459)..(459)
 <223> Thr, Leu, Asp, Phe o Tyr
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 65 <222> (466)..(466)

<223> Ala, Trp o Cys
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (479)..(479)
 <223> Asn, Arg o Ser
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (480)..(480)
 <223> Val, Thr, Asn o Cys
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (491)..(491)
 25 <223> Lys, Arg o Gly
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (501)..(501)
 <223> Asp, Tyr o Glu
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (502)..(502)
 40 <223> Gly, Lys o His
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (511)..(511)
 <223> Ser, Ala, Glu o Cys
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (512)..(512)
 <223> Ala, Asp o Gly
 <220>
 60 <221> MOD_RES
 <222> (538)..(538)
 65 <223> Cys, Leu o Asn

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (539)..(539)
<223> Ala, Thr o Ser
<220>
10 <221> MOD_RES
<222> (540)..(540)
15 <223> Tyr, Asn o Ser
<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (541)..(541)
<223> Asn, Met o Ile
25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (542)..(542)
30 <223> Gly, Phe o Tyr
<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (544)..(544)
<223> Pro, Cys o Phe
40 <220>
<221> MOD_RES
45 <222> (546)..(546)
<223> Gly, Glu, His o Asn
<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (552)..(552)
55 <223> Glu, Asp, His o Tyr
<220>
<221> MOD_RES
60 <222> (557)..(557)
<223> Val, Glu, Ile, Asn o Thr
65 <220>

<221> MOD_RES
<222> (559)..(559)
5 <223> Asp, Lys o Glu
<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (560)..(560)
<223> Pro, Gly, Ala, Asp o Gln
15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (561)..(561)
20 <223> Ala, Glu, Gln o Lys
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (562)..(562)
<223> Thr, Val, Arg, Gln o Tyr
30 <220>
<221> MOD_RES
35 <222> (564)..(564)
<223> Tyr, Lys o Val
<220>
40 <221> MOD_RES
<222> (581)..(581)
45 <223> Asp, Arg o His
<220>
<221> MOD_RES
50 <222> (587)..(587)
<223> Val, Ala o Ile
55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (597)..(597)
60 <223> Ala, Met, Leu, Ile o Thr
<220>
65 <221> MOD_RES

<222> (604)..(604)
<223> Arg, Tyr, Val, Lys o Ile
5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (606)..(606)
10 <223> Leu, Thr, Asn o Asp
<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (614)..(614)
<223> Tyr, Gly o Trp
20 <220>
<221> MOD_RES
25 <222> (618)..(618)
<223> Leu, Phe, Val, Arg o Gly
<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (620)..(620)
35 <223> Val, Gln, Tyr, Leu o Thr
<220>
<221> MOD_RES
40 <222> (626)..(626)
<223> Gly, Glu, Lys, Asn o Ser
45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (639)..(639)
50 <223> Asn, Leu o Pro
<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (643)..(643)
<223> Val o Ile
60 <220>
<221> MOD_RES
65 <222> (644)..(644)

ES 2 400 838 T3

<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

5

ES 2 400 838 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 2 400 838 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
 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 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

<210> 10
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 20 <223> Pro o Ala
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> val o lle
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (6)..(6)
 <223> Val o lle
 <400> 10
 40 Asp Asp Xaa Xaa Asn Xaa His Gly Thr
 1 5
 <210> 11
 45 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(4)
 60 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (6)..(6)
 <223> Tyr o Phe
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 15 <223> Ser o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (10)..(12)
 <223> Qualquer aminoácido
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 30 <223> Leu o Val
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Leu o Thr
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (17)..(17)
 <223> Lys o Arg
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 55 <223> Qualquer aminoácido
 <220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (20)..(20)
 <223> Qualquer aminoácido
 65 <400> 11

ES 2 400 838 T3

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 atgctcagc gatgctccgg aggg

30
34

35 <210> 14

<211> 39

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 14

gcctcgagaa gcttctagtc cgtgaccacg gaggtgttc

50
39

<210> 15

55 <211> 29

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
15 <223> Inosina
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Inosina
25 <220>
<221> MOD_RES
30 <222> (12)..(12)
<223> Inosina
<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
40 <223> Inosina
<400> 15
ttcggngtng tnkgkcagtw cagngagaa
45 29
<210> 16
50 <211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
65 <223> Inosina

<220>
5 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Inosina
10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
15 <223> Inosina
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Inosina
25 <220>
<221> MOD_RES
30 <222> (15) .. (15)
<223> Inosina
<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
40 <223> Inosina
<220>
<221> MOD_RES
45 <222> (21)..(21)
<223> Inosina
50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
55 <223> Inosina
<400> 16
60 gtnccntgna tnttnatngg ntcntcgtg
29
<210> 17
65 <211> 27

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
10 <400> 17
atcgactcgg tcacctcaa ggccgac
27
15 <210> 18
<211> 28
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
<400> 18
30 aagacgctgt tggatgacg tacggtgc
28
35 <210> 19
<211> 50
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
45 <400> 19
gcgctcgaaa ttaacctca ctaaagggga attcgggtacc ctcgaggcgc
50 50
<210> 20
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 20
65 ctcgagggta ccgaattccg gaa

23
<210> 21
5 <211> 31
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
15 <400> 21
gatcgcgct cgagggtacc gaattcgga a
20 31
<210> 22
<211> 24
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 22
35 cgcttcgcg tccgttcggg ccag
24
40 <210> 23
<211> 24
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
50 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 23
cgggtgcacc gcaacgtcct catc
55 24
<210> 24
60 <211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 24

5 gcgggatccc gggatgggac gtgttatga cattcccag ttggc

46

10 <210> 25

<211> 44

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 25

25 gcctcgagaa gcttctactc tgaaatctc acgtttgca ctcg

44

<210> 26

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 26

catggatccc aggcctccgg atg

23

45 <210> 27

<211> 23

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 27

60 gatccatccg gaggcctggg atc

23

<210> 28

65 <211> 727

ES 2 400 838 T3

<212> PRT

<213> Streptomyces griseoplanus

5

<400> 28

```

Met Gly Thr Ala Thr Ala Gln Pro Ala Leu Arg Pro Gln Thr Ser Thr
 1          5          10
Val Ile Gly Gly Leu His Gly Ala Ala Val Leu Asp Asn Thr Gly Arg
 20          25
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
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

```

ES 2 400 838 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

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

<210> 29

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: marca de His 6x sintética

His His His His His His

15 <400> 29

His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparar de un tejido para xenotrasplante, que comprende las etapas de:

5 (i) incubar el tejido con una enzima que tiene actividad alfa-galactosidasa,

(ii) por lo tanto escindir los residuos de galactosa terminales alfa-1-3 unidos inmunodominantes del tejido y aislar el tejido de la enzima y los residuos de galactosa inmunodominantes escindidos enzimáticamente, por lo tanto volviendo al tejido adecuado para xenotrasplante, en el que la enzima comprende al menos 10 aminoácidos en la siguiente secuencia numerados de acuerdo con ella cuando se alinean con SEC ID n.º: 2:

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

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

15 G en residuo 130; G en residuo 132; G en residuo 139; N en residuo 156;

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

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

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

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

25 N en residuo 367; H, en residuo 369; G en residuo 370; T en residuo 371;

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

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

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

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

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

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

40 G en residuo 595; N en residuo 601; y I en residuo 629;

y en el que la enzima tiene al menos identidad del 20 % con la SEC ID N.º: 2 cuando se alinea con la SEC ID N.º: 2 y en el que la enzima tiene actividad [alfa]-galactosidasa;

45 (iii) aislar los eritrocitos convertidos de la etapa (ii) a partir de la enzima y los residuos de galactosa inmunodominantes escindidos enzimáticamente, escindiendo de este modo los epítomos B inmunodominantes en el eritrocito de grupo B o de grupo AB según se determina por serotipado o por ensayos de hemaglutinación.

50 2. El procedimiento de 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 (SEC ID n.º: 10).

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 -2, en el que la enzima comprende veintidós aminoácidos contiguos que tienen la secuencia: DXXXW(Y/F)E(S/T)GXXXD(L/Y)(L/T)I(K/R)XNXF (SEC ID n.º: 11), donde X puede ser cualquier aminoácido.

55 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima comprende una secuencia especificada por SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7, SEC ID n.º: 8 y en el que la enzima presenta actividad alfa-galactosidasa con especificidad de sustrato ramificada, especificidad de sustrato lineal o ambas y un pH óptimo neutro.

60 5. Una preparación de células sanguíneas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para usar en tratar un sujeto en necesidad de sangre y el cual sujeto es seropositivo para anticuerpos anti-B.

65 6. Una preparación de células sanguíneas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en la elaboración de un medicamento para tratar un sujeto en necesidad de sangre y el cual sujeto es seropositivo para anticuerpos anti-B.

FIG. 1.

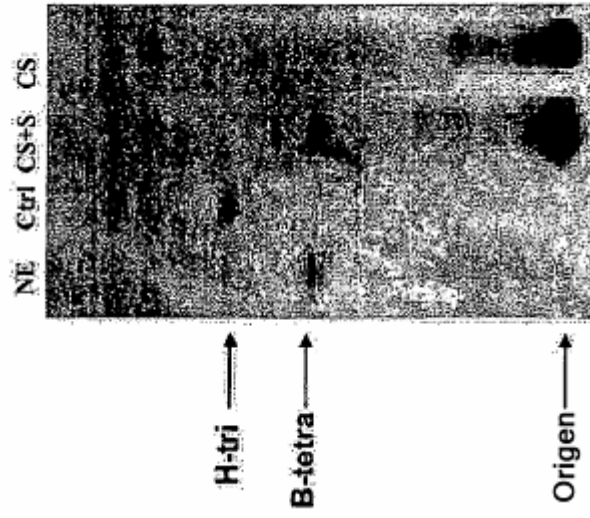


FIG. 2.

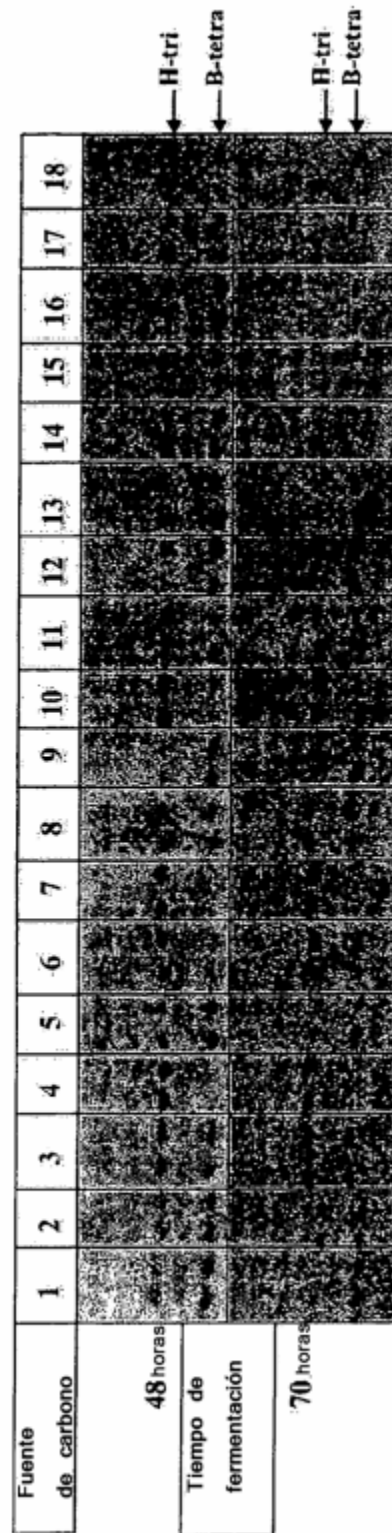


FIG. 3.

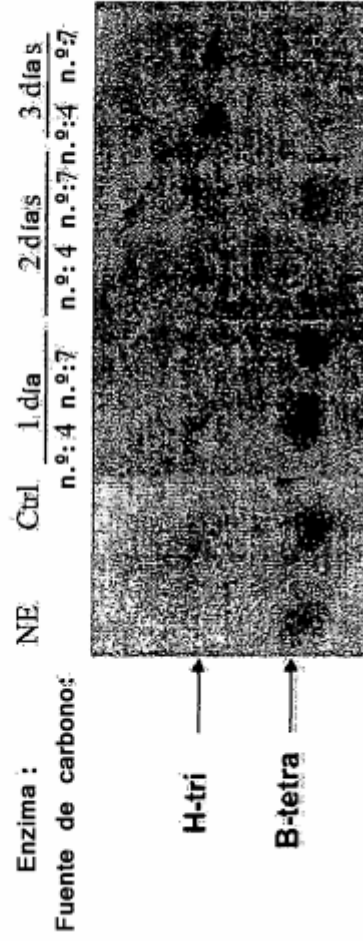


FIG. 4.

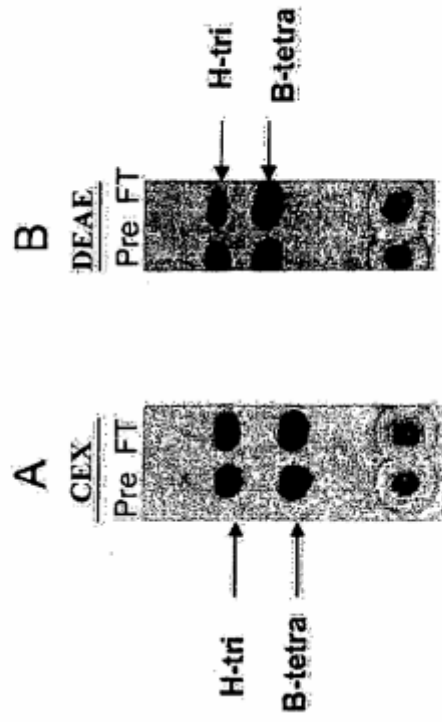


FIG. 5.

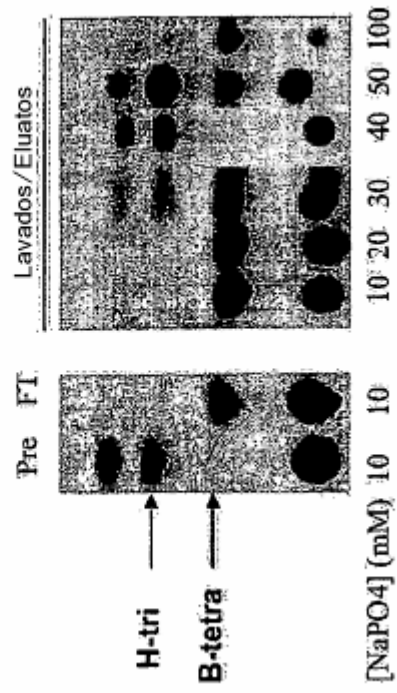


FIG. 6.

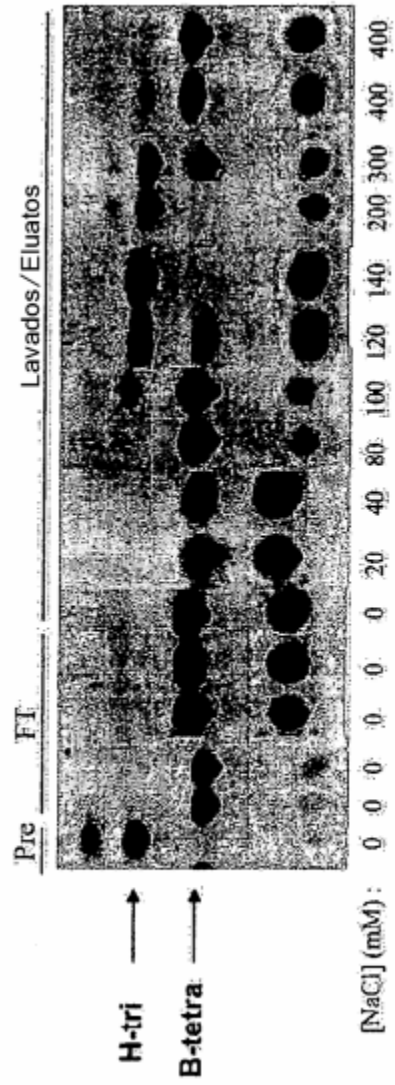
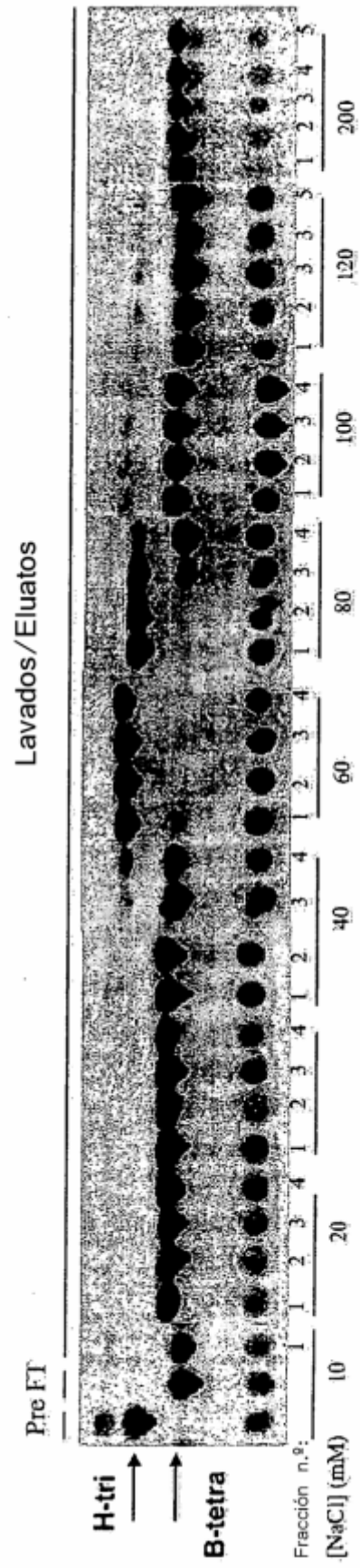
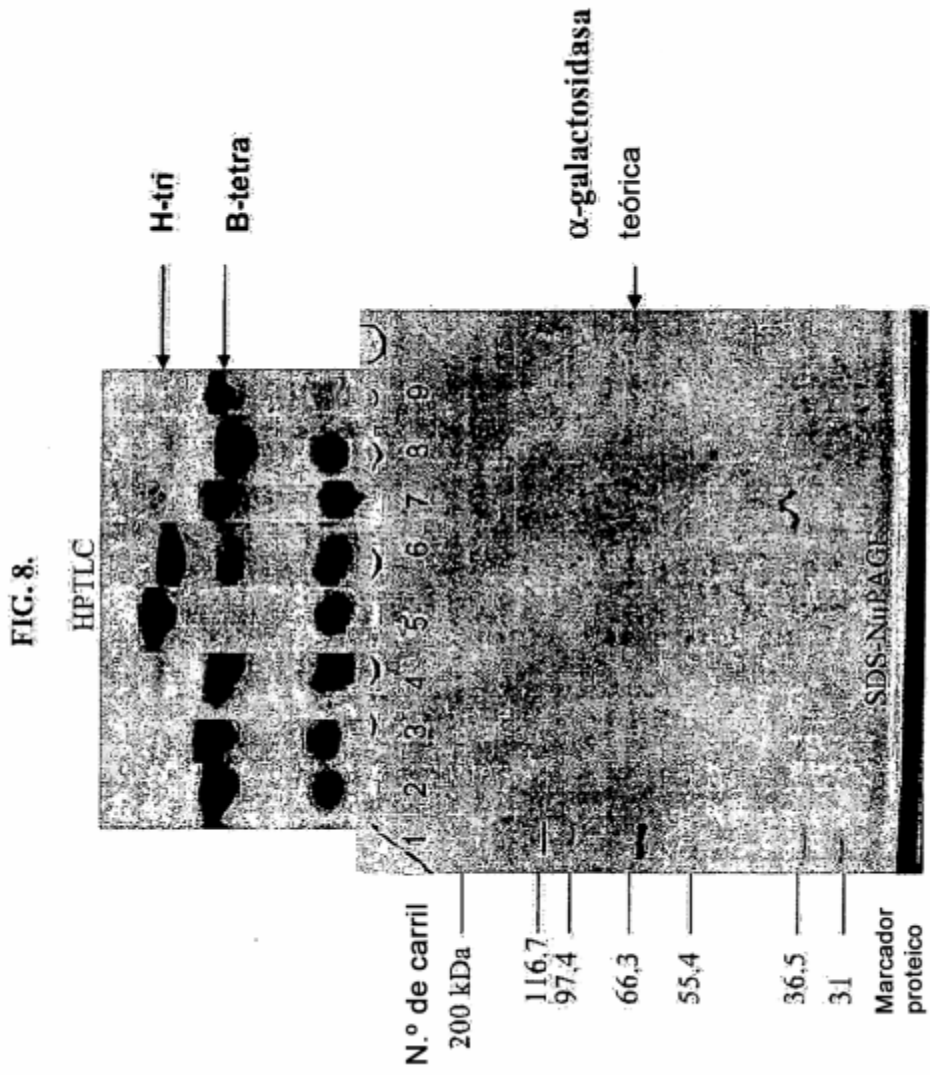


FIG. 7.





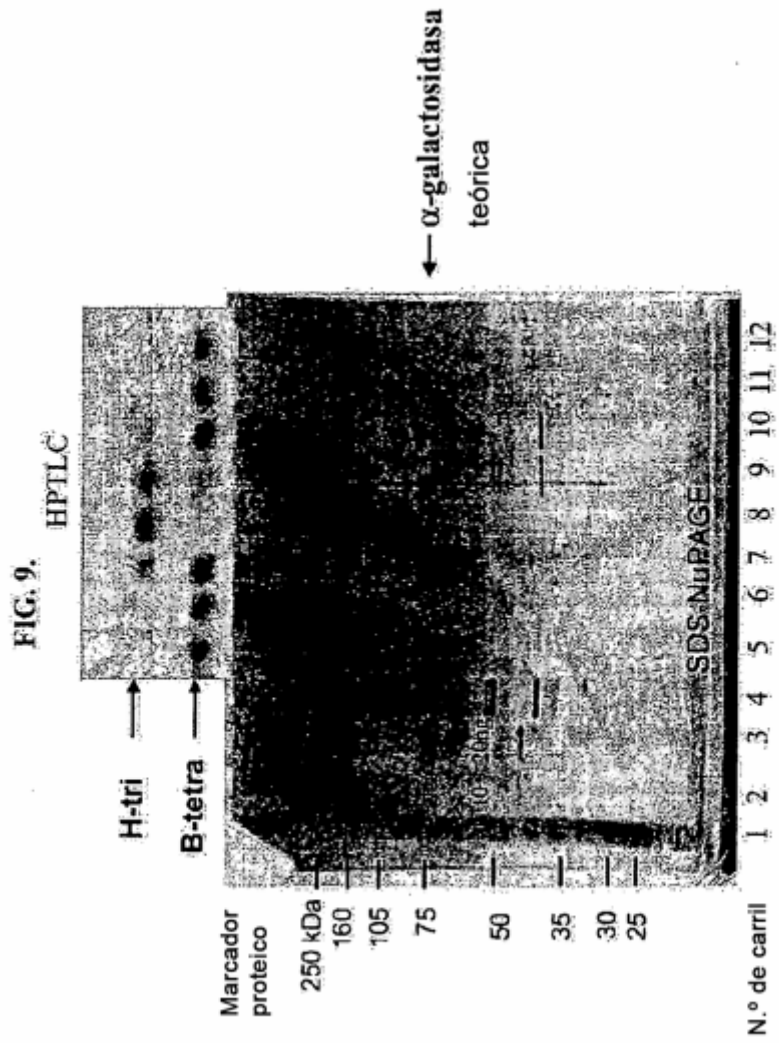


FIG.10.

1 MAHGCSGGAM SREVELGVAL ALLGGATSPA AAAAPRVTPYV VDVGDYGGADP TGRDLSLPAV AAALTHAKSV DRPVRIVFSK
 81 GTYQLYPERA ETRELYMSNT VGADORYRDK KIGLLVEDMH DVTVDGGGAK LVHHGLQTAQ ASIRSTDVTE QNESFDYAAP
 161 EVIDATVATI GVTDGHAYRY LKIPAGSPYR VNGTHITWLG ETSPTATGOPY WSGVDGLOYT QIHDPEAORT WRCDNPLEND
 241 VAAVTDLGGR RIRIDYTTAA RPNDAGLVNO MRLIERTEPG AEIWEKSNVT MRSMNAYYIQ SFGVVGQFSE NISIDKVNEA
 321 PDPRSGRSTA SFADEVQMSG VKGKVSITRS LEDGPHDDPI NIHGTYLEVW GKPGPSTLTL AYKHPQTAGE POFAPGDEVE
 401 EATKRTMTPLE ADAHAQVTAV DGPSEMDHTK PLTMTMTVED RPVPAGVETG GTVVENITAT PSWVISGNVE RNVPTRGILV
 481 TTRKRVLITG NREFDGMSMAS IYVSADAYQW YESGPPVADLT IRGNSETRPS GPVIFVEPTN QVIDPATPVH HNISVEHNSE
 561 DIGDVTVVNA KSVGGFAETG NTVRRRLDQAD HPPYTSPLFV FHGSSGIRIA RNHYDKGLNT SVVTD

FIG. 11.

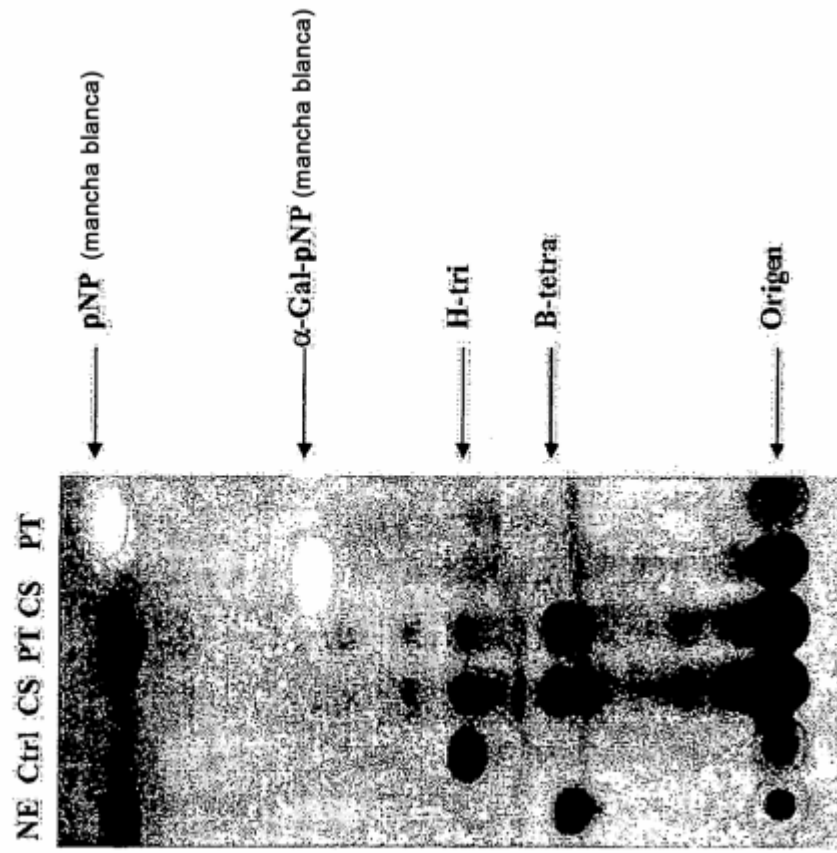


FIG.12.

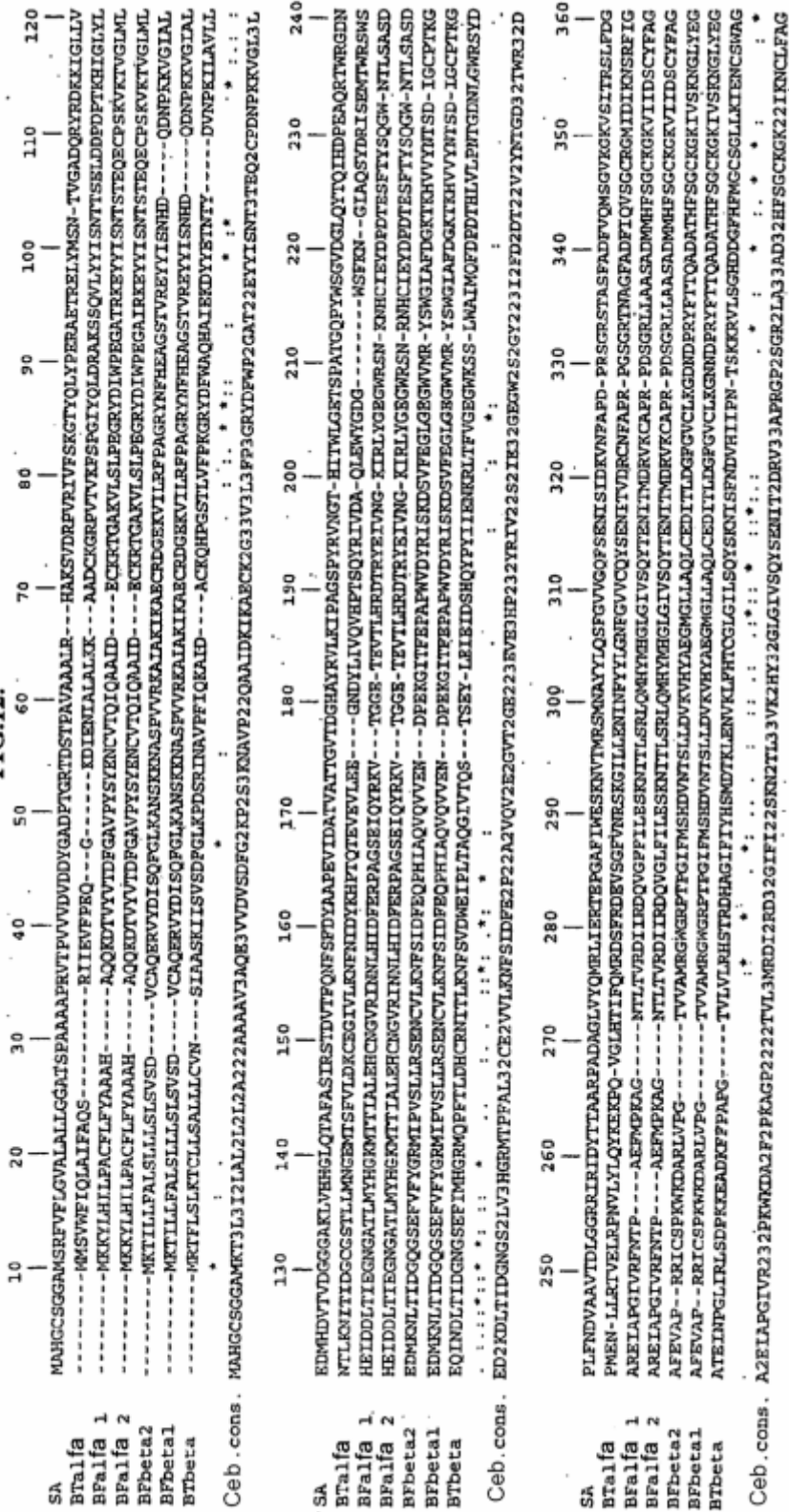


FIG. 12. continuación

370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 48C

PHDDPNIHGTVLVVGKPGPSTLTLAYKHPTAGFPQFAPGDEVEFATKXMTPLADAHQVTAVDGPGMDHTKPLTMTVTFDRFPV--AGVETGGTVVVENITATPSSVVISGNVFRNV
 AHDDPNIHGTHLRVIEFLSDNRLKLRFMHDDQIFGFAFKGDDILVDSRLLVVGKCKVEAKLVPREMLTSSPLSSEVMQQ-----KDLVIENTVWTPEVRLTNNYFARV
 AQDDPNNVHGTLNRALEKIDDAQTLKLRFMHGGQSYGFNAYFKGDTVAFIRAATMERFASA---TVR-----DVRRI SDRIVEVRFRDRIP--TSLELNHDCVENMTCTPEVEIRNSYFTRT
 AQDDPNNVHGTLNRALEKIDDAQTLKLRFMHGGQSYGFNAYFKGDTVAFIRAATMERFASA---TVR-----DVRRI SDRIVEVRFRDRIP--TSLELNHDCVENMTCTPEVEIRNSYFTRT
 MDDALNVHGTYLKVIKRVDDHTLIGRYMHDQSWGFEMGRFDDVQFVRSETMELIGKQNOITAIRP--YDKGEIRGARAFSITFKEADPAINEKSGFGIENLWTPEVLFAGNTIRRN
 MDDALNVHGTYLKVIKRVDDHTLIGRYMHDQSWGFEMGRFDDVQFVRSETMELIGKQNOITAIRP--YDKGEIRGARAFSITFKEADPAINEKSGFGIENLWTPEVLFAGNTIRRN
 LADDPNIHGTCSRIMEVLSPTLRKCKFMQMSGMEGRDETIIGFIEHKMTVATG---KMN-----XFEALNKAEFIIILSVPLP--AGVEAGYVIENTLCTPDAEIRNCHFGSC
 ::*:*:*
 Prim. cons. AMDDPNIHGTYLVRVIEK3DD2TLKLRFMHDDQSGFE2G2PGD2V3FVRS3TME23AKANQIT22RP2PYDK2E32S2REFS2TFDR3IPPA22E22G2VIENLT2TPEVEIRNNYFR23

490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600

PTRGILLVTRKPVLTGNRFDCGMSMASIYVSADAKQWYEGSFVADLTIRGNSFTR-----PSGPFVIFVEPTNOVDIPATPVHNN-----ISVEHNSFDIGDVTVVNAKSVGGFAFTG
 PTRGILLVTRKPVLTGNRFDCGMSMASIYVSADAKQWYEGSFVADLTIRGNSFTR-----PSGPFVIFVEPTNOVDIPATPVHNN-----ISVEHNSFDIGDVTVVNAKSVGGFAFTG
 STRGLVTTTPRAVVIENNTYKTKMSAILLEADAGWYEGSPKDVLIKGNFTID--CAYNGGPGHAVIAIHPSNKIIDAERPVHQN-----CGEPYISIDPENREYKGAVERKNIT-----IEENYFYMRKNSSCAIRAKAVDGLMIRH
 STRGLVTTTPRAVVIENNTYKTKMSAILLEADAGWYEGSPKDVLIKGNFTID--CAYNGGPGHAVIAIHPSNKIIDAERPVHQN-----CGEPYISIDPENREYKGAVERKNIT-----IEENYFYMRKNSSCAIRAKAVDGLMIRH
 RARGTLFSTPKKIVVEDMLFDHTSGTALLCGDCNGWFETGACRVDTI RRRNFIN--ALTNNFQFNNAVISIYFELPNLQDQKYPFHGGKGGIVIEDNEPFTFDAPILYAKSVDDGLIFRN
 RARGTLFSTPKKIVVEDMLFDHTSGTALLCGDCNGWFETGACRVDTI RRRNFIN--ALTNNFQFNNAVISIYFELPNLQDQKYPFHGGKGGIVIEDNEPFTFDAPILYAKSVDDGLIFRN
 RARGLLVSTPGVLIENNVE--SSGSAILLAGDANAWYESGAVKDVILRNDFRYPKNSIYQFCEAVISIDPEIPTPEQKYPYHRN-----IRINDNTFHLFDYPIILFARSVNGLTFSS
 ::*:*:*
 Prim. cons. RTRGTLVTTF2KVVIENNTF23TSM5AILI32DANGWYEGSFVADLTIRGNTFINPA2222Q2G3AVISI3PENP2I2232P2HENGKGGIRIEDNTF2TFDYF2LYAKSVDDGL2FRN

610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660

NTVRLDGDADHPPTSPFLVFGHSSGIRIARNHYDKGLNLSVWTD-----
 NLIYSLDTERNK--ESDFIQMNCNEVTIKENRVQLHLHFK-----
 NTIVRETETPAASGNPVVYLANGCKKAVIEGTVPGETPQSIKTENMKRDLKTIK-----
 NTIVRETETPAASGNPVVYLANGCKKAVIEGTVPGETPQSIKTENMKRDLKTIK-----
 NVIKNTIEFKPHHNDKDFLLERVTVNKLISE-----
 NVIKNTIEFKPHHNDKDFLLERVTVNKLISE-----
 NTLIRUTTYQPHYRKEGITLEACKSVVLSNNKIEGDVLGRJVTIEKMKPSDVKISKNPFFKLLK
 *
 Prim. cons. NTTI2R3TTFEFFF3NKD2F2LEGCK2VVI SENVEGET2RQ22TENMKRDLKTIKPFKLLK

FIG. 13

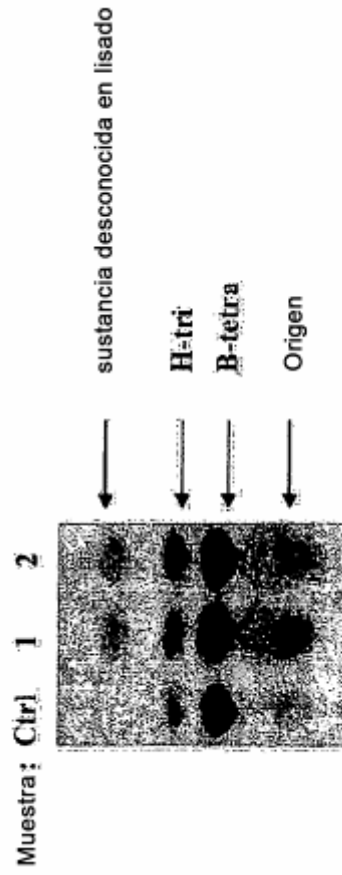


FIG. 14.

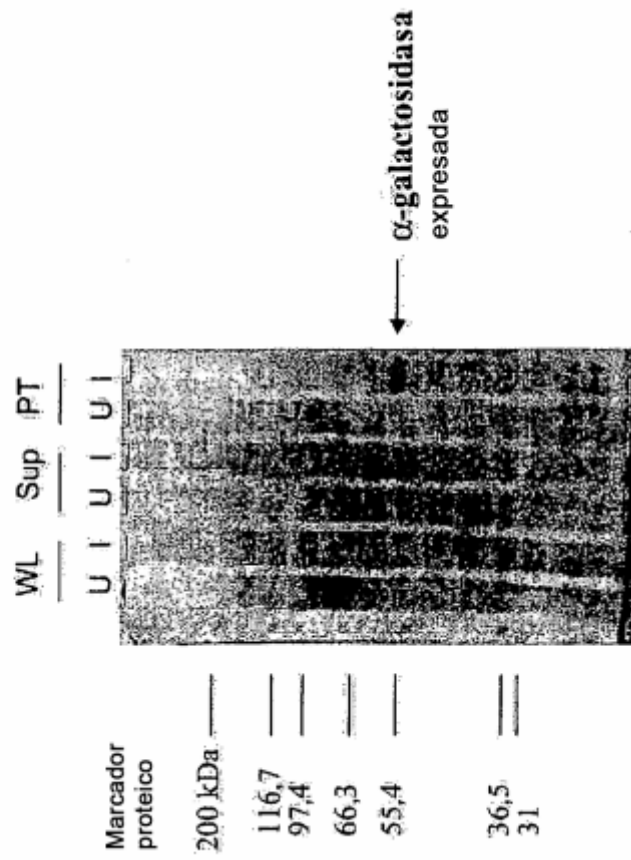


FIG. 15.

1 MABGCSGA SR RYFLGVVBA LGGATSPAAAPRVT PVVVDDDDYCADTGRDTSFAVAALGR ---BKSVDPFRVTSKGTQIYPRKTRRLMGN -TV
 75 ELDDPDPRI EIGLNTLKNLIDCGSTLUNGERTSVDKCGIVDNFNIDYKHPDTEVEVLEE ---GHDIYLIVQVPTSONRIVDAOLEWYCGG ---
 87 ECFPCKYTVGEMHEIDDLTIEDGCAETVEGHTTALBHCQVGRINLEHIDRPPAGSIQYRVY ---GG--GETEVLHRTDVIKRVGLYCEG ---
 91 ---QDNPKYKALDKMNLIDGQSEFVYVGRNIPYSLRSCNCLMNFSLDPEPHIAQOVVEN ---DPEKGTFRAPMVDVLSKSDVPEGLGEC ---
 88 ---DYNPKLALVLEOINDLITDGCSEPIYMEGRMOPEDHCENYLANPSEVDEIPLTAQOITQS ---SEYLEIEIDSHQYPIAE-NKALTFVCEG ---
 102 GADQYRDDKIGLVEEDMHDVYDDEGQAKVHUGLQVASIRHGDVYTPQNEGPEVAAPDEVIDATFATIGV DCHAYRVLEKZPACBTRVNGRITHTWLCECPAT
 75 ELDDPDPRI EIGLNTLKNLIDCGSTLUNGERTSVDKCGIVDNFNIDYKHPDTEVEVLEE ---GHDIYLIVQVPTSONRIVDAOLEWYCGG ---
 87 ECFPCKYTVGEMHEIDDLTIEDGCAETVEGHTTALBHCQVGRINLEHIDRPPAGSIQYRVY ---GG--GETEVLHRTDVIKRVGLYCEG ---
 91 ---QDNPKYKALDKMNLIDGQSEFVYVGRNIPYSLRSCNCLMNFSLDPEPHIAQOVVEN ---DPEKGTFRAPMVDVLSKSDVPEGLGEC ---
 88 ---DYNPKLALVLEOINDLITDGCSEPIYMEGRMOPEDHCENYLANPSEVDEIPLTAQOITQS ---SEYLEIEIDSHQYPIAE-NKALTFVCEG ---
 207 GQPYMSGVYDGLQYTOHDPEAQRMRGDNPLRNVAAVTLGQKIRKIDYTAARADAGLYOERLIERTEPECAPIWZSKNVTMKSMNAKYLQSPFVTCGSESR
 172 ---WSPYN--GIAOSYDRISEMIMRSMSPNEN-LLTYVLRPNVLYIQKKEKPOVGLERHFCMRDSEDRVEGYNRSCGIL ENRIFYLGNFVVCQISEN
 184 ---KRSNKHCEZKPPDESEYYSQGNV-LSASDARERLAGEIVRNTF ---REFRAGNIDIVRDIDRDPVCFILZSKNILLSQIMHYMLHLLGIVSQTEN
 186 ---WVHRISWGIAZCKTKHVYVNSD-IGCPXCGPEVAP--RRCSPKMKDARLVGG--FVYAMRGWRDTPCEWMSHDVYTLDDVKKVHKACMGLLACLED
 182 ---WKSLSWAINHQDPDHLVLPNIGNLGWSYDAIEINGLIRUSDEKKAHDKFAPGIVLVLRSYHSDHAESEIYHSHNDIKLENYKLFKXITLGLIYSPSRN
 312 **AGYDREVPAPDPBEG-RSTNSPAPQMSGVKORVSTPASLFCGPHRDEPNIRHGTVEVVGEPGPTLHAYKREOTAGPPOAGPDDVREFAIKRIMTPIADARA**
 269 **ITVDRCFAPRPSG-RINGFADEQVSVGCGEHDIDISRSRFIGAHDCPINIRGTVRVIEFSDNRELALRFMHQTEGEBKFFIGDYSIIVDSSTLAVVKCKV**
 282 **ITMDVFCAPRPSG-RLLRASADMHPSCGEGVIIDSCVPAQDDEPNVHGTNRAIRKEDAOFLALRPMHOSYGPRAFPGLDVAIRRAADMERFASAT**
 284 **IGDQVAVCIQNDPPIYFTQADASHFPGCCGLTVSGLIEGLOEADHNVHGTREVIKAVDDHDLGRFMHDSMGPRVGPDDVQSVRSETMELICKQO**
 285 **IGPADWIIEN-YSKKRVLSGHDDGPEFNQCSGLLXIECSWAGLMDPINIRHGTREVIHSPTRHCKPQMDSECMGPRDDEYIGIBIKIMRTVIG-**
 416 QVTAYDQCGCHDINKELTMTVTEDRPVQACVETG-GVYVENIATPVEVSCVEMVPTGILEVTIPEPVEHICREDCNGBASHTVCADAWYEGCRVADL
 373 KEAKLYTR-----ENGLILSSPLSSEMCOOKDQIENVTPPEVMTNNYKARVPIRIGLITIKRSTIGNTFYQNMSCHEVADCGLSWYEGCPVHOL
 385 -----VEDVRIIBORIVEVEFDIDTSELN-HDCVENMCTVEVERNSYFRTSRTGLVTRKVIENKNTYKTCHEAIIYADAWYEGSORVKOV
 389 IFAIR--GVKGEIQGAKESITKKAIDPAKESKSPGKENIHWPELMPAGNTLANNKARCTCPBPCKGVVEMLPDNTGTAALCOGCEGMEKSCSDV
 387 -----KMNPEALNKAPELIELSVPLPAGVEAEVLENLACSDPAEENYCEGSSCRACQLVADKAVIENVPESSCSALLIAGDANAWYEGSORVQDV
 520 **TIROMSPFR-----PSGPIVIFVFIHQVADPAPTEVHN-----HSMHNSDEDIGDVTYVNAKSVGCPAFICHTVRELDGADHPPTSTPLVPHGSSGCRJAR**
 469 **TIROMTFN-----CGEPIISIDENRKYGAVHNT-----KREYPMREKSSCARAKVPCQIRIMVYLSLEENKESDFIQMYCNEVTEKFR**
 481 **LIKGNIFDCAYN--GGPCGNVIAIENKIDAEPTQD-----HEDNIFRFDYPIYAKSTADLFRMTIVREIEFPAASGNPYVFMGCKKAVTEG**
 492 **IRNMFEM-ALYMFQPIYAVISIPEPTPKDQOKVZBGGKDDGVIENDEPDTFADPHIYAKSVDFIRNVIKTNTEKPPPNKDRERLERTVTKVISE**
 482 **IRNNDPIYFCNSSIYQCEAVISICEIPTQKYPERN-----IMHNDNPHFDYPIIENASVGLFESSNLIIDTYOPYVYKKEGILKACRSTVLSN**
 612 NHYDKGLNTEVYTD-----
 561 VOLHLEK-----
 579 TVFKGETPQSIKIKENMKRDLKTIK-----
 596-----
 582 NAIKEDYLGRIITIEKMKKPDVYKISNPFYKLEK

DAVER 7

DAVER 9

Figura 16

```

1  MGTATAQPAL RPQTSTVIGG LHGAAVLDNT GRTVIDVTFD GADPSGKADS
51  AAASVSAAMAH AKTVGGPTTL HEPTGTYHED PEPTPKRELY VSNTVGSQQA
101 FRTKNIGILV EDMRDVVVDG GGSRIVNHGF QIVFAAIRSS DVRETFESQT
151 WVAPKTVQIT VADAGVVSQO AYRIIDIPET YDYAVEGTSV RWNGERGPAI
201 GQPYWTGTNS FDYSQVHDPK TNRTWRISNP VFPERHEDHR PRRRQVRITY
251 GDSTAPGDRG YVYQOMREVTR DTPGALFVES SRVTVDHLRL GYLHG SRVQ
301 QSSDIDIC YQK DRGSG RVTSGFADHI QMSGVKGTWR ITNSVEDNPO
351 DDP IN HG TY LQATAAERET LQLRYMHNET SGFPQFYPGD TIELVDKRTM
401 LAAPGATAKV VSVTGP TGSG VFAGTDPDTY LRTMTVVLDL TLPAAVLAAP
451 GDYVAENTTY TPTVEITGNT EQAVPTRGIL VTRRPVRIE NNRFDGMSMA
501 SIYISSDARS WYESGPVRNV TIRGNVEDRP ASPVIFEDPT NQDFVAGO Q
551 IR ED ND FNLTGGTILS GRGVGGLTFR DNRVERYPHL RLTCPSRALR
601 VGDITTVTTD APPPSHTSPE FTFDGADDIT LANNTYGNCF NKRVTANMD
651 VSEITVTADG LALNADSISS APVAVSYSSS RPKVATVDSE GVVKALSGGT
701 TSETARATIG GVRVTSNPVK VVVATER

```


FIG.17

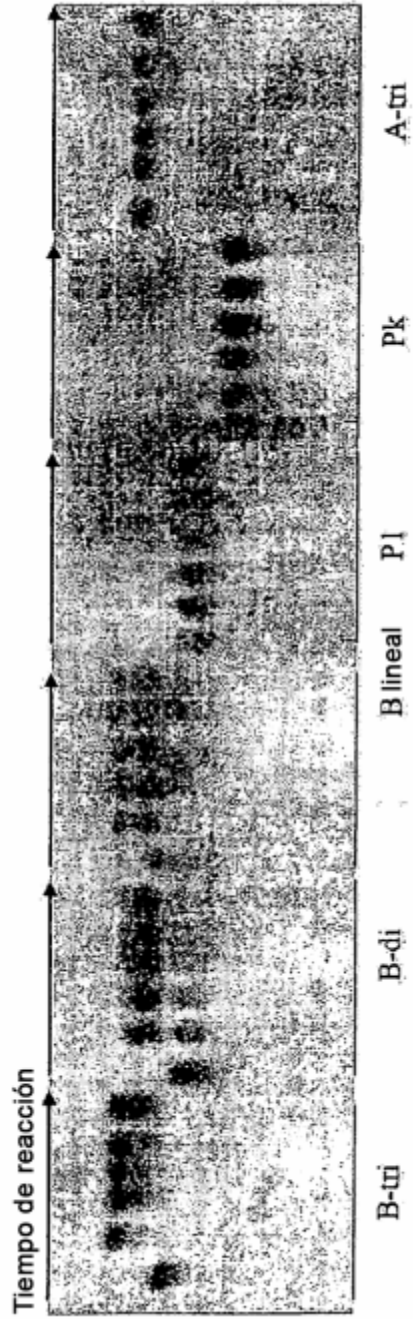


FIG. 18

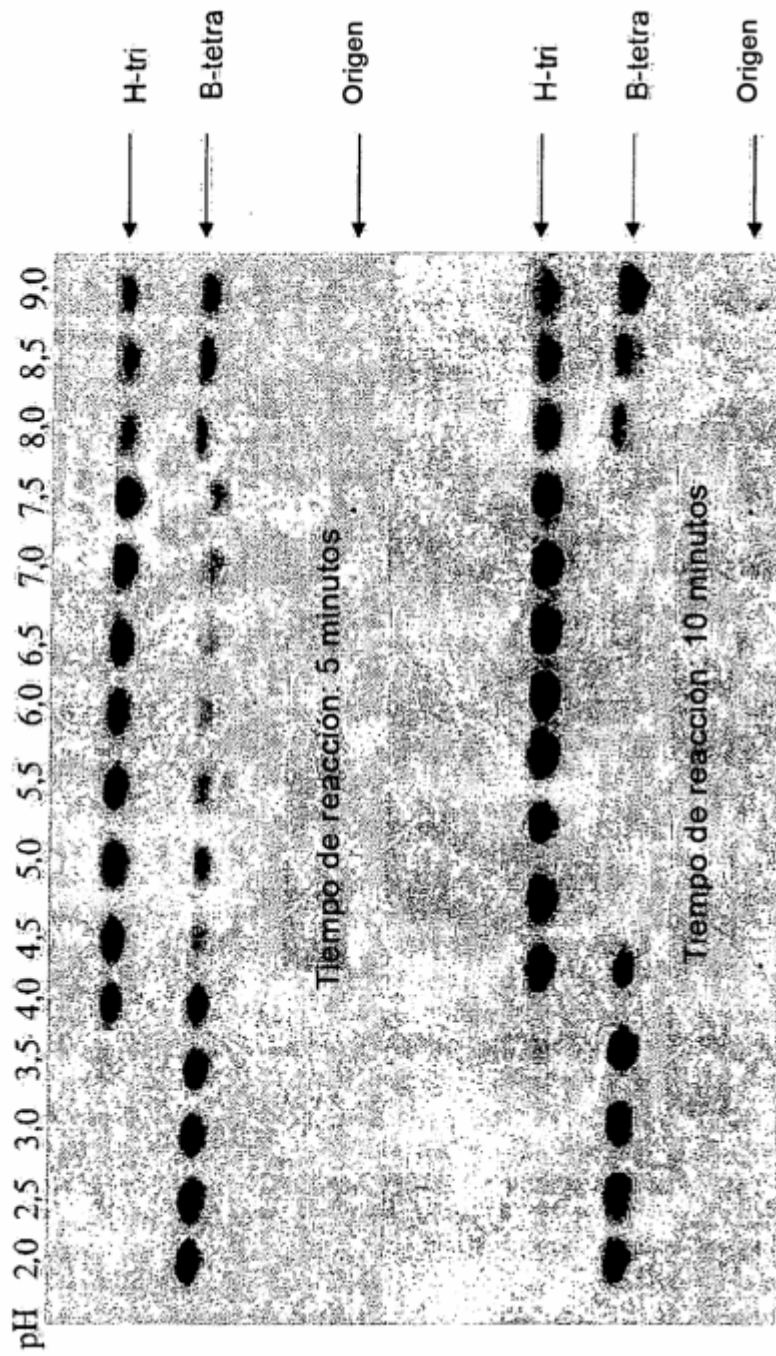


FIG. 19

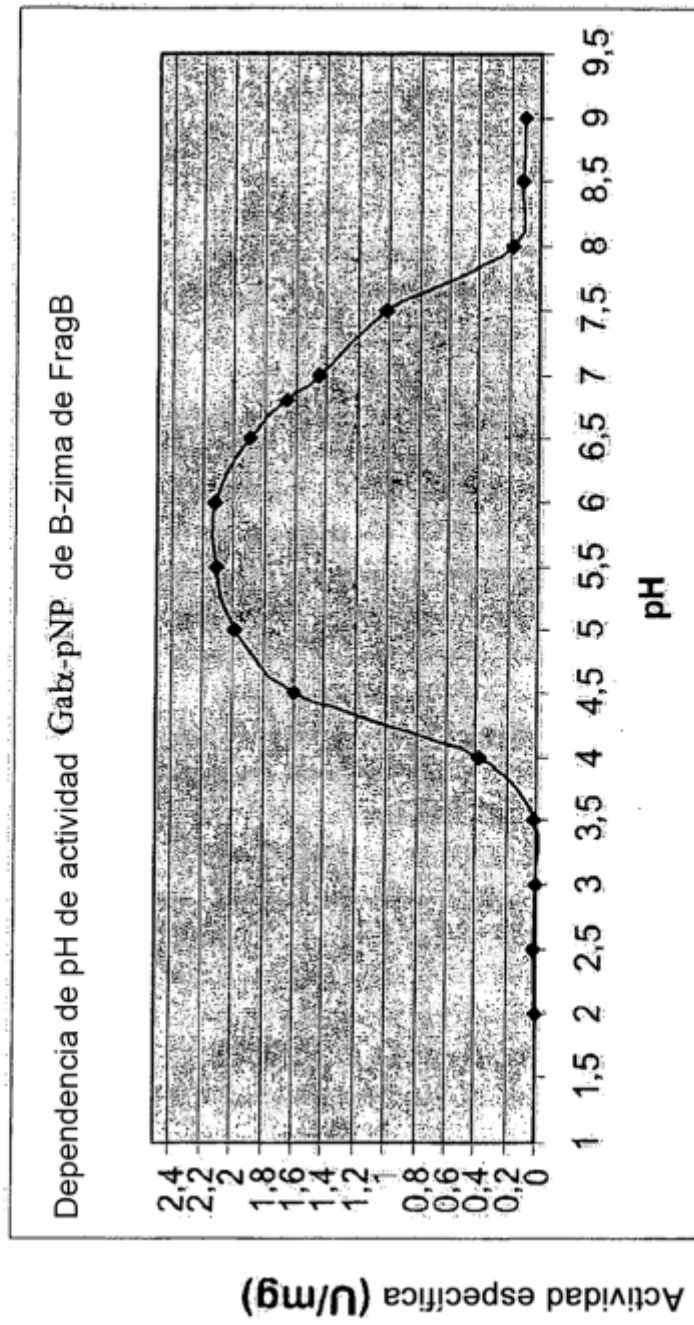


Figura 20

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



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

