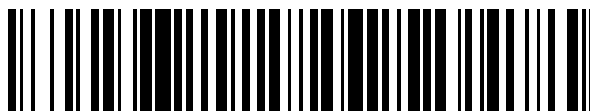


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 134**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2003 E 03815291 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1575534**

54 Título: **A 4,5-glicuronidasa y usos de la misma**

30 Prioridad:

**03.05.2002 US 377488 P**

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

**29.08.2013**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)  
77 MASSACHUSETTS AVENUE  
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**MYETTE, JAMES R.;  
SHRIVER, ZACHARY;  
VENKATARAMAN, GANESH;  
SASISEKHARAN, RAM y  
MCLEAN, MAITLAND W.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 421 134 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

Δ 4,5-glicuronidasa y usos de la misma.

## Campo de la invención

5 La invención se refiere a Δ 4,5-glicuronidasa y usos de la misma. En particular, la invención se refiere a Δ 4,5-glicuronidasa sustancialmente pura que es útil para una variedad de fines, incluyendo análisis de glicosaminoglicanos (los GAG), secuenciación, identificación, cuantificación y purificación de glicosaminoglicanos presentes en una muestra, eliminación de glicosaminoglicanos, tales como heparina, de una disolución e inhibición de angiogénesis, control de la coagulación, etc. La invención también se refiere a métodos de tratamiento del cáncer e inhibición de proliferación celular y/o metástasis usando Δ 4,5-glicuronidasa y/o fragmentos de GAG producidos por escisión enzimática con Δ 4,5-glicuronidasa.

## Antecedentes de la invención

15 Los glicosaminoglicanos (los GAG) son polisacáridos ácidos lineales que existen ubicuamente en la naturaleza como residentes de la matriz extracelular y en la superficie celular de muchos organismos diferentes de filogenia divergente [Habuchi o. (2.000) *Biochim Biophys Acta* 1.474, 115-27; Sasisekharan, R., Bulmer, M., Moremen, K. W., Cooney, C. L. y Langer, R. (1.993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3.660-4]. Además de una función estructural, los GAG actúan como moduladores críticos de una serie de procesos de señalización bioquímica [Tumova, S., Woods, A. y Couchman, J. R. (2.000) *Int J Biochem Cell Biol* 32, 269-88] requisito para crecimiento y diferenciación celular, adhesión y migración celular y morfogénesis de tejidos.

20 Los glicosaminoglicanos tipo heparán sulfato (los GAG o los HSGAG) están presentes tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular. Los glicosaminoglicanos de tipo heparina son componentes importantes de la matriz extracelular que se cree que regulan una amplia variedad de actividades celulares incluyendo invasión, migración, proliferación y adhesión (Khodapkar, et al. 1.998; Woods, et al., 1.998). Los HSGAG realizan algunas de estas funciones por unión a, y regulando las actividades biológicas de, diversas moléculas, incluyendo factores de crecimiento, morfógenos, enzimas, proteínas extracelulares. Los HSGAG son un grupo de polisacáridos complejos de longitud variable, que consisten en una unidad disacárida de repetición constituida por glucosamina y un ácido urónico (ácido idurónico o glucurónico). El alto grado de complejidad para los HSGAG no sólo surge de su polidispersidad y la posibilidad de dos componentes de ácido urónico diferentes, sino también de la modificación diferencial en cuatro posiciones de la unidad disacárida. Tres posiciones, a saber, C2 del ácido urónico y las posiciones C3, C6 de la glucosamina pueden ser O-sulfatadas. Además, C2 de la glucosamina puede ser N-acetilada o N-sulfatada. Además, estas modificaciones podían conducir teóricamente a 32 posibles unidades disacáridas, haciendo los HSGAG potencialmente más densos en información que cualquier ADN (4 bases) o proteínas (20 aminoácidos). Es esta inmensidad de posibles variantes estructurales lo que permite que los HSGAG estén implicados en un gran número de procesos biológicos diversos, incluyendo angiogénesis (Sasisekharan, R., Moses, M. A., Nugent, M. A., Cooney, C. L. y Langer, R. (1.994) *Proc Natl Acad Sci USA*, 1.524-8.), embriogénesis (Binari, R. et al (1.997) *Development*, 2.623-32; Tsuda, M., et al. (1.999) *Nature*, 276-80. y Lin, X., et al (1.999) *Development*, 3.715-23.) y la formación de fibrillas-β en la enfermedad de Alzheimer (McLaurin, J., et al (1.999) *Eur J Biochem*, 1.101-10. y Lindahl, B., et al (1.999) *J Biol Chem*, 30.631-5).

40 Un ejemplo específico de un HSGAG es heparina. La heparina, un HSGAG altamente sulfatado producido por los mastocitos, es un anticoagulante clínico usado extensamente y es uno de los cebador os fármacos biopoliméricos y uno de los pocos fármacos de carbohidratos. La heparina provoca principalmente su efecto por dos mecanismos, implicando los dos la unión de antitrombina III (AT-III) a una secuencia de pentasacáridos específica,  $H_{NAC/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$  contenida dentro del polímero. Los HSGAG han surgido también como piezas clave en una serie de procesos biológicos que oscilan desde angiogénesis [Folkman, J., Taylor, S. y Spillberg, C. (1.983) *Ciba Found Symp* 100, 132-49] y biología del cáncer [Blackhall, F. H., Merry, C. L., Davies, E. J. y Jayson, G. C. (2.001) *Br J Cáncer* 85, 1.094-8] a patogénesis microbiana [Shukla, et al (1.999) *Cell* 99, 13-22]. Los HSGAG también han mostrado recientemente que desempeñan una función fundamental en múltiples aspectos de desarrollo [Perrimon, N. y Bernfield, M. (2.000) *Nature* 404, 725-8]. La capacidad de los HSGAG para disponer múltiples procesos biológicos es probablemente de nuevo una consecuencia de su complejidad estructural y densidad de información [Sasisekharan, R. y Venkataraman, G. (2.000) *Curr Opin Chem Biol* 4, 626-31].

50 Aunque la estructura y la química de los HSGAG se entienden bastante bien, la información sobre cómo las secuencias de HSGAG específicas modulan diferentes procesos biológicos se ha demostrado más complicada de obtener. La determinación de esta secuencia de HSGAG se ha cuestionado técnicamente. Los HSGAG están presentes de manera natural en cantidades muy limitadas, que, a diferencia de otros biopolímeros tales como proteínas y ácidos nucleicos, no se pueden multiplicar fácilmente. Segundo, debido a su carácter altamente cargado y heterogeneidad estructural, los HSGAG no se aíslan fácilmente de fuentes biológicas en un estado altamente purificado. Adicionalmente, la ausencia de herramientas específicas de la secuencia para escindir los HSGAG de una manera análoga a secuenciación o mapeo de restricción de ADN ha hecho un reto la secuenciación.

Recientemente, en un esfuerzo para desarrollar un entendimiento de la estructura de HSGAG, se ha puesto el

enfoque en la clonación y caracterización de las enzimas implicadas en la biosíntesis de HSGAG. Otra estrategia para elucidar la estructura de los HSGAG ha sido emplear procedimientos de degradación de HSGAG específicos, incluyendo escisión química o enzimática, junto con metodologías analíticas, incluyendo electroforesis de gel o HPLC, para secuenciar los HSGAG. Recientemente, se ha introducido un procedimiento de secuenciación que acopla un entramado bioinformático con procedimientos de espectrometría de masas y electroforéticos capilares para secuenciar rápidamente los HSGAG biológicamente importantes, incluyendo secuencias de sacáridos implicadas en la modulación de anticoagulación. La metodología de secuenciación usa herramientas químicas y enzimáticas para modificar o degradar un polímero de glicosaminoglicano desconocido de una manera específica de la secuencia. (Venkataraman, G., et al., *Science*, 286, 537-542 (1.999) y Solicitudes de Patente de EE.UU. Nos. de Serie 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 2.000, con propiedad de la invención común)

### Sumario de la invención

Se ha clonado  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa a partir del genoma *F. heparinum* y se ha realizado su posterior expresión recombinante en *E. coli* como una enzima muy activa, soluble. Así, en un aspecto la presente invención proporciona una  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas a un ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4. En una realización de la invención, la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura es una glicuronidasa producida de manera recombinante. La expresión recombinante se puede realizar en una realización con un vector de expresión. Un vector de expresión puede ser un ácido nucleico para la SEC ID N°: 2 opcionalmente unido de manera operable a un activador. En otra realización, el vector de expresión puede ser un ácido nucleico para la SEC ID N°: 4 o una variante del mismo también opcionalmente unida a un activador. En otra realización, el vector de expresión puede ser una molécula de ácido nucleico que codifique la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3. En una realización, la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura se produce usando una célula huésped que comprende el vector de expresión. En otra realización, la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura es una glicuronidasa sintética.

En otro aspecto, la glicuronidasa de la invención es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 o una variante funcional de la misma. En otro aspecto más, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 o una variante funcional de la misma.

En otro aspecto más de la invención, el polipéptido de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa es un polipéptido aislado. El polipéptido aislado en algunas realizaciones se muestra en la SEC ID N°: 1 o es una variante funcional de la misma. En otras realizaciones, el polipéptido aislado se muestra en la SEC ID N°: 3 o una variante funcional de la misma.

En un aspecto, la invención es una composición que comprende una glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada aislada con una actividad específica mayor que la glicuronidasa natural. En algunas realizaciones, la actividad específica es al menos aproximadamente 60 picomoles de sustrato hidrolizado por minuto por picomol de enzima. En una realización, la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa tiene una actividad específica que es aproximadamente 2 veces mayor que la enzima natural. En otra realización, la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa tiene una actividad específica que es aproximadamente 3 veces mayor. La actividad específica de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa en otras realizaciones puede ser aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o cualquier número entero intermedio de veces mayor que la actividad de la enzima natural.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada. El ácido nucleico es (a) moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos mostrada como la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4 y que codifican la glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada con una secuencia de aminoácidos mostrada como la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3, respectivamente, (b) moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico de (a) en secuencia de codones debido a degeneración del código genético o (c) complementos de (a) o (b). En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada codifica la SEC ID N°: 1. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEC ID N°: 2. En otras realizaciones más, la molécula de ácido nucleico aislada codifica la SEC ID N°: 3 y en otras realizaciones más la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEC ID N°: 4.

También se incluyen en las composiciones de la invención farmacéuticas según cualquiera de las composiciones o vectores descritos en la presente memoria.

En otros aspectos, la invención se refiere a un método para escindir un glicosaminoglicano con una glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada. El método se puede realizar poniendo en contacto un glicosaminoglicano con la glicuronidasa en una cantidad eficaz para escindir el glicosaminoglicano. En una realización, la invención es un glicosaminoglicano preparado según este método.

En otros aspectos, la invención también proporciona un método *in vitro* para escindir un glicosaminoglicano constituido por al menos una unidad disacárida. El método se puede realizar poniendo en contacto el glicosaminoglicano con una glicuronidasa de la invención en una cantidad eficaz para escindir el glicosaminoglicano. En algunas realizaciones, el glicosaminoglicano es un sacárido de cadena larga. En otras realizaciones el glicosaminoglicano no contiene un uronidato 2-O sulfatado o no contiene glicosamina N-sustituida. En otra

realización más, el glicosaminoglicano es 6-0 sulfatado. Las unidades disacáridas en algunas realizaciones son  $\Delta\text{UH}_{\text{NAc}}$ ;  $\Delta\text{UH}_{\text{NAc,6S}}$ ;  $\Delta\text{UH}_{\text{NS,6S}}$  o  $\Delta\text{UH}_{\text{NS}}$ . En otra realización, la invención también proporciona los productos de la escisión de un glicosaminoglicano con la  $\Delta\text{4,5}$ -glicuronidasa. En algunas realizaciones la glicuronidasa se usa para generar una LMWH.

5 La presente invención también proporciona métodos para el análisis de glicosaminoglicano. En un aspecto, la invención es un método para analizar un glicosaminoglicano poniendo en contacto un glicosaminoglicano con la glicuronidasa de la invención en una cantidad eficaz para analizar el glicosaminoglicano. En una realización, el método es un método para identificar la presencia de un glicosaminoglicano particular en una muestra. En otra  
10 realización, el método es un método para determinar la identidad de un glicosaminoglicano en una muestra. En otra realización más, el método es un método para determinar la pureza de un glicosaminoglicano en una muestra. En otra realización más, el método es un método para determinar la composición de un glicosaminoglicano en una muestra. En otra realización, el método es un método para determinar la secuencia de unidades sacáridas en un glicosaminoglicano. En otras realizaciones, estos métodos también pueden comprender una técnica analítica adicional tal como espectrometría de masas, electroforesis en gel, electroforesis capilar y HPLC. En algunas  
15 realizaciones el glicosaminoglicano es LMWH.

En otros aspectos, la invención es un método *in vitro* de eliminación de heparina de un fluido que contiene heparina poniendo en contacto un fluido que contiene heparina con una glicuronidasa de la invención en una cantidad eficaz para retirar heparina del fluido que contiene heparina. En una realización, la glicuronidasa se inmoviliza sobre un soporte sólido. En otra realización, también se proporciona una heparinasa y también se inmoviliza la heparinasa sobre el soporte sólido.  
20

En otro aspecto la invención es un método para inhibir la angiogénesis por administración a un individuo con necesidad de la misma de una cantidad eficaz de cualquiera de las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria para inhibir la angiogénesis.

En otro aspecto también se proporciona un método de tratamiento del cáncer por administración a un individuo con necesidad de la misma de una cantidad eficaz de cualquiera de las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria para tratar el cáncer.  
25

Otro aspecto más de la invención es un método para inhibir la proliferación celular por administración a un individuo con necesidad de la misma de una cantidad eficaz de cualquiera de las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria para inhibir la proliferación celular.

30 En otro aspecto un método para tratar una enfermedad de la coagulación por administración a un individuo con necesidad de la misma de una LMWH preparada usando la glicuronidasa de la invención.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención la glicuronidasa se usa al mismo tiempo con o después de tratamiento con heparinasa.

En otros aspectos de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos usando la glicuronidasa  $\Delta\text{4,5}$ -insaturada y los fragmentos de GAG escindidos solos o en combinación.  
35

Otros aspectos de la invención proporcionan composiciones que incluyen otras enzimas tales como heparinasa con la glicuronidasa  $\Delta\text{4,5}$ -insaturada.

En otros aspectos, se proporciona una preparación farmacéutica de una composición o vector de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

40 Cada una de las limitaciones de la invención puede incluir diversas realizaciones de la invención. Se prevé, por lo tanto, que pueda estar incluida cada una de las limitaciones de la invención que implique un elemento o combinaciones de elementos cualesquiera en cada aspecto de la invención.

### Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 representa la purificación de  $\Delta\text{4, 5}$ -glicuronidasa de *Flavobacterium* y la proteólisis resultante. A. Cromatografía de filtración en gel de la enzima purificada. B. Purificación de  $\Delta\text{4, 5}$  péptidos por HPLC de fase inversa después de tripsinización de la proteína natural. C. Secuencia de aminoácidos de péptidos seleccionados aislados en B. Los picos 8, 12, 13, 19, 24 y 26 son las SEC ID Nos: 18-23, respectivamente.

50 La Figura 2 proporciona un mapa esquemático de clones  $\Delta\text{4, 5}$  genómicos. A. Se aislaron clones G5A y G5H carboxi-terminales parciales (flechas negras) detección sistemática de hibridación de una biblioteca *Flavobacteriana*  $\lambda\text{ZAP}$  usando las sondas 1 y 2, respectivamente. También se muestra el sitio de restricción Eco RI que delimita el extremo 5' de G5A. B. Estrategia para obtener el término  $\Delta\text{4, 5 5'}$  por hibridación Southern. Se muestra el autoradiograma y su correspondiente mapa de restricción. Se restringió el ADN genómico con Eco RI solo (línea 1) o como un doble digerido con Hind III (línea 2), Bam H1 (línea 3) o Bgl II (línea 4), respectivamente. Se multiplicó la sonda 3 de hibridación de ADN usada por PCR usando los cebadores 68 y 74 N-terminales, ambos de los cuales

son 5' para el sitio Eco R1. Se aisló el fragmento de ADN de Bgl II-Eco R1 de ~1,5 kb (barra gris) para subclonación y secuenciación de ADN. C. Representación esquemática del gen  $\Delta 4, 5$  de longitud completa (1,2 kb) recopilado de clones superpuestos mostrados en A. y B.

5 La Figura 3 representa la secuencia génica de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa. Se aisló gen de longitud completa usando métodos esbozados en la Figura 2. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se proporcionan en las SEC ID Nos: 3 y 4, respectivamente. Aquí se muestran ambas secuencias de ADN codificadora y flanqueadora. La CDS (secuencia codificadora) de 1.209 pares de bases contiene una ORF que codifica una proteína putativa de 402 aminoácidos. Los codones de iniciación y terminación se destacan en negrita. Una posible secuencia de Shine-Dalgarno (SD) está en un recuadro. Se subraya la secuencia de señal presumida y se delimita su sitio de escisión por una flecha vertical. El sitio de restricción Eco R1 está doblemente tachado. También se muestran los pares de cebadores degenerados (mostrado como flechas) usados para multiplicar mediante PCR las sondas 1 y 2 de hibridación de ADN así como las posiciones relativas de  $\Delta 4, 5$ -péptidos purificados (sombreado en gris) para lo que se obtiene información directa de las secuencias.

15 La Figura 4 ilustra los análisis de secuencias primarias de  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa. A. Gráfica de hidropatía (Kyte-Doolittle). Los valores positivos representan aumento de hidrofobicidad. B. Determinación de secuencias de señales teórica usando 1-65 aminoácidos. Se calcularon los índices usando SignalP V.1.1 que usa redes competentes sobre bacterias gram-negativas. El sitio de escisión putativo situado entre G20 y M21 se representa por una flecha vertical. C. Alineación múltiple CLUSTAL W de  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa de longitud completa con glucuronilhidrolasas seleccionadas. Se seleccionaron secuencias de proteínas a partir de una búsqueda mediante BLASTP inicial de la base de datos de proteínas. Los aminoácidos idénticos están sombreados en gris oscuro, posiciones invariantes cercanas en carboncillo y las sustituciones conservadoras en gris claro. Los números de acceso al Gen Bank son como sigue: *Bacillus* sp. (AB019619); *Streptococcus pneumoniae* (AE008410); *Streptococcus pyogenes* (AE006517); *Agaricus bisporus* (AJ271692); *Bactobacillus halodurans* (AP001514).

25 La Figura 5 proporciona resultados de la expresión y purificación de proteínas  $\Delta 4, 5^{\Delta 20}$  recombinantes. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se proporcionan como SEC ID Nos: 1 y 2, respectivamente. SDS-PAGE de fracciones de proteínas  $\Delta 4, 5$  en diversas fases de purificación después de la expresión en BL21 (DE3) como una proteína de fusión N-terminal 6XHis. Se muestra aquí un gel al 12% que se tiñó con azul brillante de Coomassie. Línea 2, lisado de células bacterianas no inducidas; Línea 3, lisado de células brutas de cultivos inducidos; Línea 4, purificación por cromatografía de quelación de  $\text{Ni}^{+2}$ ; Línea 5, escisión de trombina para retirar la etiqueta de purificación 6X His N-terminal. También se indican los marcadores de peso molecular (Líneas 1 y 6).

30 La Figura 6 representa los efectos de las condiciones de reacción bioquímica de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa. A. Titulación [NaCl]; B. Efecto de la temperatura de reacción C. perfil de pH. Las actividades relativas de las enzimas derivaron de las relaciones iniciales normalizadas para NaCl 100 mM (A) o 30°C (C). Se extrapolaron los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$  para el perfil de pH de la cinética de Michaelis-Menten como se describe en los Métodos (y la Figura 8). Se usó  $\Delta \text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}$  de disacárido de heparina disulfatado en los tres experimentos.

35 La Figura 7 representa una comparación cinética de enzimas naturales y recombinantes. Se midieron las actividades específicas relativas para ambas fracciones de enzimas en condiciones de reacción idénticas que incluían enzima 200 nM y 500  $\mu\text{M}$  del sustrato de disacárido de heparina ( $\Delta \text{UHNAc}$ ).  $\Delta 4, 5$  flavobacteriano (círculos rellenos);  $\Delta 4, 5$  recombinante (círculos vacíos).

40 La Figura 8 ilustra la especificidad del sustrato de disacárido. A. Perfiles cinéticos para disacáridos de heparina de sulfatación variable. Se determinaron las velocidades iniciales usando enzima 200 nM en condiciones estándar. Se ajustaron las curvas  $V_0$  frente a [S] para cinéticas de equilibrio de Michaelis-Menten usando un análisis de mínimos cuadrados no lineal. B. Representación de Lineweaver-Burke de los datos mostrados en A.  $\Delta \text{UH}_{\text{NAc},6\text{S}}$  ( $\lambda$ );  $\Delta \text{UH}_{\text{NAc}}$  (O);  $\Delta \text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}$  ( $\sigma$ );  $\Delta \text{H}_{\text{NS}}$  ( $\Delta$ );  $\Delta \text{UH}_{\text{NH}_2,16\text{S}}$  (+)  $\Delta \text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS}}$  (+, no actividad).

45 La Figura 9 representa el uso en tándem de heparinasas y  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa en análisis composicional de HSGAG. Se digirieron de manera exhaustiva 200  $\mu\text{g}$  de heparina con heparinasas I, II y III, después de lo cual se añadió  $\Delta 4, 5$  durante una extensión de tiempo variable. Se resolvieron productos disacáridos por electroforesis capilar. La designación de la composición de sacáridos mostrada para cada pico se confirmó por MALDI-MS. A., menos control de  $\Delta 4, 5$  enzima; línea discontinua, B., minuto (parcial)  $\Delta 4, 5$  incubación; C, 30 minuto (exhaustivo)  $\Delta 4, 5$  incubación.

## 50 Descripción detallada de la invención

La invención en algunos aspectos se refiere a  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa, formas sustancialmente puras de la misma con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas a un ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 y usos de la misma. En particular la invención surgió, en parte, de la clonación de  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa que permite ahora que un experto produzca la enzima en grandes cantidades y en forma sustancialmente pura. La invención también proporciona otra herramienta que se puede usar para determinar la estructura de los glicosaminoglicanos y ayudar a elucidar su papel en procesos celulares. Ahora también se ha descubierto que se pueden producir preparaciones

sustancialmente puras de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que tienen mayor actividad específica que la enzima producida del cultivo. La invención también proporciona escisión de glicosaminoglicanos (los GAG) así como el análisis de una muestra de los GAG y su secuenciación. Esta presente invención también proporciona métodos de tratamiento y prevención para el cáncer por el control de trastornos de proliferación celular, angiogénesis y/o coagulación con la enzima y/o sus productos de escisión (fragmentos GAG).

Un aspecto de la invención permite a un experto en la materia, a la luz de la presente descripción, producir preparaciones sustancialmente puras de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa por tecnología estándar, incluyendo tecnología recombinante, síntesis directa, mutagénesis, etc. Por ejemplo, usando tecnología recombinante se pueden producir preparaciones sustancialmente puras de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 o está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 2. En otros aspectos de la invención se pueden preparar preparaciones sustancialmente puras de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que tiene las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 o está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 4. Un experto en la materia también puede sustituir codones apropiados para producir las sustituciones de aminoácidos deseadas en las SEC ID Nos: 1 ó 3 por técnicas de mutagénesis sitio dirigidas clásicas. También se puede usar cualquier secuencia que difiera de los equivalentes de los ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 1 ó 3 sólo debido a la degeneración del código genético como punto de partida para mutagénesis sitio dirigida. La secuencia de ácidos nucleicos mutada puede estar ligada entonces a un vector de expresión apropiado y se expresa en un huésped tal como *E. coli*. La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa resultante se puede purificar después por técnicas, incluyendo las desveladas a continuación.

Como se usa en la presente memoria, el término "sustancialmente puro" significa que las proteínas están esencialmente exentas de otras sustancias en una extensión práctica y apropiada para su uso deseado. En particular, las proteínas son suficientemente puras y están suficientemente exentas de otros constituyentes biológicos de sus células huésped a fin de que sea útil en, por ejemplo, secuenciación de proteínas o producción de preparaciones farmacéuticas.

Como se usa en la presente memoria, una "glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada sustancialmente pura" es una preparación de glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada que se ha aislado o sintetizado y que está más de aproximadamente 90% exenta de contaminantes. Un contaminante es una sustancia con que se asocia de manera ordinaria la glicuronidasa  $\Delta 4,5$ -insaturada en la naturaleza que interfiere con la actividad de la enzima. Preferiblemente, el material está más de aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso más de aproximadamente 99% exento de contaminantes. El grado de pureza se puede valorar por medios conocidos en la técnica. Un método para valorar la pureza del material se puede realizar por el uso de ensayos de actividad específicos. La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa natural que se ha descrito en la técnica anterior como que se aísla de *F. heparinum* presenta baja actividad específica debido a impurezas inherentes a la extracción de la enzima de cultivos bacterianos de *F. heparinum*.

La invención también proporciona polipéptidos aislados (incluyendo proteínas completas y proteínas parciales) de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y variantes funcionales de la misma. También se proporcionan polipéptidos aislados por la invención que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se pueden aislar polipéptidos de muestras biológicas y también se pueden expresar recombinantemente en una variedad de sistemas de expresión de procariontas y eucariotas por construcción de un vector de expresión apropiado para el sistema de expresión, introducción del vector de expresión en el sistema de expresión y aislamiento de la proteína expresada recombinantemente. También se pueden sintetizar químicamente polipéptidos usando métodos establecidos de síntesis peptídica.

Como se usa en la presente memoria con respecto a los polipéptidos, "aislado" significa separado de su entorno natural y está presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Aislado, cuando se refiere a una proteína o polipéptido, significa, por ejemplo (i) producido de manera selectiva por clonación de expresión o (ii) purificado como por cromatografía o electroforesis. Las proteínas o los polipéptidos aislados pueden ser, pero no es necesario que sean, sustancialmente puros. Debido a que se puede mezclar un polipéptido aislado con un portador farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El polipéptido se aísla sin embargo por que se ha separado de las sustancias con que puede estar asociado en sistemas vivos, es decir, aislado de otras proteínas.

Así el término "polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa" incluye variantes así como los polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que se encuentran en la naturaleza. Como se usa en la presente memoria, una "variante" de un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa es un polipéptido que contiene una o más modificaciones para la secuencia de aminoácidos principal de un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa natural. Las variantes incluyen polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa modificados que no tienen modificada la función relativa al polipéptido de la secuencia (que se encuentra de forma natural) no modificada. Las variantes también incluyen polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa con función modificada. Típicamente se hacen modificaciones que crean una variante de polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa al ácido nucleico que codifica el polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa y pueden incluir deleciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adición de aminoácidos o restos no de aminoácidos para: 1) mejorar una propiedad de un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, tal como estabilidad proteínica en un sistema de expresión o la estabilidad de unión proteína-proteína; 2) proporcionar una nueva actividad o

propiedad a un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, tal como adición de un resto detectable o 3) proporcionar interacción equivalente o mejor con otras moléculas (por ej., heparina). Alternativamente, se pueden hacer modificaciones directamente al polipéptido, tal como por escisión, adición de una molécula ligadora, adición de un resto detectable, tal como biotina, adición de un ácido graso y similares. Las modificaciones también incluyen proteínas de fusión que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa. Un experto en la materia conocerá métodos para predecir el efecto en la conformación de proteínas de un cambio en la secuencia de proteínas y puede así "designar" un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa variante según métodos conocidos. Un ejemplo de dicho método se describe por Dahiyat y Mayo en Science 278: 82-87, 1.997, según lo cual se pueden diseñar proteínas de nuevo. El método se puede aplicar a una proteína conocida para variar sólo una porción de la secuencia de polipéptidos. Aplicando los métodos computacionales de Dahiyat y Mayo, se pueden proponer y ensayar variantes específicas de un polipéptido para determinar si la variante retiene una conformación deseada.

Las variantes pueden incluir polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que se modifican específicamente para modificar una característica del polipéptido no relacionada con su actividad fisiológica. Por ejemplo, se pueden sustituir o suprimir restos de cisteína para evitar enlaces disulfuro no deseados. De manera similar, se pueden cambiar algunos aminoácidos para mejorar la expresión de un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa por eliminación de la proteólisis por proteasas en un sistema de expresión (por ej., restos de aminoácidos dibásicos en sistemas de expresión de levaduras en que está presente la actividad de la proteasa KEX2).

Las mutaciones de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa conservan preferiblemente el marco de lectura de los aminoácidos de la secuencia codificadora y preferiblemente no crean regiones en el ácido nucleico que probablemente se tienen que hibridar para formar estructuras secundarias, tales como horquillas o bucles, que pueden ser perjudiciales para la expresión del polipéptido variante.

Se pueden realizar mutaciones seleccionando una sustitución de aminoácidos o por mutagénesis aleatoria de un sitio seleccionado en un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Después se expresan y se ensayan polipéptidos variantes para una o más actividades para determinar qué mutación proporciona un polipéptido variante con las propiedades deseadas. Se pueden realizar más mutaciones a variantes (o a polipéptidos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa no variantes) que son imperceptibles en cuanto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que proporcionan codones preferidos para traducción en un huésped particular. Los codones preferidos para traducción de un ácido nucleico en, por ej., *E. coli*, son conocidos para los expertos en la materia. Se pueden realizar otras mutaciones más para las secuencias no codificantes de un gen de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o clon de ADNc para mejorar la expresión del polipéptido.

Un tipo de sustitución de aminoácidos se refiere como una "sustitución conservadora." Como se usa en la presente memoria, una "sustitución de aminoácidos conservadora" o "sustitución conservadora" se refiere a una sustitución de aminoácidos en que el resto de aminoácidos sustituido es de carga similar a la del resto reemplazado y es de tamaño similar o más pequeño que el del resto reemplazado. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre los aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) los aminoácidos no polares pequeños, A, M, I, L y V; (b) los aminoácidos polares pequeños, G, S, T y C; (c) los amidoaminoácidos, Q y N; (d) los aminoácidos aromáticos, F Y y W; (e) los aminoácidos básicos, K, R y H y (f) los aminoácidos ácidos, E y D. Las sustituciones que son de carga neutra y que reemplazan un resto con un resto menor también se pueden considerar "sustituciones conservadoras" incluso si los restos están en diferentes grupos (por ej., sustitución de fenilalanina con la isoleucina más pequeña). El término "sustitución de aminoácidos conservadora" también se refiere al uso de análogos o variantes de aminoácidos.

Los métodos para realizar sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos son conocidos en la técnica. Los términos "sustitución conservadora", "sustituciones no conservadoras", "aminoácidos no polares", "aminoácidos polares" y "aminoácidos ácidos" se usan todos de manera sistemática con la terminología de la técnica anterior. Cada uno de estos términos es conocido en la técnica y se ha descrito de manera extensa en numerosas publicaciones, incluyendo libros de texto de bioquímica clásicos, tales como "Biochemistry" por Geoffrey Zubay, Addison-Wesley Publishing Co., edición de 1.986, que describe sustituciones conservadoras y no conservadoras y propiedades de aminoácidos que conducen a su definición como polar, no polar o ácido.

Un experto en la materia podrá predecir el efecto de una sustitución usando ensayos de detección sistemática de rutina, preferiblemente los ensayos biológicos descritos en la presente memoria. Se ensayan modificaciones de propiedades peptídicas incluyendo estabilidad térmica, actividad enzimática, hidrofobicidad, susceptibilidad a degradación proteolítica o la tendencia a agregarse con portadores o en multímeros por métodos conocidos para el experto generalmente. Para descripción detallada adicional de la química y estructura de las proteínas, véase Schulz, G. E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, Nueva York, 1.979 y Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1.984.

Adicionalmente, algunas de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En algunas realizaciones donde la sustitución es lejana desde los sitios activos o de unión, las sustituciones no conservadoras son toleradas fácilmente siempre que conserven una característica de estructura terciaria de o similar a,  $\Delta 4$ , 5 – glicuronidasa natural, conservando de ese modo los sitios activos y de unión. Las sustituciones no conservadoras,

tales como entre, más bien que dentro de, los grupos anteriores (u otros dos grupos de aminoácidos no mostrados anteriormente), que diferirán más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura de la cadena principal peptídica en el área de la sustitución (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

5 En otra serie de realizaciones un equivalente del ácido nucleico aislado de la SEC ID N°: 2 codifica la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura de la invención y variantes funcionales del mismo. En otras realizaciones más se proporcionan también los equivalentes del ácido nucleico aislados de la SEC ID N°: 4. Según la invención, se proporcionan las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa e incluyen: (a) moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas a una molécula seleccionada de un grupo que consiste en el equivalente del ácido nucleico de la SEC ID N°: 2 ó 4 y que codifica un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o partes del mismo, (b) deleciones, adiciones y sustituciones de (a) que codifican un respectivo polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o partes del mismo, (c) moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico de (a) o (b) en secuencia de codones debido a la degeneración del código genético y (d) complementos de (a), (b) o (c).

15 La invención también incluye degenerar ácidos nucleicos que incluyen codones alternativos a los presentes en los materiales naturales. Por ejemplo, se codifican restos serina por los codones TCA, AGT, TCC, TCG, TCT y AGC. Cada uno de los seis codones es equivalente para el fines de codificación de un resto serina. Así, será evidente para un experto en la materia que se puede emplear cualquiera de los tripletes de nucleótidos codificadores de serina para dirigir el aparato de síntesis de proteínas, *in vitro* o *in vivo*, para incorporar un resto serina en un polipéptido de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de elongación. De manera similar, los tripletes de secuencias de nucleótidos que codifican otros restos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a: CCA, CCC, CCG y CCT (codones de prolina); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA y AGG (codones de arginina); ACA, ACC, ACG y ACT (codones de treonina); AAC y AAT (codones de asparagina) y ATA, ATC y ATT (codones de isoleucina). Otros restos aminoácidos se pueden codificar de manera similar por múltiples secuencias de nucleótidos. Así, la invención incluye ácidos nucleicos degenerados que difieren de los ácidos nucleicos biológicamente aislados en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético.

Como se usa en la presente memoria con respecto a los ácidos nucleicos, el término "aislado" significa: (i) multiplicado *in vitro* por, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); (ii) producidos recombinantemente por clonación; (iii) purificados, como por escisión y separación en gel o (iv) sintetizados por, por ejemplo, síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Así, se considera aislada una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en que los sitios de restricción 5' y 3' son conocidos o para el que se han desvelado secuencias de cebador por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero no una secuencia de ácidos nucleicos que existe en su estado natural en su huésped natural. Un ácido nucleico aislado se puede purificar sustancialmente, pero no es necesario que lo sea. Por ejemplo, un ácido nucleico que se aísla dentro de un vector de clonación o de expresión no es puro por que puede comprender sólo un mínimo porcentaje del material en la célula en que reside. Dicho ácido nucleico se aísla, sin embargo ya que el término se usa en la presente memoria debido a que es fácilmente manipulable por técnicas habituales conocidas para los expertos en la materia.

Una realización de la invención proporciona  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que es producida recombinantemente. Dichas moléculas pueden ser producidas recombinantemente usando un vector incluyendo una secuencia codificadora unida de manera operable a una o más secuencias reguladoras. Como se usa en la presente memoria, se dice que una secuencia codificadora y las secuencias reguladoras están "unidas de manera operable" cuando están unidas mediante enlaces covalentes de tal manera que se ponga la expresión o transcripción de la secuencia codificadora bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias reguladoras se traduzcan en una proteína funcional se unen de manera operable las secuencias codificadoras a secuencias reguladoras. Se dice que dos secuencias de ADN están unidas de manera operable si resulta inducción de un activador en las secuencias reguladoras 5' en la transcripción de la secuencia codificadora y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no: (1) da como resultado la introducción de una mutación con desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región activadora para dirigir la transcripción de las secuencias codificadoras o (3) interferir con la capacidad de la correspondiente transcripción de ARN para traducirse en una proteína. Así, una región activadora estaría unida de manera operable a una secuencia codificadora si la región activadora fuera capaz de efectuar transcripción de esa secuencia de ADN de manera que la transcripción resultante se pudiera traducir en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesaria para expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero incluirá en general, como sea necesario, secuencias 5' no de transcripción y 5' no de traducción implicadas en la iniciación de transcripción y traducción respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de taponamiento, secuencia CAAT y similares. Especialmente, dichas secuencias reguladoras 5' no de transcripción incluirán una región activadora que incluye una secuencia activadora para control transcripcional del gen unido de manera operable. Los activadores pueden ser constitutivos o inducibles. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras secuencia arriba, como se desee.

Como se usa en la presente memoria, un "vector" puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en que se



puede insertar una secuencia deseada por restricción y ligadura para transporte entre diferentes entornos genéticos o para expresión en una célula huésped. Los vectores constan típicamente de ADN aunque también están disponibles vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula huésped y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción de endonucleasas en que se puede cortar el vector de una manera determinable y en que una secuencia de ADN deseada se puede ligar de manera que el nuevo vector recombinante retenga su capacidad para replicarse en la célula huésped. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede tener lugar muchas veces a medida que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria huésped o una sola vez por huésped ya que el huésped se reproduce por mitosis. En el caso de fago, la replicación puede tener lugar de manera activa durante una fase lítica o de manera pasiva durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en que se puede insertar una secuencia de ADN deseada por restricción y ligadura de manera que se una de manera operable a secuencias reguladoras y se puede expresar como una transcripción de ARN. Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para uso en la identificación de células que que se han transformado o transfectado o no con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o sensibilidad a los antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables por ensayos clásicos conocidos en la técnica (por ej.,  $\beta$ -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células, huéspedes, colonias o placas, transformados o transfectados. Los vectores preferidos son los capaces de replicación autónoma y expresión de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a que se unen de manera operable.

Como se usa en la presente memoria, el término "condiciones rigurosas" se refiere a parámetros conocidos para los expertos en la materia. Un ejemplo de condiciones rigurosas es hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de albúmina de suero bovino (BSA), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM (pH 7), 0,5% de SDS, AEDT 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio y AEDT es ácido etilendiamintetraacético. Hay otras condiciones, reactivos etc., que se pueden usar, que dan como resultado el mismo grado de rigor. Un experto estará familiarizado con dichas condiciones y así no se proporcionan aquí.

El experto también está familiarizado con la metodología para detectar sistemáticamente en las células la expresión de dichas moléculas, que se aíslan de manera rutinaria después, seguido por aislamiento del pertinente ácido nucleico. Así, se pueden obtener de manera rutinaria homólogos y alelos de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura de la invención, así como ácidos nucleicos que codifican los mismos y no se desea que la invención esté limitada a las secuencias específicas desveladas. Se entenderá que el experto será capaz de manipular las condiciones de una manera que permita la identificación clara de homólogos y alelos de los ácidos nucleicos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención. El experto también está familiarizado con la metodología para detectar sistemáticamente en células y bibliotecas la expresión de dichas moléculas que se aíslan de manera rutinaria después, seguido por aislamiento de la pertinente molécula de ácido nucleico y secuenciación.

En general, los homólogos y alelos tendrán en común típicamente al menos aproximadamente el 40% de identidad de los nucleótidos y/o al menos aproximadamente 50% de identidad de los aminoácidos con los equivalentes de las SEC ID Nos: 2 y 1, respectivamente. También se desea que los homólogos y alelos de la invención incluyan los equivalentes de los ácidos nucleicos y aminoácidos de las SEC ID Nos: 4 y 3, respectivamente. En algunos casos las secuencias tendrán en común al menos aproximadamente el 50% de la identidad de los nucleótidos y/o al menos aproximadamente el 65% de identidad de los aminoácidos y en otros casos más las secuencias tendrán en común al menos aproximadamente el 60% de la identidad de los nucleótidos y/o al menos aproximadamente el 75% de identidad de los aminoácidos. La homología se puede calcular usando diversas herramientas de software públicamente disponibles desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland) que se puede obtener por la página de internet (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Las herramientas ejemplares incluyen el sistema BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las alineaciones Pairwise y ClustalW (ajuste de la matriz BLOSUM30) así como el análisis hidropático Kyte-Doolittle se pueden obtener usando el software de análisis de secuencias MacVector (Grupo Molecular de Oxford). Los complementos Watson-Crick de los ácidos nucleicos anteriores también están incluidos por la invención.

En la detección sistemática de los genes relacionados con la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, tales como los homólogos y alelos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, se puede realizar un análisis Southern blot usando las condiciones anteriores, junto con una sonda radioactiva. Después de lavar la membrana a que se transfiere finalmente el ADN, la membrana se puede poner frente a película de rayos X o una placa de fosfoimager para detectar la señal radioactiva.

Para sistemas procarióticos, se pueden usar vectores plásmidos que contienen sitios de replicación y secuencias de control procedentes de una especie compatible con el huésped. Ejemplos de vectores plásmidos adecuados incluyen pBR322, pUC18, pUC19 y similares; los vectores de fagos o bacteriófagos adecuados incluyen  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11 y similares y vectores del virus adecuados incluyen pMAM-neo, pKRC y similares. Preferiblemente, el vector seleccionado de la presente invención tiene la capacidad para replicarse de manera autónoma en la célula huésped seleccionada. Los huéspedes procarióticos útiles incluyen bacterias tales como *E. coli*, *Flavobacterium heparinum*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y similares.

Para expresar la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura de la invención en una célula procariota, es deseable unir de manera operable la secuencia de ácidos nucleicos de una  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura de la invención a un activador procariótico funcional. Dicho activador puede ser constitutivo o, más preferiblemente, capaz de ser regulado (es decir, inducible o desreprimible). Ejemplos de activadores constitutivos incluyen el activador *int* de bacteriófago  $\lambda$ , el activador *bla* de la secuencia génica de  $\beta$ -lactamasa de pBR322 y el activador CAT de la secuencia génica de cloranfenicol acetiltransferasa de pPR325 y similares. Ejemplos de activadores procarióticos inducibles incluyen los principales activadores derecho e izquierdo del bacteriófago  $\lambda$  ( $P_L$  y  $P_R$ ), los activadores *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI* y *gal* de *E. coli*, la  $\alpha$ -amilasa (Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162: 176-182 (1.985)) y los activadores específicos  $\zeta$ -28 de *B. subtilis* (Gilman et al., *Gene sequence* 32: 11-20 (1.984)), los activadores de los bacteriófagos de *Bacillus* (Gryczan, In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY (1.982)) y activadores de *Streptomyces* (Ward et al, *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-478 (1.986)).

Los activadores procariotas son revisados por Glick (*J. Ind. Microbiol.* 1: 277-282 (1.987)); Cenatiempo (*Biochimie* 68: 505-516 (1.986)) y Gottesman (*Ann. Rev. Genet.* 18: 415-442 (1.984)).

La expresión apropiada en una célula procariota también requiere la presencia de un sitio de unión de ribosomas secuencia arriba de la secuencia codificadora. Dichos sitios de unión de ribosomas se desvelan, por ejemplo, por Gold et al. (*Ann. Rev. Microbiol.* 35: 365-404 (1.981)).

Debido a que las células procariotas no pueden producir la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención con glicosilación de eucariotas normal, la expresión de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención de los huéspedes eucariotas es útil cuando se desea glicosilación. Huéspedes eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, levadura, hongos, células de insecto y células de mamífero, *in vivo* o en cultivo de tejido. Células de mamífero que pueden ser útiles como huéspedes incluyen Células HeLa, células de origen de los fibroblastos tales como VERO o CHO-K1 o células de origen linfóide, tales como el hibridoma SP2/0-AG14 o el mieloma P3x63Sg8 y sus derivados. Células huésped de mamífero preferidas incluyen SP2/0 y J558L, así como estirpes celulares de neuroblastomas tales como IMR 332 que pueden proporcionar mejores capacidades para tratamiento post-traduccionales correctos. Las células embrionarias y las células maduras de un órgano trasplantable también son útiles según algunos aspectos de la invención.

Además, las células de plantas también están disponibles como huéspedes y están disponibles secuencias de control compatibles con las células de plantas, tales como el activador de nopalina sintasa y las secuencias de señales de poliadenilación.

Otro huésped preferido es una célula de insecto, por ejemplo en *Drosophila* larvae. Usando células de insecto como huéspedes, se puede usar el activador de alcohol deshidrogenasa en *Drosophila* (Rubin, *Science* 240: 1.453-1.459 (1.988)). Alternativamente, se pueden lograr vectores de baculovirus para expresar grandes cantidades de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención en células de insecto (Jasny, *Science* 238: 1.653 (1.987); Miller et al., En: *Genetic Engineering* (1.986), Setlow, J. K., et al., eds., Plenum, Vol. 8, págs. 277-297).

También se puede utilizar cualquiera de una serie de sistemas de expresión de secuencias génicas de levaduras que incorporan elementos activadores y de terminación de los genes que codifican enzimas glicolíticas y que se producen en grandes cantidades cuando se cultiva la levadura en medio rico en glucosa. Las secuencias génicas glicolíticas conocidas también pueden proporcionar señales de control transcripcional muy eficaces. La levadura proporciona ventajas sustanciales por que también puede realizar modificaciones peptídicas post-traduccionales. Existe una serie de estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias activadoras fuertes y plásmidos de alto número de copias que se pueden utilizar para la producción de las proteínas deseadas en levadura. La levadura reconoce secuencias dirigidas en productos de secuencias génicas de mamífero clonados y segregan péptidos que soportan secuencias dirigidas (es decir, pre-péptidos).

Se puede emplear una amplia variedad de secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales, dependiendo de la naturaleza del huésped. Las señales reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden proceder de fuentes víricas, tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio o similares, donde las señales reguladoras están asociadas a una secuencia génica particular que presenta un alto nivel de expresión. Alternativamente, se pueden emplear activadores de productos de expresión de mamíferos, tales como actina, colágeno, miosina y similares. Se pueden seleccionar señales reguladoras de iniciación transcripcional que permitan la represión o activación a fin de que la expresión de las secuencias génicas se pueda modular. Son de interés señales reguladoras que son sensibles a la temperatura a fin de que variando la temperatura, se pueda reprimir o iniciar la expresión o que se someten a regulación química (tal como metabolito).

Como se discutió anteriormente, la expresión de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención en células eucariotas se realiza usando regiones reguladoras de eucariotas. Dichas regiones incluirán, en general, una región activadora suficiente para dirigir la iniciación de Síntesis de ARN. Activadores eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, el activador de la secuencia génica de metalotioneína I de ratón (Hamer et al, *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 273-288 (1.982)); el activador TK de virus del Herpes (McKnight, *Cell* 31: 355-365 (1.982)); el activador temprano SV40 (Benoist et al. *Nature (Londres)* 290: 304-310 (1.981)); el activador de la secuencia génica *gal4* de levadura (Johnston et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 6.971-6.975 (1.982); Silver et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 5.951-5.955 (1.984)).

Como se conoce extensamente, se inicia la traducción de ARNm de eucariotas en el codón que codifica la cebador a metionina. Por esta razón, es preferible asegurar que la unión entre un activador de eucariotas y una secuencia de ADN que codifica la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención no contiene ningún codón intermedio que sea capaz de codificar una metionina (es decir, AUG). La presencia de dichos codones da como resultado la formación de una proteína de fusión (si el codón AUG está en el mismo marco de lectura que la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la secuencia codificadora de la invención) o una mutación de desplazamiento de marco (si el codón AUG no está en el mismo marco de lectura que la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la secuencia codificadora de la invención).

En una realización, se emplea un vector que es capaz de integrar las secuencias génicas deseadas en el cromosoma de la célula huésped. Las células que han integrado de manera estable el ADN introducido en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo también uno o más marcadores que permitan la selección de células huésped que contengan el vector de expresión. El marcador puede proporcionar, por ejemplo, prototrofia a un huésped auxotrófico o puede conferir resistencia biocida, por ej., a los antibióticos, metales pesados o similares. La secuencia génica del marcador seleccionable puede estar unida directamente a las secuencias génicas de ADN que se tienen que expresar o introducir en la misma célula por co-transfección. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima del ARNm de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa. Estos elementos pueden incluir señales de empalme, así como activadores, estimuladores de la transcripción y señales de terminación. Los vectores de expresión de ADNc que incorporan dichos elementos incluyen los descritos por Okayama, *Molec. Cell. Biol.* 3: 280 (1.983).

En una realización preferida, la secuencia introducida se incorporará en un plásmido o vector vírico capaz de replicación autónoma en el huésped receptor. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de vectores para este fin. Los factores de importancia en la selección de un plásmido o vector vírico particular incluyen: la facilidad con que se pueden reconocer las células receptoras que contienen el vector y seleccionar de esas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desea en un huésped particular y si es deseable poder "transportar" el vector entre células huésped de diferentes especies. Vectores procarióticos preferidos incluyen plásmidos tales como los capaces de replicación en *E. coli* (tales como, por ejemplo, pBR322, ColEI, pSC101, pACYC 184 y  $\pi$ VX). Dichos plásmidos se desvelan, por ejemplo, por Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, editado por Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1.989). Los plásmidos *Bacillus* incluyen pC194, pC221, pT127 y similares. Dichos plásmidos se desvelan por Gryczun (En: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, NY (1.982), págs. 307-329). Los plásmidos de *Streptomyces* adecuados incluyen pIJ101 (Kendall et al, *J. Bacteriol.* 169: 4.177-4.183 (1.987)) y bacteriófagos de streptomyces tales como  $\phi$ C31 (Chater et al. En: *Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology*, Akademiai Kiado, Budapest, Hungría (1.986), págs. 45-54). Los plásmidos de *Pseudomonas* son revisados por John et al. (*Rev. Infect. Dis.* 8: 693-704 (1.986)) e Izaki (*Jpn. J. Bacteriol.* 33: 729-742 (1.978)).

Los plásmidos de eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, BPV, EBV, SV40, círculo de 2-micrómetros y similares o sus derivados. Dichos plásmidos son conocidos en la técnica (Botstein et al, *Miami Wntr. Symp.* 19: 265-274 (1.982); Broach, En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pág. 445-470 (1.981); Broach, *Cell* 28: 203-204 (1.982); Bollon et al, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10: 39-48 (1.980); Maniatis, En: *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3, Expresión de la Secuencia Génica, Academic Press, NY, págs. 563-608 (1.980)). Otros vectores de eucariotas preferidos son vectores víricos. Por ejemplo, y no como limitación, se pueden emplear el poxvirus, herpesvirus, adenovirus y diversos retrovirus. Los vectores víricos pueden incluir virus de ADN o ARN para causar la expresión del ADN de inserción o ARN de inserción.

Una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que contiene la construcción para expresión, la construcción o las construcciones de ADN se pueden introducir en una célula huésped apropiada por cualquiera de una variedad de medios adecuados, es decir, transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa y similares. Adicionalmente, el ADN o ARN que codifica la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención se puede inyectar directamente en células o se puede impulsar por membranas celulares después de que se adhiera a micropartículas. Después de la introducción del vector, se cultivan células receptoras en un medio selectivo, que selecciona el crecimiento de células que contienen vector. La expresión de la secuencia o las secuencias génicas clonadas da como resultado la producción de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención. Esto puede tener lugar en las células transformadas como tal o después de la inducción de estas células para diferenciarse (por ejemplo, por administración de bromodesoxiuracilo a células de neuroblastoma o similares).

La presente invención también proporciona el uso de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa como una herramienta enzimática debido a su especificidad de sustrato y actividad específica. En una comparación directa y más rigurosa entre las enzimas recombinantes y naturales, se encontró que al menos alguna de las enzima recombinante ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) posee una actividad al menos aproximadamente dos-veces mayor y en algunos casos más o menos aproximadamente tres veces mayor respecto a la enzima *Flavobacterial* natural cuando se mide en condiciones de reacción idénticas. Adicionalmente, la actividad de una enzima clonada no está comprometida por su expresión recombinante en *E. coli*.

La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa recombinante presenta una dependencia de la fuerza iónica brusca. Estos resultados son

interesantes proporcionado tanto el carácter iónico del disacárido heparina disulfatada usado en los experimentos descritos a continuación así como los muchos restos iónicos presentes dentro de la enzima que puede funcionar en unión y/o catálisis de sustrato; muchos de estos restos cargados se conservan en enzimas relacionadas de manera estructural y de manera funcional. Desde una perspectiva del sustrato, todos los disacáridos insaturados examinados poseen una carga negativa (a pH 6,4) debido al carboxilato C6 del ácido urónico. Es posible que este ácido actúe como un determinante estructural crítico, especialmente dada su proximidad al enlace  $\Delta 4,5$ . La neutralización de la carga de 6-O sulfato (por ej., en  $\Delta U_{NS,6S}$ ) podía ser posiblemente otro factor de contribución. Desde la perspectiva de la enzima, la glicuronidasa recombinante ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) posee 47 restos básicos (pl teórico de 8,5), incluyendo R151 cuya posición se conserva invariablemente entre las diferentes glicuronidasas examinadas. R151 puede interactuar posiblemente con el carboxilato del ácido urónico. Al mismo tiempo,  $\Delta 4,5$  también posee 44 restos ácidos. Al menos diez de estas posiciones se conservan mucho. El enmascaramiento de la carga de algunos de estos restos iónicos (ácido o básico) por aumento de la concentración de sal podía interferir con la actividad enzimática. Una observación similar de esta dependencia de la fuerza iónica se ha realizado para las heparinasas [Ernst S, et al Expression in Escherichia coli, purification and characterization of heparinase 1 from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem J.* 15 de abril de 1.996; 315 (pt 2): 589-97.]

También se observó un perfil de pH en forma de campana con un óptimo 6,4 en la presente invención. El pH óptimo 6,4 en general coincide con los resultados indicados originalmente para el  $\Delta 4,5$  de *F. heparinum* así como para resultados más recientes publicados para una glucuronil hidrolasa insaturada purificada a partir de *Bacillus sp.* GL1 [Hashimoto, W, et al. (1.999) *Arch Biochem Biophys* 368, 367-74]. Este resultado implica lógicamente uno o más restos histidina que actúa en catálisis. Aunque hay 11 histidinas presentes dentro de la secuencia primaria, tres histidinas (H115, H201 y H218) parecen estar muy conservadas. Notablemente, también existen histidinas catalíticamente críticas en las tres heparina liasas [Pojasek, K, Shriver, Z, Hu, Y., y Sasisekharan, R. (2.000) *Biochemistry* 39, 4.012-9] así como condroitina AC liasa [Huang, W., Boju, L., Tkalec, L., Su, H., Yang, H. O., Gunay, N. S., Linhardt, R. J., Kim, Y. S., Matte, A., y Cygler, M. (2.001) *Biochemistry* 40, 2.359-72] a partir de *Flavobacterium heparinum*. Aunque estas dos clases de enzimas escinden los glicosaminoglicanos por mecanismos algo diferentes (es decir,  $\beta$ -eliminación frente a hidrólisis), ambas implicarían presumiblemente catálisis ácido-base, es decir el imidazol.

Ahora se ha considerado la cuestión de la especificidad del sustrato desde tres perspectivas estructurales: (1) la naturaleza del enlace glicosídico; (2) el modelo de sulfatación relativa del disacárido insaturado y (3) la función de la longitud de la cadena del sacárido (por ej., di- frente a tetrasacárido). Nuestros resultados indican que para la  $\Delta 4,5$ -glicuronidasa recombinante, hay una preferencia no ambigua para el enlace 1 $\rightarrow$ 4 sobre el enlace 1 $\rightarrow$ 3 que hace a la heparina más bien que a condroitina /dermatán y/o hialuronán el mejor sustrato. Se debería observar, sin embargo, que aunque esta posición del enlace es importante, no es absoluta. Ambos  $\Delta 4,5$  disacáridos condroitina e hialuronán se hidrolizaron, aunque a velocidades mucho más bajas y usando mayores concentraciones de enzima de las que se requerían para hidrolizar disacáridos de heparina.

También se presenta un modelo cinético de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa con respecto a la sulfatación específica dentro de un disacárido de heparina. Cebador o y principalmente, se encuentra que los sacáridos insaturados que contienen un uronidato 2-O-sulfatado ( $\Delta U_{2S}$ ) en el extremo no reductor son en general no escindidos por la  $\Delta 4,5$ -glicuronidasa. Además, la incapacidad de un disacárido 2-O-sulfatado para inhibir de manera competitiva la hidrólisis de sustratos que no contienen 2-O-disacáridos (tales como  $\Delta U_{H_{NAC}}$ ) sugiere además que la presencia de un 2-O sulfato impide la unión de este sacárido a la enzima.

Considerando el efecto de los grupos sulfato específicos presentes sobre la glucosamina, se puede resumir en líneas generales que la enzima tiene una preferencia graduada para 6-O-sulfatación pero una selección clara contra aminos no sustituidas o sulfatadas. Esta jerarquía no es una distinción absoluta dado el hecho de que todos los disacáridos que no contienen 2-O-heparina examinados fueron escindidos por la enzima. En su lugar, se basa en parámetros cinéticos relativos. Esta discriminación aparente del sustrato en las posiciones N y 6 de la glucosamina parece ser un tanto contextual, especialmente en el caso de 6-O-sulfatación. Es decir, aunque la 6-O sulfatación puede conferir una selectividad favorable a un sustrato sacárido, este efecto positivo puede ser compensado por la presencia de una amina desacetilada (por ej.,  $\Delta U_{H_{NAC6S}}$  frente a  $\Delta U_{H_{NH26S}}$  o  $\Delta U_{H_{NS,6S}}$ ).

La preferencia estructural la  $\Delta 4,5$  demuestra frente a uronidatos 2-O-sulfatados junto con una denominada discriminación de la "posición-N" para la glucosamina puede ser explotada para uso de la glicuronidasa como una herramienta analítica para los análisis de composición de los glicosaminoglicanos. Se puede predecir la extensión y las velocidades relativas por las que desaparecerían "picos" de disacáridos específicos (es decir, debido a la pérdida dependiente de la glicuronidasa de la absorbancia a 232 nm.), basado completamente en nuestras determinaciones de especificidad del sustrato definidas de manera cinética descritas en los Ejemplos a continuación. Todos los disacáridos que contienen 2-O-sulfato ensayados fueron insensibles a la hidrólisis por la  $\Delta 4,5$ -glicuronidasa. Por otra parte, los disacáridos restantes se hidrolizaron de una manera dependiente del tiempo que correspondía a sus especificidades de sustrato relativas (es decir,  $\Delta U_{H_{NAC6S}} > \Delta U_{H_{NS,6S}} > \Delta U_{H_{NS}}$ ).

A partir de este experimento, se hizo otra observación importante y sorprendente, es decir que la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa también hidroliza tetrasacáridos  $\Delta 4,5$ -insaturados. También es muy interesante observar que este tetrasacárido

particular es tan bueno de un sustrato como el disacárido  $\Delta\text{UH}_{\text{NS}}$ . Esta observación puede argumentar contra una discriminación del sustrato usada por la enzima que se basa negativamente en aumentar el peso molecular como se indicó cebador o [Hovingh, P. y Linker, A. (1.977) *Biochem J* 165, 287-93].

5 Por lo tanto, la invención también proporciona la escisión de glicosaminoglicanos usando la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura descrita en la presente memoria. La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención se puede usar para escindir específicamente un HSGAG poniendo en contacto el sustrato HSGAG con la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención. La invención es útil en una variedad de métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en que es útil para escindir los HSGAG.

10 Como se usa en la presente memoria los términos "HSGAG", "GAG" y "glicosaminoglicanos" se usan de forma intercambiable para referirse a una familia de moléculas con estructuras y propiedades de tipo heparina/de tipo sulfato de heparán. Estas moléculas incluyen pero no se limitan a heparina de bajo peso molecular (LMWH, por sus siglas en inglés), heparina, heparina preparada biotecnológicamente, heparina modificada de manera química, heparina sintética y sulfato de heparán. El término "heparina biotecnológica" incluye heparina que se prepara de fuentes naturales de polisacáridos que se han modificado de manera química y se describen por ejemplo en Razi et al, *Bioche. J.* 15 de julio de 1.995; 309 (Pt 2): 465-72. Se describe heparina modificada de manera química en Yates et al. *Carbohydrate Res* (1.996) 20 de Nov; 294:15-27 y es conocida para los expertos en la materia. La heparina sintética es conocida para los expertos en la materia y se describe en Petitou, M. et al, *Bioorg Med Chem Lett.* 19 de abril (1.999); 9 (8): 1.161-6.

20 El análisis de una muestra de glicosaminoglicanos también es posible con  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sola o junto con otras enzimas. Otras enzimas que degradan HSGAG incluyen pero no se limitan a heparinasa-I, heparinasa-II, heparinasa-III, heparinasa-IV, D-glicuronidasa y L-iduronidasa, versiones modificadas de heparinasas, variantes y fragmentos funcionalmente activos de las mismas.

25 Los métodos que se pueden usar para ensayar la actividad específica de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la presente invención son conocidos en la técnica, por ej., los descritos en los Ejemplos. Estos métodos también se pueden usar para evaluar la función de las variantes y fragmentos funcionalmente activos de la  $\Delta 4,5$  -glicuronidasa. El valor  $k_{\text{cat}}$  se puede determinar usando cualquier ensayo de actividad enzimática para evaluar la actividad de una enzima de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa. Varios de dichos ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describe un ensayo para medir  $k_{\text{cat}}$  en (Ernst, S. E., Venkataraman, G., Winkler, S., Godavarti, R., Langer, R., Cooney, C. y Sasisekharan. R. (1.996) *Biochem. J.* 315, 589-597. El "valor  $k_{\text{cat}}$  de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa natural" es la medida de actividad enzimática de la  $\Delta 4,5$ -glicuronidasa natural obtenida de lisados celulares de *F. heparinum* también descrito en los Ejemplos a continuación. Por lo tanto, basado en la descripción proporcionada en la presente memoria, los expertos en la materia podrán identificar otras moléculas de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa con actividad enzimática modificada con respecto a la molécula de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa natural tales como variantes funcionales.

35 El término "actividad específica" como se usa en la presente memoria se refiere a la actividad enzimática de una preparación de la  $\Delta 4,5$  -glicuronidasa. En general, se prefiere que las preparaciones de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sustancialmente pura y/o aislada de la invención presentan una actividad específica de al menos aproximadamente 60 picomoles de sustrato hidrolizado por minuto por picomol de enzima. Esto corresponde en general a un  $k_{\text{cat}}$  de al menos aproximadamente 10 por segundo para la enzima usando un sustrato tal como disacárido heparina  $\Delta\text{UH}_{\text{NAC}}$ .

40 Debido a la actividad de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sobre los glicosaminoglicanos, el perfil del producto producido por una  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica para examinar el tipo o la cantidad de producto de degradación producido por la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa sola o en combinación con otras enzimas. Un experto en la materia también reconocerá que la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa también se puede usar para valorar la pureza de los glicosaminoglicanos en una muestra. Un método preferido para determinar el tipo y la cantidad de producto se describe en Rhomberg, A. J. et al, *PNAS*, v. 95, pág. 4.176-4.181, (Abril 1.998), que se incorpora por este medio en su totalidad por referencia. El método desvelado en la referencia Rhomberg utiliza una combinación de espectrometría de masas y técnicas electroforéticas capilares para identificar los productos enzimáticos producidos por la heparinasa. El estudio Rhomberg utiliza heparinasa para degradar a los HSGAG para producir oligosacáridos HSGAG. Se puede usar espectrometría de masas MALDI (Ionización por Desorción Láser Asistida por Matriz) para la identificación y medición semicuantitativa de sustratos, enzimas y productos finales en la reacción enzimática. La técnica de electroforesis capilar separa los productos para resolver incluso pequeñas diferencias entre los productos y se aplica junto con espectrometría de masas para cuantificar los productos producidos. La electroforesis capilar puede resolver incluso la diferencia entre un disacárido y su derivado de semicarbazona. Se desvelan métodos detallados para secuenciar polisacáridos y otros polímeros en las Solicitudes de Patente de EE.UU. en tramitación con la presente Nos de Serie 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 55 2.000 y que tienen en común la propiedad de la invención. Los contenidos completos de ambas aplicaciones se incorporan por este medio por referencia.

En pocas palabras, el método se realiza por digestión enzimática, seguido por espectrometría de masas y electroforesis capilar. Los ensayos enzimáticos se pueden realizar en una variedad de maneras, siempre que los ensayos se realicen de manera idéntica sobre la  $\Delta 4,5$ -glicuronidasa, a fin de que los resultados puedan ser

comparados. En el ejemplo descrito en la referencia Rhomberg, se realizan reacciones enzimáticas por adición de 1 ml de disolución enzimática a 5 ml de disolución de sustrato. La digestión se realiza después a temperatura ambiente (22°C) y se detiene la reacción en diversos instantes de tiempo por eliminación de 0,5 ml de la mezcla de reacción y adicionándolo a 4,5 ml de una disolución de matriz MALDI, tal como ácido cafeico (aproximadamente 12 mg/ml) y 70% de acetonitrilo/agua. La mezcla de reacción es sometida después a espectrometría de masas MALDI. La superficie MALDI es preparada por el método de Xiang y Beavis (Xiang y Beavis (1.994) *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 8, 199-204). Un acceso mayor de dos veces de péptido básico (Arg/Gly)<sub>15</sub> se premezcla con matriz antes de que se añadiese a la disolución de oligosacárido. Una alícuota de 1 ml de mezcla de muestra/matriz que contiene 1-3 picomoles de oligosacárido se deposita en la superficie. Después de que se produce cristalización (típicamente en 60 segundos), se quita por enjuagado el líquido en exceso con agua. Después se adquieren espectros de espectrometría de masas MALDI en el modo lineal usando un instrumento de tiempo de vuelo de reflectrón Voyager Elite de PerSeptive Biosystems (Framingham, MA) provisto de un láser de nitrógeno a 337 nanómetros. Se usa extracción retardada para aumentar la resolución (22 kV, red a 93%, guía a 0,15%, retraso del pulso 150 ns, entrada de masa baja a 1.000, 128 tomas promediadas). Los espectros de masas se calibran de manera externa usando las señales para (Arg/Gly)<sub>15</sub> proteínico y su complejo con el oligosacárido.

Después se puede realizar electroforesis capilar en una unidad CE Hewlett-Packard<sup>3D</sup> usando capilares de sílice fusionados no recubiertos (diámetro interno 75 micrómetros, diámetro externo 363 micrómetros,  $l_{det}$  72,1 cm y  $l_{tot}$  85 cm). Se vigilaron los analitos usando detección UV a 230 nm y una celda de trayecto de haz luminoso ampliado (Hewlett-Packard). El electrolito es una disolución de 10 ml de sulfato de dextrano y Tris/ácido fosfórico 50 milimolar (pH 2,5). Se usa sulfato de dextrano para suprimir interacciones no específicas de los oligosacáridos de heparina con una pared de sílice. Se realizan separaciones a 30 kV con el ánodo en el lado del detector (polaridad inversa). Se usa una mezcla de un ácido 1/5-naftalenodisulfónico y ácido 2-naftalenosulfónico (10 micromolar cada uno) como patrón interno.

También se pueden utilizar otros métodos para valorar el perfil del producto. Por ejemplo, otros métodos incluyen métodos que cuentan con parámetros tales como viscosidad (Jandik, K. A., Gu, K. y Linhardt, R. J., (1.994), *Glycobiology*, 4: 284-296) o absorbancia UV total (Ernst, S. et al, (1.996), *Biochem. J.*, 315: 589-597) o espectrometría de masas o electroforesis capilar sola.

Las moléculas de  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa de la invención también son útiles como herramientas para secuenciar los HSGAG. Se desvelan métodos detallados para secuenciar polisacáridos y otros polímeros en las Solicitudes de Patente de EE.UU. en tramitación con la presente Nos. de Serie 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 2.000 y que tienen en común la propiedad de la invención. Estos métodos utilizan herramientas tales como heparinasas en el proceso de secuenciación. La  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa de la invención es útil como tal herramienta.

Un experto en la materia, a la luz de la presente descripción, permite producir preparaciones sustancialmente puras de HSGAG y/o Composiciones de fragmentos de GAG utilizando las moléculas de  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa solo o junto con otras enzimas. Estos fragmentos de GAG tienen muchas utilidades terapéuticas. Las moléculas de glicuronidasa y/o fragmentos de GAG se pueden usar para el tratamiento de cualquier tipo de afección en que se ha identificado el tratamiento de fragmentos de GAG como un tratamiento útil, por ej., evitando la coagulación, inhibiendo la angiogénesis, inhibiendo la proliferación. Las preparaciones de fragmentos GAG se preparan de fuentes de HSGAG. Una "fuente de HSGAG" como se usa en la presente memoria se refiere a composición de glicosaminoglicanos de tipo heparina/de tipo sulfato de heparán que puede ser manipulada para producir fragmentos de GAG usando tecnología habitual, incluyendo degradación enzimática, etc. Como se describió anteriormente, los HSGAG incluyen pero no se limitan a heparina aislada, heparina modificada de manera química, heparina preparada por biotecnología, heparina sintética, sulfato de heparán y LMWH. Así, los HSGAG pueden ser aislados de fuentes naturales, preparadas por síntesis directa, mutagénesis, etc.

Así, los métodos de la invención permiten a un experto en la materia preparar o identificar una composición apropiada de fragmentos GAG, dependiendo del individuo y el trastorno que se esté tratando. Estas composiciones de fragmentos de GAG se pueden usar solas o en combinación con la  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa y/u otras enzimas. Asimismo también se pueden usar  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa y/u otras enzimas para producir fragmentos de GAG *in vivo*.

Las composiciones de la invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier tipo de afección en que se haya identificado el tratamiento de fragmentos de GAG como un tratamiento útil. Así, la invención es útil en una variedad de métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en que son útiles los tratamientos. Por ejemplo, se sabe que los fragmentos de GAG son útiles para evitar la coagulación, inhibir el crecimiento de células cancerosas y la metástasis, evitar la angiogénesis, evitar la neovascularización, evitar la soriasis. Las composiciones de fragmentos de GAG también se pueden usar en ensayos *in vitro*, tal como una muestra de control de la calidad.

Cada uno de estos trastornos es conocido en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Harrison's Principles of Internal Medicine* (McGraw Hill, Inc., Nueva York), que se incorpora por referencia.

En una realización las preparaciones de la invención se usan para inhibir la angiogénesis. Se administra una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis de la preparación de fragmentos de GAG a un individuo con necesidad

de tratamiento de la misma. Angiogénesis como se usa en la presente memoria es la formación inapropiada de nuevos vasos sanguíneos. La "angiogénesis" con frecuencia tiene lugar en tumores cuando las células endoteliales segregan un grupo de factores de crecimiento que son mitogénicos para el endotelio causando la elongación y proliferación de células endoteliales que dan como resultado una generación de nuevos vasos sanguíneos. Varios de los mitógenos angiogénicos son péptidos de unión de heparina que se relacionan con factores de crecimiento celular endotelial. La inhibición de la angiogénesis puede causar la regresión de tumores en modelos animales, que sugiere un uso como agente anticancerígeno terapéutico. Una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis es una cantidad de Preparación de fragmentos de GAG que es suficiente para disminuir el número de vasos sanguíneos que crece en un tumor. Esta cantidad se puede valorar en un modelo animal de tumores y angiogénesis, muchos de los cuales son conocidos en la técnica.

La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa se inmoviliza, en algunas realizaciones, sobre un soporte. La glicuronidasa se puede inmovilizar en cualquier tipo de soporte pero si el soporte se tiene que usar *in vivo* o *ex vivo* se desea que el soporte sea estéril y biocompatible. Un soporte biocompatible es uno que no cause una reacción inmunidad a otro tipo de reacción dañina cuando se usa en un individuo. La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa se puede inmovilizar por cualquier método conocido en la técnica. Muchos métodos son conocidos para inmovilizar proteínas en soportes. Un "soporte sólido" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier material sólido en que se puede inmovilizar un polipéptido.

Los soportes sólidos, por ejemplo, incluyen pero no se limitan a membranas, por ej., celulosas naturales y modificadas tales como nitrocelulosa o nailon, Sepharosa, Agarosa, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas, poli(acrilamidas, poli(difluoruro de vinilideno), otras agarosas y magnetita, incluyendo perlas magnéticas. El portador puede ser totalmente insoluble o parcialmente soluble y puede presentar cualquier posible configuración estructural. Así, el soporte puede ser esférico, como en una perla, o cilíndrico, como en la superficie interna del tubo de ensayo o pozo de microplaca o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira graduada, superficie del fondo de un pozo de microplaca, etc.

La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención también se puede usar para retirar los GAG activos de un fluido que contiene GAG. Se pone en contacto un fluido que contiene GAG con la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la invención para degradar el GAG. El método es útil en particular para la eliminación *ex vivo* de los GAG de la sangre. En una realización de la invención la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa se inmoviliza sobre un soporte sólido como es convencional en la técnica. El soporte sólido que contiene la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa inmovilizada se puede usar en productos sanitarios extracorpóreo (por ej., hemodializador, oxigenador de bomba) para heparinización sistémica para evitar que la sangre coagule en el dispositivo. La membrana de soporte que contiene  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa inmovilizada se coloca en el extremo del dispositivo para neutralizar el GAG antes de que la sangre sea devuelta al cuerpo.

Así, las moléculas de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa son útiles para tratar o evitar los trastornos asociados a la coagulación. Una "enfermedad asociada a la coagulación" como se usa en la presente memoria se refiere a una afección caracterizada por una interrupción en el suministro de sangre a un tejido debido a bloqueo del vaso sanguíneo responsable de suministrar sangre al tejido tal como se ve para infarto de miocardio o cerebral. Un ataque isquémico cerebral o isquemia cerebral es una forma de afección isquémica en que se bloquea el suministro de sangre al cerebro. Esta interrupción en el suministro de sangre al cerebro puede dar como resultado una variedad de causas, incluyendo un bloqueo intrínseco o oclusión del propio vaso sanguíneo, una fuente de oclusión originada de manera lejana, presión de perfusión disminuida o viscosidad de la sangre aumentada dando como resultado flujo de sangre cerebral inadecuado o un vaso sanguíneo roto en el espacio subaracnoideo o tejido intracerebral.

La  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o los fragmentos de GAG generados con la misma se puede usar solos o en combinación con un agente terapéutico para tratar una enfermedad asociada a la coagulación. Ejemplos de terapéutica útil en el tratamiento de enfermedades asociadas a la coagulación incluyen agentes de anticoagulación, agentes antiplaquetarios y agentes trombolíticos.

Los agentes de anticoagulación evitan la coagulación de los componentes de la sangre y evitan así la formación de coágulos. Los anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, heparina, warfarina, coumadina, dicumarol, fenprocumon, acenocumarol, biscumacetato de etilo y derivados de indandiona.

Los agentes antiplaquetarios inhiben la agregación de las plaquetas y con frecuencia se usan para evitar la apoplejía tromboembólica en pacientes que han padecido un ataque isquémico transitorio o apoplejía. Los agentes antiplaquetarios incluyen, pero no se limitan a, aspirina, derivados de tienopiridina tales como ticlopodina y clopidogrel, dipiridamol y sulfipirazona, así como miméticos RGD y también agentes antitrombina tales como, pero no limitados a, hirudina.

Agentes trombolíticos lisan los coágulos que causan la apoplejía tromboembólica. Se han usado agentes trombolíticos en el tratamiento de tromboembolismo venoso agudo y embolia pulmonar y son conocidos en la técnica (por ej., véase Hennekens et al, *J Am Coll Cardiol*; v. 25 (sup 7), pág. 18S-22S (1.995); Holmes, et al, *J Am Coll Cardiol*; v. 25 (supl 7), pág. 10S-17S (1.995)). Los agentes trombolíticos incluyen, pero no se limitan a, plasminógeno,  $\alpha_2$ -antiplasmina, estreptocinasa, antistreplasa, activador de plasminógeno de tejido (tPA, por sus siglas en inglés) y urocinasa. "tPA" como se usa en la presente memoria incluye tPA natural y tPA recombinante, así

como formas modificadas de tPA que retienen las actividades enzimática o fibrinolítica de tPA natural. La actividad enzimática de tPA se puede medir valorando la capacidad de la molécula para convertir plasminógeno en plasmina. La actividad fibrinolítica de tPA se puede determinar por cualquier actividad de lisis de coágulos *in vitro* conocida en la técnica, tal como el ensayo de lisis de coágulos purificados descrito por Carlson, et. al. *Anal. Biochem.* 168, 428-435 (1.988) y su forma modificada descrita por Bennett, W. F. et al, 1.991, *J. Biol. Chem.* 266 (8): 5.191-5.201, los contenidos completos de la cual se incorporan por este medio por referencia.

Las composiciones de la invención de la invención son útiles para los mismos fines ya que las heparinasas y los productos de degradación de heparinasas (fragmentos de HSGAG). Así, por ejemplo, las composiciones de la invención son útiles para tratar y evitar la proliferación de células cancerosas y metástasis. Así, según otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para tratar a individuos que tienen o están en riesgo de tener cáncer.

Críticamente, los HSGAG (junto con colágeno) son componentes clave de la interfase de la superficie celular-matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Aunque las proteínas de tipo colágeno proporcionan el armazón extracelular necesario para células para unir y formar tejidos, los polisacáridos complejos rellenan el espacio creado por el armazón y actúan como una esponja molecular por unión de manera específica y regulación de las actividades biológicas de numerosas moléculas de señalización tipo factores de crecimiento, citocinas, etc. recientemente se ha reconocido que las células sintetizan distintas secuencias de HSGAG y se componen con estas secuencias usando el extraordinario contenido de información presente en la secuencias para unirse de manera específica a muchas moléculas de señalización y regulan de ese modo varios procesos biológicos.

La invención también considera el uso de fragmentos de GAG terapéuticos para el tratamiento y la prevención de proliferación de células tumorales y metástasis. Un fragmento de GAG terapéutico como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula o moléculas que son trozos o fragmentos de un GAG que se han identificado por el uso de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa posiblemente junto con otras heparinasas naturales y/o modificadas.

La invención también considera ensayos de detección sistemática para identificar fragmentos de GAG terapéuticos para el tratamiento de un tumor y para evitar la metástasis. Los ensayos se realizan tratando un tumor o células tumorales aisladas con  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa y/u otras heparinasas naturales o modificadas y aislando los fragmentos de GAG resultantes. Sorprendentemente, estos fragmentos de GAG presentan actividad terapéutica en la prevención de proliferación de células tumorales y metástasis. Así la invención considera tratamientos individualizados, en que un tumor o porción de un tumor se aísla de un individuo y se usa para preparar los fragmentos de GAG terapéuticos. Estos fragmentos terapéuticos se pueden volver a administrar al individuo para proteger al individuo de más proliferación de células tumorales o metástasis o de la iniciación de la metástasis si el tumor aún no es metastásico. Alternativamente los fragmentos se pueden usar en un individuo diferente que tiene el mismo tipo o tumor o un tipo diferente de tumor.

El término "fragmento de GAG terapéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a un GAG que presenta actividad terapéutica por que evita la proliferación y/o metástasis de una célula tumoral. Dichos compuestos se pueden generar usando  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa para producir fragmentos terapéuticos o se pueden sintetizar de nuevo. Se puede ensayar la actividad terapéutica en fragmentos de GAG putativos usando cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Así el fragmento de GAG terapéutico puede ser un fragmento de GAG sintético basado en la secuencia del fragmento de GAG identificado cuando el tumor está en contacto con  $\Delta 4$ , 5 -glicuronidasa o que tiene variaciones minoritarias que no interfieren con la actividad del compuesto. Alternativamente, el fragmento de GAG terapéutico puede ser un fragmento de GAG aislado producido cuando el tumor está en contacto con  $\Delta 4$ , 5 -glicuronidasa.

La invención es útil para tratar y/o evitar la proliferación de células tumorales o la metástasis en un individuo. Los términos "tratar" y "tratando" la proliferación de células tumorales como se usa en la presente memoria se refiere a inhibir completamente o parcialmente la proliferación o metástasis de un cáncer o célula tumoral, así como inhibir cualquier aumento en la proliferación o metástasis de un cáncer o célula tumoral.

Un "individuo con un cáncer" es un individuo que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los tumores malignos o tumores incluyen pero no se limitan a cáncer de las vías biliares; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasia intraepitelial; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ej., célula pequeña y célula no pequeña); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

Un "individuo con riesgo de tener un cáncer" como se usa en la presente memoria es un individuo que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos individuos incluyen, por ejemplo, individuos con una anomalía genética, la presencia de las cuales se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una probabilidad mayor de desarrollar un cáncer e individuos expuestos a agentes que causan cáncer tales como tabaco, asbestos u otras toxinas químicas o un individuo que se ha tratado previamente de cáncer y está en aparente remisión. Cuando un individuo con riesgo de desarrollar un cáncer es tratado con una  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o producto de degradación de la misma el individuo puede ser capaz de destruir las células cancerosas a medida que se desarrollan.



Se administran cantidades eficaces de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa,  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa variante o GAG terapéuticos de la invención a individuos con necesidad de dicho tratamiento. Las cantidades eficaces son las cantidades que darán como resultado una mejora deseada en la afección o síntomas de la afección, por ej., para el cáncer esto es una reducción en la proliferación celular o metástasis, sin causar otros efectos secundarios médicamente inaceptables.

Dichas cantidades se pueden determinar con no más que experimentación de rutina. Se cree que las dosis que oscilan de 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración, serán eficaces. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores (incluyendo si la administración es junto con otros métodos de tratamiento, el número de dosis y parámetros del paciente individuales incluyendo edad, estado físico, tamaño y peso) y se puede determinar con experimentación de rutina. Se prefiere en general que se use una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el buen criterio médico. El modo de administración puede ser cualquier modo médicamente aceptable incluyendo oral, subcutáneo, intravenoso, etc.

En algunos aspectos de la invención la cantidad eficaz de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o GAG terapéutico es esa cantidad eficaz para evitar la invasión de una célula tumoral a través de una barrera. La invasión y h6metástasis del cáncer es un proceso complejo que implica cambios en las propiedades de adhesión celular que permiten que una célula transformada invada y migre por la matriz extracelular (ECM) y adquiera propiedades de crecimiento independientes del anclaje Liotta, L. A, et al., Cell 64: 327-336, 1.991. Algunos de estos cambios tiene lugar en adhesiones focales, que son puntos de contacto célula/ECM que contienen moléculas de señalización asociadas a la membrana, citoesqueléticas e intracelulares. La enfermedad metastásica tiene lugar cuando los focos diseminados de células tumorales siembran un tejido que soporta su crecimiento y propagación y esta extensión secundaria de células tumorales es responsable de la morbilidad y mortalidad asociadas a la mayoría de los tumores malignos. Así el término "metástasis" como se usa en la presente memoria se refiere a la invasión y migración de células tumorales lejos del sitio del tumor principal.

La barrera para las células tumorales puede ser una barrera artificial *in vitro* o una barrera natural *in vivo*. Las barreras *in vitro* incluyen pero no se limitan a membranas recubiertas de matriz extracelular, tal como Matrigel. Así en las composiciones de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o productos de degradación de la misma se puede ensayar su capacidad para inhibir la invasión de células tumorales en un sistema de ensayo de invasión Matrigel como se describe con detalle por Parish, C. R, et al, "A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells," Int. J. Cancer, 1.992, 52: 378-383. Matrigel es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de heparán sulfato tales como perlecan, que se une a y localiza bFGF, vitronectina así como factor-  $\beta$  de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ), activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), activador del tejido plasminógeno (tPA) y la serpina conocida como inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Otros ensayos *in vitro* e *in vivo* para metástasis se han descrito en la técnica anterior, véase, por ej., la Patente de EE.UU. N°. 5.935.850, expedida el 10 de agosto de 1.999, que se incorpora por referencia. Una barrera *in vivo* se refiere a una barrera celular presente en el cuerpo de un individuo.

En general, cuando se administran para fines terapéuticos, las formulaciones de la invención se aplican en disoluciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Las composiciones de la invención se pueden administrar *per se* (puras) o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales farmacéuticamente no aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. También, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o de alcalino-térreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

Agentes tampón adecuados incluyen: acético ácido y una sal (1-2% P/V); ácido cítrico y una sal (1-3% P/V); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% P/V) y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% P/V). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03% P/V); clorobutanol (0,3-0,9% P/V); parabenos (0,01-0,25% P/V) y timerosal (0,004-0,02% P/V).

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, para uso médico, que comprenden  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa,  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa variante de la invención o fragmentos terapéuticos de GAG junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria y se describe más completamente a continuación, significa una o más cargas líquidas, diluyentes o sustancias encapsulantes, compatibles, que son adecuados para administración a un ser humano u otro animal. En la presente invención, el término "portador" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden ser mezclados con la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa de la presente invención u otras composiciones y entre sí, de una manera tal que no haya interacción que debilite sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

- Una variedad de vías de administración está disponible. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del agente activo particular seleccionado, la afección particular que se esté tratando y la dosis requerida para eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención, en términos generales, se pueden practicar usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Un modo de administración preferido es una vía parenteral. El término "parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, inyección intrasternal o técnicas de infusión. Otros modos de administración incluyen oral, mucosal, rectal, vaginal, sublingual, intranasal, intratraqueal, inhalación, ocular, transdérmica, etc.
- Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el compuesto o los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten que los compuestos de la invención se puedan formular como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un individuo que se tiene que tratar. Se pueden obtener preparaciones farmacéuticas para uso oral como excipiente sólido moliendo opcionalmente una mezcla resultante y tratando la mezcla de gránulos, después de añadir coadyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes de disgregación, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en disolución salina o tampones para neutralizar condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún portador.
- Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar disoluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir materias colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.
- Preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas selladas, suaves, hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Dichas microesferas han sido definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosis adecuadas para dicha administración.
- Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o rombos formulados de manera convencional.
- Para administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se pueden suministrar de manera conveniente en la forma de una presentación de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de por ej., gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos de manera sistémica, se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ej., por inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unidad arial, por ej., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o dispersantes.
- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ej., agua exenta de pirógenos estéril, antes de uso.

5 Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de medicamento de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

10 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase gel, adecuados. Ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

15 Son formas farmacéuticas líquidas o sólidas adecuadas, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, en forma de caracol, recubiertas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, gránulos para implante en la piel o secadas sobre un objeto afilado para que se marquen en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o coadyuvantes tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes como se describió anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para una breve revisión de métodos para suministro de fármacos, véase Langer, *Science* 249: 1.527-1.533, 1.990, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

25 Las composiciones se pueden presentar de manera conveniente en forma farmacéutica unidad aria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de llevar la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa activa conjuntamente con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan llevando de manera uniforme y de manera íntima el polímero junto con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido o los dos, y después, si es necesario, conformar el producto. Se puede almacenar el polímero liofilizado.

30 Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación controlada, liberación retardada o liberación prolongada. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las heparinasas de la invención, aumentando la conveniencia para el individuo y el médico. Muchos tipos de sistemas de suministro prolongado están disponibles y son conocidos para los expertos en la materia. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico), polianhídridos y policaprolactona; sistemas no poliméricos que son lípidos incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de ceras, comprimidos usando aglutinantes y excipientes convencionales, implantes fusionados parcialmente y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, encontrados en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.452.775 (Kent); 4.667.014 (Nestor et al.) y 4.748.034 y 5.239.660 (Leonard) y (b) sistemas de difusión en que un componente activo permea a una velocidad controlada por un polímero, encontrados en las Patentes de EE.UU. Nos. 3.832.253 (Higuchi et al.) y 3.854.480 (Zaffaroni). Además, se puede usar un sistema de suministro de soporte físico a base de bomba, algunos de los cuales se adaptan para implante.

Un individuo es cualquier vertebrado humano o no humano, por ej., perro, gato, caballo, vaca, cerdo.

45 Cuando se administra a un paciente que experimenta tratamiento de cáncer, los compuestos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o GAG terapéutico se pueden administrar en cócteles que contienen otros agentes anti-cáncer: Los compuestos también se pueden administrar en cócteles que contienen agentes que tratan los efectos secundarios de tratamiento por radiación, tales como antieméticos, protectores de radiaciones, etc.

50 Fármacos anti-cáncer que se pueden coadministrar con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a: Acivicina; Aclarubicina; Hidrocloruro de Acodazol; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Hidrocloruro de Bisantrono; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sodio; Bropirimina; Busulfán; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; Hidrocloruro de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Hidrocloruro de Daunorubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Hidrocloruro de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Hidrocloruro de Eflornitina; Elsamitrucina;

Enloplatinio; Enpromato; Epiropidina; Hidrocloruro de Epirubicina; Erbulozol; Hidrocloruro de Erorubicina; Estramustina; Fosfato Sódico de Estramustina; Etanidazol; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Hidrocloruro de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracil; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Hidrocloruro de Gemcitabina; Hidroxiurea; Hidrocloruro de Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta- I a; Interferón Gamma- I b; Iproplatino; Hidrocloruro de Irinotecán; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Hidrocloruro de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Hidrocloruro de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Hidrocloruro de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedopa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogillina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Hidrocloruro de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromán; Puposulfán; Hidrocloruro de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiromicina; Prednimustina; Hidrocloruro de Procarbazona; Puromicina; Hidrocloruro de Puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Hidrocloruro de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Hidrocloruro de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Sulofenur; Talisomicina; Tecogalán Sódico; Tegafur; Hidrocloruro de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Hidrocloruro de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Hidrocloruro de Tubulozol; Uramustina; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Hidrocloruro de Zorubicina.

Los compuestos de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o GAG terapéutico también se pueden unir a una molécula diana. Una molécula diana es cualquier molécula o compuesto que sea específica para una célula o tejido particular y que se pueda usar para dirigir la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa o el GAG terapéutico a la célula o tejido. Preferiblemente la molécula diana es una molécula que interactúa específicamente con una célula cancerosa o un tumor. Por ejemplo, la molécula diana puede ser una proteína u otro tipo de molécula que reconozca e interactúe específicamente con un antígeno tumoral.

Los antígenos tumorales incluyen Melan-A/M-ART-1, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina deaminasa (ADAAP), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)--C017-1A/GA733, Antígeno Carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos de inmunógenos CAP-1 y CAP-2, etv6, amll, Antígeno Específico de la Próstata (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T /cadena zeta CD3, familia MAGE de antígenos tumorales (por ej., MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ej., GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1,  $\alpha$ -fetoproteína, E-caderina,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina, pl20ctn, gpl00<sup>Pmel117</sup>, PRAME, NY-ESO-1, glicógeno fosforilasa de cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, cdc27, proteína coli de poliposis adenomatosa (APC), fodrina, P1A, Conexina 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, GM2 y gangliósidos GD2, productos víricos tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, antígeno nuclear codificado de EBV (EBNA)-1 y c-erbB-2.

La presente invención se ilustra además por los siguientes Ejemplos, que de ninguna manera se deberían interpretar como limitación adicional. Los contenidos completos de todas las referencias (incluyendo referencias bibliográficas, patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente en tramitación con la presente) citadas por toda esta solicitud se incorporan por este medio expresamente por referencia.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

*Productos químicos y reactivos.* A menos que se indique de otro modo, los productos bioquímicos fueron adquiridos de Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO). Los disacáridos fueron adquiridos de Calbiochem (San Diego, CA). Los reactivos para construcción de bibliotecas genómicas  $\lambda$ ZAP II y detección sistemática fueron obtenidos de Stratagene (La Jolla, CA). Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas de New England Biolabs (Beverly, MA). Los oligonucleótidos cebadores de ADN fueron fabricados por Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA). Los reactivos de clonación molecular adicionales fueron obtenidos de los fabricantes enumerados.

*Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.* *F. heparinum* (*Pedobacter heparinus*) se obtuvo como stock liofilizado de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA), stock n° 13125. Se cultivaron de manera aerobia cultivos rehidratados a 30°C con agitación moderada a una densidad óptica ( $A_{600}$ ) entre 1,5 y 2 en medio definido que contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7,6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  12 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  14,3 mM,  $\text{NaCl}$  1,7 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,9 mM, pH 6,9 y enriquecido con metales traza 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaMoO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  y  $\text{MnSO}_4$  (añadido de un stock X100 en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mM), 0,8% de glucosa, 0,05% de metionina, 0,05% de histidina,  $\text{MgSO}_4$  2

mM y 0,1% de heparina todos añadidos en condiciones estériles. Las cepas *E. coli* incluido TOP 10 (Invitrogen) o DH5 $\alpha$  para clonación y subclonación PCR y BL21 (DE3) (Novagen, Madison WI) para expresión de proteínas recombinantes. Las cepas huéspedes de bacteriófagos XLI-Blue MRF<sup>+</sup> y SOLR fueron obtenidas de Stratagene.

5 *Purificación de péptidos de glicuronidasa y secuenciación de proteínas.* La 4, 5 glicuronidasa se purificó de 10 litros de cultivos de fermentación usando un método tal como los descritos en McLean, M. W, Bruce, J. S, Long, W. F y Williamson, F. B., 1.984, *Eur J Biochem* 145, 607-15.

*Clonación molecular del gen de la  $\Delta$ 4, 5-glicuronidasa de ADN genómico de F. heparinum.*

10 Se aisló ADN genómico flavobacteriano de 10 ml de cultivo *Flavobacteriano* usando el estuche de purificación de ADN QIAGEN DNeasy según las instrucciones del fabricante para bacterias gram-negativas usando aproximadamente  $2 \times 10^9$  células por columna. Después de purificación, se precipitó en etanol ADN genómico y se resuspendió en TE, pH 7,5 a 0,5 mg/ml. La calidad del ADN genómico se confirmó espectrofotométricamente a 260/280 nm, por electroforesis sobre un gel de agarosa al 0,5% y por PCR usando cebadores específicos de *Flavobacterias*.

15 Los siguientes cebadores degenerados se sintetizaron de péptidos que corresponden inicialmente a los picos 19 y 24 (Ejemplo 1): 5'

20 GARACNCAYCARGGNYTNACNAAYGAR 3' (SEC ID N° 5) (pico 19 sentido directo), 5' YTCRTTNGTNARNCCYTGRGTGNGTYTC 3' (SEC ID N° 6) (pico 19 sentido inverso); 5' AAYTAYGCNGAYTAYTAYTAY 3' (SEC ID N° 7) (pico 24 sentido directo); 5' RTARTARTARTCNGCARTTT 3' (SEC ID N° 8) (pico 24 sentido inverso). Los cuatro cebadores fueron detectados sistemáticamente en un ensayo PCR usando todos los posibles apareamientos (sentido directo y sentido inverso). Las condiciones de reacción PCR incluían 200 ng de ADN genómico, 200 picomoles para cada cebador de sentido directo y sentido inverso, dNTPs 200  $\mu$ M, 1 unidad de Vent ADN polimerasa (New England Biolabs) en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l. se completaron 35 ciclos usando una temperatura de recocido de 52°C y extensiones de 1,5 minutos a 72°C. se purificó en gel el producto de 450 pb multiplicado usando los cebadores 19 sentido directo y 24 sentido inverso y se sometió a secuenciación de ADN directa que confirmó la inclusión de secuencia traducida correspondiente a los picos peptídicos 19 y 24 además del pico 12. También se radioetiquetó con <sup>32</sup>P el mismo ADN por cebado al azar usando 200  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P[dCTP] a 6.000 Ci/mmol (NEN, Boston, MA), 50-100 ng de ADN y el estuche de cebado al azar Prime-it II (Stratagene) (sonda 1). Se retiraron dNTPs marcados con <sup>32</sup>P no incorporados por filtración de gel usando columnas G-50 Quick-spin (Roche Biochemicals, Nueva Jersey). Las reacciones de etiquetado proporcionaron típicamente aproximadamente 50 ng de ADN radioetiquetado con actividades específicas que excedían 10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g.

35 La sonda 2 de hibridación de ADN se creó inicialmente por PCR como se describió anteriormente excepto que se usó cebador degenerado 26 5' CARACNTAYACNCCNGGNATGAAY 3' (SEC ID N° 9) (pico 26 sentido directo) y 20 picomoles de cebador no degenerado 54 de sentido inverso, (5' TTCATGGTCGTAACCGCATG 3') (SEC ID N° 10); el último oligonucleótido corresponde a la secuencia de ADN  $\Delta$ 4, 5 3' de pico 8. La secuenciación directa de este fragmento de PCR confirmó la presencia de los péptidos del pico 26 y pico 13. La sonda 3 de ADN usada en hibridaciones southern de ADN (a continuación) se multiplicó por PCR a partir de ADN genómico usando el cebador 68 (5' TATACACCAGGCATGAACCC 3') (SEC ID N° 11) y 74 (5' CCCAGTATAAATACTCCAGGT 3') (SEC ID N° 12).

40 *Detección sistemática de hibridación de placa de biblioteca genómica de F. heparinum.* Se construyó una biblioteca genómica  $\lambda$ ZAP II (Stratagene) como se describe [Sasisekharan, R, Bulmer, M., Moremen, K. W., Cooney, C. L., y Langer, R. (1.993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3.660-4]. La biblioteca ampliada ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml) se cultivó en placas a aproximadamente  $1 \times 10^6$  pfu (~50.000 pfu/placa) en placas LB de 100 x 150 mm. Se alzaron las placas sobre membranas de nailon (Nytran Supercharge, Schleicher y Schuell) y detecciones sistemáticas de hibridación posteriores usando métodos y disoluciones clásicos [*Current Protocols in Molecular Biology*, 1.987, John Wiley and Sons, Nueva York]. Se reticuló ADN para cada filtro por irradiación UV (Stratagene Stratalinker) durante 30 segundos a 1.200 joules/cm<sup>3</sup>. Se realizaron hibridaciones a 42°C usando 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> cpm de sonda radioetiquetada (a aproximadamente 0,25 ng/ml). Se realizaron lavados con bajo rigor a temperatura ambiente en 2X SSC, SDS al 0,1 %; se realizaron lavados con alto rigor a 58-60°C en 0,2X SSC y SDS al 0,1%. Se visualizaron las placas hibridadas por fosforimaging (Molecular Dynamics) y/o <sup>32</sup>P autorradiografía. Se completaron cribas terciarias de clones positivos y se escindió el fago recombinante como un fagémido bicatenario (pBluescript) usando el fago auxiliar resistente a las interferencias ExAssist y la cepa SOLR según el protocolo del fabricante (Stratagene). Se caracterizaron recombinantes por secuenciación de ADN usando los dos cebadores T7 y T3.

55 *Creación de una biblioteca subgenómica Bgl II-EcoRI flavobacterium para aislamiento del término  $\Delta$ 4, 5 5'.* Se cortó 1  $\mu$ g de ADN genómico con 20 unidades de Eco RI, Bgl II y Hind III individualmente o como dobles digeridos. Se resolvieron los productos de restricción por electroforesis de gel sobre geles de agarosa al 1% hechos en tampón IX TAE. Se completaron hibridaciones de ADN Southern según protocolos clásicos [*Current Protocols in Molecular Biology*, 1.987, John Wiley and Sons, Nueva York] usando sonda 3 radioetiquetada con <sup>32</sup>P. Basado en este análisis Southern, se digirieron 5  $\mu$ g de ADN genómico *Flavobacteriano* con Bgl-II-Eco R1 y se resolvió el ADN sobre un gel de agarosa al 1% preparativa hecho en condiciones idénticas a las descritas para el gel analítico. El ADN que oscila de aproximadamente 1-2 kb se purificó en gel y se ligó en pLITMUS como una casete Bgl II-EcoR1. Se identificaron

clones positivos por detección sistemática de colonias PCR usando los cebadores 68 y 74 y se confirmó por secuenciación de ADN.

*Clonación PCR de gen  $\Delta 4$ , 5 y expresión recombinante en E. coli.* Se multiplicó por PCR directamente el gen de la glicuronidasa de longitud completa a partir de ADN genómico usando cebador de sentido directo 85 5' TGTTCTAGACATATGAAATCACTACTCAGTGC (SEC ID N° 13) 3' y cebador de sentido inverso 86 5' GTCTCGAGGATCCTTAAGACTGATTAATTGTT 3' (SEC ID N° 14) (con sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I indicado en negrita, 200 ng de ADN genómico y Vent ADN Polimerasa durante 35 ciclos. Se generaron dA salientes en una extensión de 10 minutos final a 72°C usando AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems). Se purificaron en gel productos PCR, se ligaron en el vector de clonación PCR TOPO/TA (Invitrogen) y se transformaron en células competentes químicamente TOP10 Directo. Se identificaron clones positivos por selección de colonias azul/blanco y se confirmó por Detección sistemática de colonias PCR. El gen  $\Delta 4$ , 5 de 1,2 kb se subclonó en plásmido de expresión pET28a (Novagen) como una casete *Nde*I-*Xho*I. Se confirmaron clones de expresión finales por secuenciación de ADN de plásmidos.

Para la expresión de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa que empieza con M21 ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ), el cebador de sentido directo 95 5' TGT TCT AGA CAT ATG ACA GTT ACG AAA GGC AA 3' (SEC ID N° 15) (que contiene también un sitio de restricción *Nde*I cerca de su término 5') se usó en vez de cebador 85 (anterior). Se usaron 50 ng del plásmido de expresión original pET28a/ $\Delta 4$ , 5 como el patrón de ADN en reacciones PCR que implica un total de 20 ciclos. Por otra parte, la clonación fue como se describió para el gen de longitud completa. Los dos plásmidos pET28a $\Delta 4$ , 5 y pET28a $\Delta 4,5^{\Delta 20}$  se transformaron en BL21 (DE3) para expresión como proteínas marcadas con 6X His N-terminales. Se cultivaron cultivos de 1 litro a temperatura ambiente (~20°C) en medio LB enriquecido con 40 µg/ml de kanamicina. Se indujo la expresión de proteínas con IPTG 500 µM añadido a un  $A_{600}$  de 1,0. Se permitió cultivar cultivos inducidos durante 15 horas (también a temperatura ambiente).

*Purificación de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa recombinante.* Se recogieron células bacterianas por centrifugación a 6.000 x g durante 20 minutos y se resuspendieron en 40 ml de tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, NaCl 0,5 M e imidazol 10 mM). Se inició la lisis por la adición de 0,1 mg/ml de lisozima (20 minutos a temperatura ambiente) seguido por sometimiento a ultrasonidos intermitente en un baño de hielo-agua usando un aparato de ultrasonidos Misonex XL a rendimiento del 40-50%. Se fraccionó el lisado bruto por centrifugación a baja velocidad (18.000 x g; 4°C; 15 minutos) y se filtró el sobrenadante por un filtro de 0,45 micrómetros. Se purificó la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa con etiqueta 6X-His por cromatografía de quelación con  $Ni^{+2}$  sobre una columna de 5 ml Hi-Trap (Pharmacia Biotech, Nueva Jersey) pre-cargada con  $NiSO_4$  200 mM y se equilibró con posterioridad con tampón de unión. La columna se hizo funcionar a un caudal de aproximadamente 3-4 ml/minuto que incluía una etapa de lavado intermedia con imidazol 50 mM. La  $\Delta 4$ , 5 enzima se eluyó de la columna en fracciones de 5 ml usando tampón de elución de imidazol alta (Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, NaCl 0,5 M e imidazol 250 mM). Se dializaron fracciones del pico durante la noche contra 4 litros de tampón de fosfato (fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, NaCl 0,5 M) para retirar el imidazol.

La etiqueta 6X His se escindió de manera eficaz por adición de trombina biotinilada a 2 unidades/miligramo de proteína recombinante, durante la noche a 4°C con inversión suave. Se capturó trombina por unión a estreptavidina - agarosa a 4°C durante dos horas usando el Estuche de Captura de Trombina (Novagen). El péptido escindido 5' MGSSHHHHHSSGLVPR 3' (SEC ID N° 16) se eliminó por diálisis final contra un volumen 1.000 veces de tampón de fosfato.

Se determinaron las concentraciones de proteína por ensayo de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA) y se confirmaron por espectroscopía UV usando un coeficiente de extinción molar teórico  $\epsilon=88.900$  para  $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ . Se valoró la pureza de las proteínas por SDS-PAGE seguido por coloración Azul brillante de Coomassie.

*Métodos computacionales.* Las predicciones de secuencias de señales se realizaron por SignalP V1. 1 usando el método computacional von Heijne [Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., y von Heijne, G., 1.997, *Protein Eng* 10, 1-6] con límites Y y S máximos ajustados a 0,36 y 0,88, respectivamente. Se realizaron alineaciones de secuencias múltiples de glicuronidasa de secuencias de la base de datos BLASTP seleccionadas (con puntuaciones que excedían de 120 bits y menores que 6% de aberturas) usando el programa CLUSTAL W (versión 1.81) prefijado a una sanción de abertura abierta de 10,0, una sanción de extensión de abertura de 0,20 y ambas sanciones de abertura hidrófila y específica del residuo puestas.

*Ensayo para actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos.* Se realizaron reacciones clásicas a 30°C e incluían tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 6,4, NaCl 50 mM, sustrato disacárido 500 µM y enzima 200 nM en un volumen de reacción de 100 µl. La hidrólisis de disacáridos de heparina se determinó espectrofotométricamente por medida de la pérdida del cromóforo  $\Delta 4$ , 5 medido a 232 nm. Se calculó la hidrólisis de sustrato usando los siguientes coeficientes de extinción molar determinados de manera empírica para cada sustrato disacárido:  $\Delta UH_{NAc}$ ,  $\epsilon_{232}=4.524$ ;  $\Delta UH_{NAc6S}$ ,  $\epsilon_{232}= 4.300$ ;  $\Delta UH_{NS}$ ,  $\epsilon_{232}=6.600$ ;  $\Delta UH_{NS,6S}$ ,  $\epsilon_{232}=6.075$ ;  $\Delta UH_{NH26S}$ ,  $\epsilon_{232}=4.826$ ;  $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ,  $\epsilon_{232}=4.433$ . Se extrapolaron las velocidades iniciales ( $V_0$ ) de actividades lineales que representan <10% de recambio de sustrato y se ajusta a cinética de pseudo-primer orden. Para experimentos cinéticos, se varió la concentración de disacárido para cada respectivo sustrato de concentraciones de 48 a 400 µM. Se extrapolaron los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de curvas de  $V_0$  frente a  $[S]$  ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten por

regresión de mínimos cuadrados, no lineal.

Para experimentos que miden el efecto relativo de fuerza iónica sobre la actividad de la glicuronidasa, la concentración de NaCl se varió de 0,05 a 1 M en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,4),  $\Delta UH_{NS,6S}$  200  $\mu$ M y enzima 100  $\mu$ M en condiciones de reacción clásicas de otro modo. El efecto del pH sobre la actividad catalítica se determinó de manera cinética variando las concentraciones de  $\Delta UH_{NS,6S}$  en tampón de fosfato de sodio 0,1 M a pH 5,2; 5,6; 6,0; 6,4; 6,8; 7,2 y 7,8. Se ajustaron los datos a cinéticas de Michaelis-Menten como se describió anteriormente y se representaron gráficamente las relaciones  $k_{cat}/K_m$  relativas como una función del pH.

*Detección de actividad de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa por electroforesis capilar.* Se sometieron 200  $\mu$ g de heparina (Celsus Laboratories) a digestión exhaustiva con heparinasa como se describe [Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R., y Sasisekharan, R., 1.999, *Science* 286, 537-42] con algunas modificaciones que incluían un tampón PIPES 50 mM, pH 6,5 con NaCl 100 mM en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l. Después de tratamiento con heparinasa, se añadieron 25 picomoles de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa a la mitad de la reacción original (pre-equilibrada a 30°C). Se retiraron alícuotas de 20  $\mu$ l a 1 minuto y 30 minutos y la actividad extinguida por calentamiento a 95°C durante 10 minutos. Se usaron 20  $\mu$ l del control  $\Delta 4$ , 5 negativo (también calentado durante 10 minutos) en el instante del tiempo 0. Se resolvieron productos disacáridicos por electroforesis capilar realizada durante 25 minutos en modo de polaridad positiva como se describió previamente [Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R., y Biemann, K., 1.998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4.176-81].

*Determinaciones de masa molecular.* Se realizaron determinaciones de masa molecular por MALDI-MS como se describe [Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R., y Biemann, K., 1.998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4.176-81].

Ejemplo 1: Clonación molecular de gen  $\Delta 4$ , 5 glucuronidasa de genoma de *F. heparinum*.

Para clonar el gen de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, se aisló una serie de péptidos procedentes de  $\Delta 4$ , 5 –glicuronidasa después de tratamiento con proteasa de la enzima purificada. La enzima natural se purificó directamente de cultivos de fermentación de *F. heparinum* usando un esquema de cromatografía de 5 etapas como se describió previamente [McLean, M. W., Bruce, J. S., Long, W. F., y Williamson, F. B., 1.984, *Eur J Biochem* 145, 607-15]. El grado de pureza se caracterizó por último por cromatografía de fase inversa, que indicó un único pico principal (**Figura 1A**). Se puede generar una serie de péptidos por una digestión de tripsina limitada de la enzima purificada. Se resolvieron fragmentos de 26 péptidos por cromatografía de fase inversa (**Figura 1B**). De éstos 26, al menos ocho péptidos (que corresponden a los picos principales 8, 12, 13, 19, 24 y 26) tuvieron suficiente rendimiento y pureza y se seleccionaron para determinación de secuencias de proteínas (**Figura 1C**).

Basándose en esta información, se diseñaron cebadores degenerados que corresponden a los picos 19, 24 y 26. Estos cebadores se usaron para multiplicar por PCR secuencias específicas  $\Delta 4$ , 5 que se tienen que usar como sondas de hibridación de ADN adecuadas para detección sistemática de la biblioteca genómica Flavobacteriana. Una combinación de dos pares de cebadores en particular (pico 19 sentido directo y pico 24 sentido inverso) proporcionó un producto PCR discreto de aproximadamente 450 pares de bases. La traducción de la correspondiente secuencia de ADN indicó que contenía la secuencia de aminoácidos esperada correspondiendo a los picos 19 y 24. El péptido del pico 12 también se mapeó en esta región. Se usó este fragmento de ADN multiplicado por PCR discreto (diseñado como sonda 1, **Figura 2A**) en las hibridaciones de placa iniciales. El clon más terminal 5' en esta detección sistemática (representada por el clon G5A) incluía aproximadamente la mitad del tamaño de gen previsto correspondiendo al término carboxi del ORF putativo. De manera invariable, todos los clones aislados poseían un sitio *Eco* RI en sus términos respectivos 5'. En un intento para aislar un clon de la biblioteca de fagos que poseía la otra mitad del gen, se volvieron a investigar placas adicionales, esta vez usando una sonda de hibridación de ADN específica N-terminal (sonda 2) en tándem con la sonda 1 original. Esta segunda estrategia también fracasó para proporcionar clones con el gen  $\Delta 4$ , 5 completamente intacto. Un clon solapado parcial (G5H), sin embargo, extendió la secuencia 5' conocida de  $\Delta 4$ , 5 por aproximadamente 540 pares de bases.

Se tomaron propuestas alternativas en un intento para obtener el término 5' del gen glicuronidasa. Se estimó que el tamaño de esta región en blanco, basándose en el peso molecular de la proteína natural, fuera aproximadamente 45 aminoácidos (o 135 pares de bases). Se completaron análisis de ADN southern para identificar sitios de restricción de ADN potencialmente útiles flanqueando el extremo 5' del gen  $\Delta 4$ , 5 (**Figura 2B**). Este mapeo de restricción implicó por último el uso del sitio *Eco* RI en el gen junto con sonda 3 de hibridación (cuyo extremo 3' yace justo en 5' para este sitio de restricción) para sesgar de manera positiva nuestra investigación para el término amino restante. Basándose en este mapa refinado, se aisló con éxito y se subclonó un  $\Delta 4$ , 5 fragmento de *Bgl* II- *Eco* RI de aproximadamente 1,5 kb en pLITMUS. El término 5' del gen  $\Delta 4$ , 5 se obtuvo de secuenciación directa de ADN de este clon subgenómico.

Resultados

Un resumen del gen de longitud completa obtenido de los dos métodos de clonación de solapamiento se representa en la Figura 2C. El análisis de la secuencia de ADN recopilada de los clones  $\Delta 4$ , 5 solapados (y confirmado por la secuenciación directa de un único clon genómico multiplicado por PCR) se muestra en la Figura 3. La secuencia  $\Delta 4$ ,

5 codificadora está constituida por 1.209 pares de bases correspondiendo a un ORF que codifica una proteína de 402 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos para la enzima de longitud completa se proporcionan como SEC ID Nos. 3 y 4, respectivamente. El peso molecular previsto de 45.621 daltons para la proteína traducida se corresponde muy bien con una masa molecular empírica de 45.566 daltons para la enzima *Flavobacteriana* purificada determinada por MALDI-MS. Todos los péptidos para los que se obtuvo información de secuencias se mapearon para este  $\Delta 4, 5$  ORF. Basándose en más análisis de secuencias principales, también se identificó una secuencia de señal probablemente bacteriana que expande 1-20 aminoácidos que poseen también un sitio de escisión putativo entre los residuos G20 y M21 (**Figura 4B**). La presencia de un término amino fuertemente hidrófobo (véase la gráfica de hidropatía, **Figura 4A**) y la identificación de una unidad de escisión de peptidasas AXXA soporta además este supuesto [von Heijne, G., 1.988, *Biochim Biophys Acta* 947, 307-33].

Una búsqueda de secuencias relacionadas en la base de datos de proteínas NCBI condujo a varias enzimas funcionalmente relacionadas. En una alineación de secuencias múltiples de nuestra enzima clonada con glucuronil hidrolasas seleccionadas, se encontró una homología que correspondía en general a más de 30% de identidad y casi 50% de similitud al nivel de secuencia principal (**Figura 4C**). Esta relación expande la mayoría de la secuencia enzimática, excluyendo el N-terminal. Basándose en esta alineación, se encuentran diversas posiciones muy conservadas en la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa de *F. heparinum* que incluían, en particular, diversos restos aromáticos y ácidos. Otros aminoácidos invariantes de posible importancia catalítica incluyen H115 y R151.

Ejemplo 2: Expresión recombinante y purificación de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa.

Usando PCR, se clonó del genoma de *F. heparinum* tanto la enzima de longitud completa como la enzima "madura" que carece de la secuencia de señales de 20 aminoácidos N-terminales ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) en un plásmido de expresión basado en T7. La clonación en pET28a permitió la expresión de la glicuronidasa una proteína de fusión de etiqueta 6X His N-terminal. Los estudios de expresión piloto se centraron en la enzima de longitud completa. En estos experimentos iniciales, se examinaron diversas condiciones de inducción diferentes tales como temperatura, tiempo y longitud de inducción e incluso concentraciones IPTG. En cada caso, la enzima de longitud completa estuvo presente casi exclusivamente como una fracción insoluble. Los intentos para purificar la enzima directamente a partir de cuerpos de inclusión y volver a plegar después la proteína aparentemente plegada erróneamente no tuvieron éxito inicialmente; aunque se consiguió parcialmente solubilidad por un uso combinado de detergentes (por ej., CHAPS), aumentando las concentraciones de sal y la presencia de glicerol, la enzima parcialmente purificada estuvo en gran parte inactiva.

Una posible explicación para esta insolubilidad señala a la presencia de una región muy hidrófoba dentro de la secuencia de las proteínas de tipo natural que expanden los primeros 20 aminoácidos. La secuencia N-terminal también se prevé que comprenda una secuencia de señal procariótica escindible con el sitio de escisión más probable que tienen lugar entre la posición G20 y M21 (Figura 3). En esta secuencia, también se encuentra que la alanina repite 5' AXXAXXAXXA 3' (SEC ID N° 17) que puede servir como parte de la secuencia de reconocimiento de escisión real [von Heijne, G., 1.988, *Biochim Biophys Acta* 947, 307-33]. Este péptido señal indicaría una localización periplásmica para la glicuronidasa con el N-terminal de la proteína (madura) segregada que empieza con M21. Se expresa de manera recombinante esta variante madura ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) en que la secuencia señal se reemplazó completamente por una etiqueta de purificación 6X His N-terminal. La expresión recombinante de la enzima que carece de la secuencia señal presumida proporcionó resultados notablemente diferentes. En este caso, los niveles de expresión recombinante solubles alcanzaron de manera rutinaria varios cientos de miligramos de proteína por litro de células inducidas. La actividad específica de esta enzima sobre el disacárido de heparina  $\Delta UH_{NaC}$  fue asimismo robusta.

#### Resultados

Un resumen de la expresión y purificación de  $\Delta 4,5^{\Delta 20}$  se resume en la **Figura 5** y **Tabla 1**. Una purificación en dos etapas constituida por cromatografía de quelación de  $Ni^{+2}$  seguido por escisión de trombina para retirar la etiqueta de purificación de 6X His, proporcionó típicamente más de 200 mg de más de 90% de enzima pura cuando se valora por SDS-PAGE seguido por Coloración con Azul Brillante de Coomassie. Se consiguió una purificación de aproximadamente tres veces de actividad en una sola etapa cromatográfica. Lo más notablemente, la actividad específica de la enzima recombinante que actúa sobre  $\Delta UH_{NaC}$  excedió mucho de estos valores indicados en la bibliografía [Warnick, C. T. y Linker, A., 1.972, *Biochemistry* 11, 568-72]. Aunque la eliminación de la etiqueta 6X His del N-terminal de la enzima fue innecesario para una actividad hidrolítica óptima, la presencia de la etiqueta histidina pareció inducir la precipitación de proteína durante un tiempo prolongado especialmente en concentraciones de enzima mayores. Se retiró por lo tanto esta etiqueta para todos los experimentos bioquímicos posteriores. De esta manera, la proteína recombinante fue estable a 4°C durante al menos dos semanas, tiempo durante el cual permaneció en disolución a concentraciones de proteínas que exceden de 10 mg/ml en las condiciones tamponadas descritas.

Se determinó una masa molecular de 44.209 daltons para la enzima recombinante (es decir,  $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) por MALDI-MS. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos para la enzima que carece de la secuencia señal de 20 aminoácidos N-terminal se proporciona como SEC ID Nos. 1 y 2, respectivamente. Este peso molecular establecido de manera empírica es consistente con su valor teórico de 43.956 Daltons basado en su composición de aminoácidos. Este



- valor difiere físicamente por 1.357 Daltons en comparación con un peso molecular de 45.566 daltons medido asimismo para la enzima natural. Este diferencial de masa está ampliamente justificado por la eliminación lograda en la proteína recombinante de la secuencia señal de 20 aminoácidos. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de modificaciones post-traduccionales diferenciales tales como glicosilación que justifica ampliamente las diferencias observadas entre las dos poblaciones de enzimas. Desafortunadamente, el bloqueo químico impide que se determine la secuencia N-terminal de la proteína natural.

<i>Etapa de Purificación</i>	<i>Rendimiento de Proteína (mg)</i>	<i>Actividad Sp. (<math>\mu</math>moles DiS/ min./ mg proteína)</i>	<i>% purificación</i>
Lisado bruto	400	4,7	—
Cromatografía Ni <sup>+2</sup>	205	12,9	2,7
Escisión de trombina	205	13,6	2,9

- Tabla 1. *Resumen de purificación para la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa recombinante.* Se midieron las actividades específicas para cada fracción usando 800 ng de proteína y 120  $\mu$ M del disacárido heparina no sulfatado (DiS)  $\Delta$ UH<sub>NA6</sub> en un volumen de reacción de 110  $\mu$ l. Se calculó la purificación del plegamiento respecto a la actividad específica medida para el lisado bruto.

Ejemplo 3: Condiciones bioquímicas para actividad enzimática óptima.

- Para determinar las condiciones óptimas de reacción para la actividad de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, se analizaron las velocidades de reacción iniciales como una función del tampón, pH, temperatura y fuerza iónica (**Figura 6**). Para estos experimentos, se usó sustrato disacárido de heparina disulfatada  $\Delta$ UH<sub>NS,6S</sub>. Basándose en los que se conoce acerca de la degradación de glicosaminoglicanos de tipo heparina/sulfato de heparán por *flavobacterias* así como la caracterización bioquímica inicial de esta enzima y relacionadas [Warnick, C. T. y Linker, A., 1.972, *Biochemistry* 11, 568-72], se planteó la hipótesis de que un disacárido de heparina sería un sustrato óptimo para la  $\Delta 4$ , 5 -glicuronidasa. Se controló de manera rutinaria la actividad enzimática por una pérdida de absorbancia a 232 nm, que corresponde indirectamente a la hidrólisis del ácido urónico a partir del extremo no reductor.

Resultados

- En estas condiciones, se observó una dependencia de la concentración de NaCl actividad que fue óptima entre 50 y 100 mM. Las concentraciones de NaCl que excedían de 100 mM demostraron un efecto significativo y relativamente muy negativo sobre la actividad específica (**Figura 6A**), es decir, teniendo lugar aproximadamente 60% de inhibición a NaCl 250 mM respecto a 100% de actividad medida a NaCl 100 mM. La brusca transición observada en la curva de valoración de NaCl sugiere una función importante de las interacciones iónicas en algún aspecto de la función enzimática.

- El perfil de pH observado para la glicuronidasa tiene forma de campana (**Figura 6C**) con un pH óptimo de 6,4. Notablemente, las velocidades de reacción iniciales se redujeron significativamente a las temperaturas más altas medidas, especialmente a 42°C (**Figura 6B**). Los experimentos de preincubación a 30, 37 y 42°C para valorar estabildades enzimáticas relativas a estas temperaturas, sin embargo, no indicaron cambio significativo en las actividades enzimáticas relativas cuando se midieron con posterioridad en las condiciones de reacción a 30°C clásicas. Los resultados de dicho experimento sugieren fuertemente que la labilidad térmica no es el problema.

- Como una variable final para optimizar las condiciones de reacción *in vitro* de  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, se considera también cualquier requerimiento para iones de metal divalente. No se encuentran pruebas de que se requieran metales para catálisis o para activar la enzima en cualquier extensión apreciable.

- Habiendo establecido las condiciones de reacción para la actividad óptima de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa, se compara a continuación la actividad específica de la enzima recombinante ( $\Delta 4,5^{\Delta 20}$ ) respecto a la enzima natural purificada directamente de *F. heparinum* (**Figura 7**). Las actividades de las dos fracciones enzimáticas se midieron en paralelo en idénticas condiciones de reacción. En esta comparación, la  $\Delta 4$ , 5 recombinante posee una actividad de la glicuronidasa específica aproximadamente tres veces mayor respecto a la enzima natural. Estas velocidades observadas demuestran bastante claramente que la enzima  $\Delta 4$ , 5 clonada posee actividad "de cepa natural" que de ningún modo se ve afectada de manera adversa por su expresión recombinante en *E. coli*.

Ejemplo 4: Especificidad del sustrato  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa.

- Se investigó la especificidad de la  $\Delta 4$ , 5-glicuronidasa actuando sobre diversos sustratos disacáridicos de glicosaminoglicano. Los diversos sustratos examinados incluían ambos disacáridos heparina y condroitina así como

un hialuronadato. En particular, se considera la posibilidad de cualquier discriminación estructural referente a la posición del enlace glicosídico (1→4 frente a 1→3) y estado de sulfatación relativa dentro del disacárido. Para cada sustrato, se determinaron parámetros cinéticos basándose en perfiles de saturación del sustrato que se ajustan a supuestos de Michaelis-Menten (**Figura 8**). Estos valores cinéticos se enumeran en la **Tabla 2**. Para el disacárido heparina, los valores de  $k_{cat}$  variaron de manera significativa de aproximadamente 2 a 15 s<sup>-1</sup>, mientras que eran comparables los valores aparentes de  $K_m$  para cada respectivo disacárido, oscilando de aproximadamente 100-300 μM.

#### Resultados

El disacárido heparina  $\Delta U_{2S}H_{NS}$  no fue un sustrato a cualquiera de las concentraciones estudiadas, incluso después de un tiempo de incubación prolongado que se extiende varias horas. Para estos disacáridos heparina que se hidrolizaron en las condiciones ensayadas y para los que se podían determinar parámetros cinéticos, fue aparente una preferencia de sustrato interesante. En esta jerarquía y en estas condiciones, los dos disacáridos  $\Delta UH_{NAC}$  y  $\Delta UH_{NAC6S}$  fueron los mejores sustratos; en comparación,  $\Delta UH_{NH26S}$  y  $\Delta UH_{NS}$  fueron menos buenos como sustratos. Los valores cinéticos para  $\Delta UH_{NS,6S}$  cayeron más o menos en la mitad entre estos dos límites.

Los datos muestran que la heparina es un sustrato mejor que condroitina /dermatán y/o hialuronán, aunque estos compuestos también son sustratos. No se hidrolizó ninguno de los disacáridos no heparina en las condiciones para medir cinéticas de sustrato. Este resultado indica una discriminación inequívoca de la  $\Delta 4, 5$  respecto a la posición del enlace, con una fuerte preferencia para enlaces 1→4 frente a 1→3. Al mismo tiempo, estos disacáridos se hidrolizaron lentamente a diversos grados cuando las reacciones enzimáticas se realizaron por un periodo mucho más largo (> 12 horas) y a concentraciones enzimáticas considerablemente mayores. Después de aproximadamente 18 horas, se hidrolizó más del 80% del disacárido condroitina monosulfatada ( $\Delta UGal_{NAC6S}$ ), mientras que aún estaban presentes la condroitina no sulfatada ( $\Delta UGal_{NAC}$ ) y el disacárido hialuronán ( $\Delta UH$ ) a aproximadamente 40% y 65%, respectivamente. La importancia de la posición del enlace no es, por lo tanto, absoluta. El efecto positivo aparente de positivo efecto de 6-O-sulfatación de la condroitina dentro de la galactosamina es consistente con nuestros resultados para los sustratos heparina y proporciona más pruebas para la influencia de esta posición en dictar especificidad al sustrato.

Basándose en la especificidad del sustrato definida de manera cinética para los disacáridos, se señala validar estos resultados mientras al mismo tiempo se investiga la utilidad de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa como una herramienta enzimática para análisis composicional de HSGAG. De esta manera, la  $\Delta 4, 5$  debería ser muy útil en la valoración de la composición de los disacáridos dando como resultado el tratamiento previo de la heparinasa de heparina/sulfato de heparán. Para este experimento particular, se pretrataron 200 μg de heparina con un cóctel de heparinasa. Esta digestión exhaustiva fue seguida directamente después por un tratamiento de la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa relativamente corto (1 minuto) o largo (30 minutos) realizado en las condiciones óptimas de reacción. Los productos disacáridicos se resolvieron después por electroforesis capilar. El perfil de movilidad electroforética para los sacáridos  $\Delta 4, 5$  tratados se comparó después directamente al control no tratado (es decir, sólo tratamiento de la heparinasa) realizado en idénticas condiciones (**Figura 9**). Estuvieron presentes picos de 7 disacáridos en el electroforetograma capilar correspondiendo a la heparinasa sólo control (A.). Se hizo una asignación estructural para cada uno de estos picos basándose en análisis de composición previamente establecidos. Para la mayor parte, la resolución de estos sacáridos que contienen  $\Delta 4, 5$  fue tal que cada pico alterno (1,3,5,...) correspondió a un disacárido que poseía un ácido urónico 2-O-sulfatado en el extremo no reductor. De manera previsible, la amplitud relativa y el área de estos picos permanecieron igual, durante el periodo completo de la  $\Delta 4, 5$  preincubación. Este resultado invariable se extendió a 18 horas. Por otra parte, se eliminaron los picos que correspondían a disacáridos que carecían del 2-O-sulfato. Por otra parte, las velocidades relativas de estas desapariciones correspondieron elegantemente a sus respectivas preferencias como sustratos cuando se determinan en el experimento cinético previo. Se hidrolizó esencialmente  $\Delta UH_{NAC6S}$  (pico 8) en un minuto;  $\Delta UH_{NS,6S}$  (pico 4) y  $\Delta UH_{NS}$  (pico 6) se hidrolizaron aproximadamente 75% y 50%, respectivamente. Estos dos últimos sustratos se agotaron completamente por 30 minutos.

Además de los disacáridos asignados, la  $\Delta 4, 5$ -glicuronidasa también actuó sobre un tetrasacárido generado por heparinasa (identificado como pico 2 en la **Figura 9**). La asignación de Pico 2 como un tetrasacárido se confirmó por MALDI-MS indicando una masa de 1.036,9 que corresponde a un tetrasacárido acetilado por separado con cuatro sulfatos. El análisis de disacáridos de este tetrasacárido indicó además que no contenía un 2-O sulfato en el extremo no reductor. La  $\Delta 4, 5$  enzima hidrolizó aproximadamente la mitad del material de partida después de un minuto. La velocidad relativa de hidrólisis para este tetrasacárido se correspondió más o menos con la velocidad observada para el disacárido  $\Delta UH_{NS}$  (pico 6). Este excitante resultado indica claramente que un sacárido de cadena más larga tal como un tetrasacárido es de hecho un sustrato para la hidrólisis  $\Delta 4, 5$  catalizada.

<i>Sustratos disacáridicos</i>	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m$	$k_{cat}/K_m$ relativa
$\Delta UH_{Nac}$	15,3 $\pm$ 0,9	283 $\pm$ 31	0,054	0,49
$\Delta UH_{Nac,6S}$	11,7 $\pm$ 0,6	107 $\pm$ 15	0,110	1,0
$\Delta UH_{NS}$	4,9 $\pm$ 0,4	251 $\pm$ 40	0,020	0,18
$\Delta UH_{NS,6S}$	8,8 $\pm$ 0,9	334 $\pm$ 57	0,026	0,24
$\Delta UH_{NH_2,6S}$	2,4 $\pm$ 0,2	235 $\pm$ 40	0,010	0,09
$\Delta U_{2S}H_{NS}$	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.

5 Tabla 2. *Parámetros cinéticos para disacáridos heparina*. Se determinaron los valores de  $k_{cat}$  y  $K_m$  a partir de análisis de regresión no lineal de las curvas de Michaelis-Menten presentadas en la **Figura 9**. \*N. A., no se detectó actividad para  $\Delta U_{2S}H_{NS}$ .

10 Habiendo descrito las realizaciones preferidas en el momento presente y según la presente invención, se cree que se sugerirán otras modificaciones, variaciones y cambios a los expertos en la materia a la vista de las explicaciones expuestas en la presente memoria. Se tiene que entender, por lo tanto, que se cree que todas esas variaciones, modificaciones y cambios se encuentran dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> Instituto de Tecnología de Massachusetts

<120> Delta 4,5 Glicuronidasa y Usos de la Misma

<130> M00656/70073 (HCL/MAJ)

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 382

<212> PRT

<213> Flavobacterium heparinum

<400> 1

Met Thr Val Thr Lys Gly Asn Gly Asp Asp Trp Leu Lys Lys Ser Thr  
1 5 10 15

Lys Thr Ala Val Ile Gln Leu Thr Arg Ala Ala Gln Thr Tyr Thr Pro  
20 25 30

Gly Met Asn Pro Arg Ser Val Asn Pro Asp Gly Thr Val Arg Leu Ala  
35 40 45

Pro Pro Arg Asp Trp Thr Thr Gly Phe Phe Pro Gly Thr Leu Trp Tyr  
50 55 60

Gly Tyr Glu Leu Ser Gly Asp Lys Asn Leu Ala Ala Glu Ala Lys Arg  
65 70 75 80

Phe Thr Leu Ala Leu Asp Thr Ile Gln Tyr Val Lys Asp Thr His Asp  
85 90 95

Leu Gly Phe Met Leu Tyr Cys Ser Tyr Gly Asn Ala Tyr Arg Val Thr  
100 105 110

Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Lys Pro Leu Glu Asn Gly Ala Ala Asn Leu  
115 120 125

Tyr Ala Arg Phe Asn Lys Lys Val Gly Ala Ile Arg Ser Trp Asp Phe  
130 135 140

Gly His Trp Gln Phe Pro Val Ile Ile Asp Asn Leu Met Asn Leu Glu  
145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Trp Ala Gly Lys Glu Phe Asn Lys Pro Glu Trp Phe Asp  
165 170 175

Ala Ala Lys Thr His Ala Val Thr Thr Met Lys Asn His Phe Arg Lys  
180 185 190

Asp Tyr Ser Ser Tyr His Val Ile Ser Tyr Asp Thr Leu Ser Gly Lys

ES 2 421 134 T3

195	200	205
Val Leu Gln Arg Glu Thr His Gln Gly Leu Thr Asn Glu Ser Ala Trp		
210	215	220
Ala Arg Gly Gln Ala Trp Gly Leu Tyr Gly Tyr Thr Met Ser Tyr Lys		
225	230	235 240
Asp Thr Lys Asp Lys Lys Phe Ile Glu His Ala Glu His Ile Ala Ala		
	245	250 255
Phe Ile Met Asn His Pro Ala Met Pro Ala Asp Lys Ile Pro Leu Trp		
	260	265 270
Asp Phe Asp Val His Asn Arg Asp Arg Ser Pro Arg Asp Ala Ser Ala		
	275	280 285
Ala Ala Val Ile Ala Ser Ala Leu Leu Asp Leu Ser Thr Gln Val Lys		
	290	295 300
Asp Gly Gln Lys Tyr Phe Lys Phe Ala Glu Asp Ile Leu Lys Thr Leu		
305	310	315 320
Ser Ser Asp Glu Tyr Leu Ala Lys Pro Gly Glu Asn Gln Phe Phe Ile		
	325	330 335
Leu Lys His Ser Val Gly Ala Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Ile Asp Thr		
	340	345 350
Pro Leu Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ala Leu Lys Arg Tyr		
	355	360 365
Ala Glu Ile Lys Lys Ile Asp Leu Lys Thr Ile Asn Gln Ser		
	370	375 380

<210> 2  
 <211> 1149  
 <212> ADN  
 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 2  
 atgacagtta cgaaaggcaa cggc gatgac tggttaaaga aatcaactaa aaccgcagta 60  
 atacagttaa cacgggctgc acaaacctat acaccaggca tgaaccaag gtctgtcaat 120  
 ccggacggga cggtaaggct ggcccctccc cgcgactgga ccacaggttt tttcccggga 180  
 acgttggtgtggt atggttatga actatcgggc gataaaaacc tggcggccga agccaaaaga 240  
 tttacccttg ccttagatac gatacaatat gttaaagata cgcacgacct gggctttatg 300  
 ttgtattggt cttatggcaa tgcctaccgt gtaaccggag acaagattta cctgaagcca 360  
 ttagaaaacg gtgcggccaa tttatatgcc cgtttcaata aaaaagtagg ggccatccgc 420

ES 2 421 134 T3

tcatgggatt tcggacactg gcaatttccg gtaattatag acaacctgat gaacctggag 480  
tattatact gggcaggaaa ggaattcaat aagccagaat ggttcgatgc tgctaaaaca 540  
catgcggtta cgaccatgaa aaaccatttc agaaaagatt atagttctta ccatgtgatc 600  
agttacgata cctgtctctg aaaagtactg caacgtgaaa cccatcaggg acttaccac 660  
gaatcggcct gggcacgggg gcaagcctgg ggactttacg gctataccat gagctataag 720  
gatacгааag acaaaaaatt catcgaacat gcagagcata tcgctgcttt catcatgaac 780  
caccctgcaa tgccggcaga taaaattcca ctttgggact ttgatgtcca caaccgagc 840  
aggtcgcaa gggatgcttc tgctgctgca gtaattgctt cagccctgct agacctgagc 900  
acgcaggtaa aagatggcca gaaatatttt aaatttgccg aggatatcct gaaaacattg 960  
tcatcagatg aatacctggc gaaaccggc gagaaccagt ttttatatt gaaacatagt 1020  
gtaggtgcat tgctgtacaa ttcggaaatc gatacacctt tgaattatgc cgactattac 1080  
tatctggagg ctttaaaacg ctatgcagag attaaaaaaaa ttgacctgaa aacaattaat 1140  
cagtcttaa 1149

<210> 3  
<211> 402  
<212> PRT  
<213> Flavobacterium heparinum

<400> 3  
Met Lys Ser Leu Leu Ser Ala Phe Val Ala Thr Ile Ala Leu Ile Gly  
1 5 10 15  
Ser Ala Asn Gly Met Thr Val Thr Lys Gly Asn Gly Asp Asp Trp Leu  
20 25 30  
Lys Lys Ser Thr Lys Thr Ala Val Ile Gln Leu Thr Arg Ala Ala Gln  
35 40 45  
Thr Tyr Thr Pro Gly Met Asn Pro Arg Ser Val Asn Pro Asp Gly Thr  
50 55 60  
Val Arg Leu Ala Pro Pro Arg Asp Trp Thr Thr Gly Phe Phe Pro Gly  
65 70 75 80  
Thr Leu Trp Tyr Gly Tyr Glu Leu Ser Gly Asp Lys Asn Leu Ala Ala  
85 90 95  
Glu Ala Lys Arg Phe Thr Leu Ala Leu Asp Thr Ile Gln Tyr Val Lys  
100 105 110  
Asp Thr His Asp Leu Gly Phe Met Leu Tyr Cys Ser Tyr Gly Asn Ala

## ES 2 421 134 T3

	115					120						125			
Tyr	Arg	Val	Thr	Gly	Asp	Lys	Ile	Tyr	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly
	130					135					140				
Ala	Ala	Asn	Leu	Tyr	Ala	Arg	Phe	Asn	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Ile	Arg
145					150				155					160	
Ser	Trp	Asp	Phe	Gly	His	Trp	Gln	Phe	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Asn	Leu
				165					170					175	
Met	Asn	Leu	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Ala	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys	Pro
			180					185					190		
Glu	Trp	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	His	Ala	Val	Thr	Thr	Met	Lys	Asn
		195					200					205			
His	Phe	Arg	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	His	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Thr
	210					215					220				
Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Gln	Arg	Glu	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Thr	Asn
225					230					235				240	
Glu	Ser	Ala	Trp	Ala	Arg	Gly	Gln	Ala	Trp	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Thr
				245					250					255	
Met	Ser	Tyr	Lys	Asp	Thr	Lys	Asp	Lys	Lys	Phe	Ile	Glu	His	Ala	Glu
			260					265					270		
His	Ile	Ala	Ala	Phe	Ile	Met	Asn	His	Pro	Ala	Met	Pro	Ala	Asp	Lys
		275					280					285			
Ile	Pro	Leu	Trp	Asp	Phe	Asp	Val	His	Asn	Arg	Asp	Arg	Ser	Pro	Arg
	290					295					300				
Asp	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Ser	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser
305					310					315				320	
Thr	Gln	Val	Lys	Asp	Gly	Gln	Lys	Tyr	Phe	Lys	Phe	Ala	Glu	Asp	Ile
				325					330					335	
Leu	Lys	Thr	Leu	Ser	Ser	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Glu	Asn
			340					345					350		
Gln	Phe	Phe	Ile	Leu	Lys	His	Ser	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Tyr	Asn	Ser
		355					360						365		
Glu	Ile	Asp	Thr	Pro	Leu	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Ala
	370					375						380			
Leu	Lys	Arg	Tyr	Ala	Glu	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Lys	Thr	Ile	Asn
385					390					395				400	
Gln	Ser														

&lt;210&gt; 4

ES 2 421 134 T3

<211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 4

atgaaatcac tactcagtgc gtttgttgcg actattgcat taataggatc tgcaaacggg	60
atgacagtta cgaaaggcaa cggcgatgac tggtaaaga aatcaactaa aaccgcagta	120
atacagttaa cacgggctgc acaaacctat acaccaggca tgaaccaag gtctgtcaat	180
ccggacggga cggtaaggct ggcccctccc cgcgactgga ccacaggttt tttcccggga	240
acgttgtggt atggttatga actatcgggc gataaaaacc tggcggccga agccaaaaga	300
tttacccttg ccttagatac gatacaatat gtaaagata cgcacgacct gggctttatg	360
ttgtattggt cttatggcaa tgcctaccgt gtaaccggag acaagattta cctgaagcca	420
ttagaaaacg gtgcggccaa tttatatgcc cgtttcaata aaaaagtagg ggccatccgc	480
tcatgggatt tcggacactg gcaatttccg gtaattatag acaacctgat gaacctggag	540
tatttatact gggcaggaaa ggaattcaat aagccagaat ggttcgatgc tgctaaaaca	600
catgcggtta cgacatgaa aaaccatttc agaaaagatt atagtctta ccatgtgatc	660
agttacgata ccctgtctgg aaaagtactg caacgtgaaa cccatcaggg acttaccaac	720
gaatcggcct gggcacgggg gcaagcctgg ggactttacg gctataccat gagctataag	780
gatacgaaag acaaaaaatt catcgaacat gcagagcata tcgctgcttt catcatgaac	840
caccctgcaa tgccggcaga taaaattcca ctttgggact ttgatgtcca caaccgagac	900
aggtcgcaa gggatgcttc tgctgctgca gtaattgctt cagccctgct agacctgagc	960
acgcaggtaa aagatggcca gaaatatttt aaatttgccg aggatcctt gaaaacattg	1020
tcatcagatg aatacctggc gaaaccggc gagaaccagt tttttatatt gaaacatagt	1080
gtaggtgcat tgctgtacaa ttcggaaatc gatacacctt tgaattatgc cgactattac	1140
tatctggagg ctttaaaacg ctatgcagag attaaaaaaa ttgacctgaa aacaattaat	1200
cagtcttaa	1209

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Degenerado



<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<400> 5  
 garacncayc arggnytnac naaygar

27

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador Degenerado

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<400> 6  
 ytcrttngtn arncctgrt gngtytc

27

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Degenerado

<220>

<221> característica diversa  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<400> 7  
 aaytaygcng aytaytayta y

21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Degenerado

<220>

<221> característica diversa  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<400> 8  
 rtartartar tcngcrtart t

21

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Degenerado

<220>

<221> característica diversa  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>

<221> característica diversa  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n = a, g, c o t/u

<220>

<221> característica diversa  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n = a, g, c o t/u  
  
 <220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = a, g, c o t/u  
  
 <400> 9  
 caracntaya cncnggnat gaay 24  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
  
 <223> Cebador  
  
 <400> 10  
 ttcattggtcg taaccgcatg 20  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
  
 <223> Cebador  
  
 <400> 11  
 tatacaccag gcatgaaccc 20  
  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
  
 <223> Cebador  
  
 <400> 12  
 cccagtataa atactccagg t 21  
  
 <210> 13  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

tggttctagac atatgaaatc actactcagt gc

32

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 14

gtctcgagga tccttaagac tgattaattg tt

32

<210> 15

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

tggttctagac atatgacagt tacgaaaggc aa

32

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Etiquetado 6X His N-terminal Escindido

<400> 16

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Arg

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Unidad

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (2) .. (3)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (5) .. (6)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (8) .. (11)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 17

Ala Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Ala  
 1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Flavobacterium heparinum

<400> 18

Glu Phe Asn Lys Pro Glu Trp Phe Asp Ala Ala Lys  
 1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Flavobacterium heparinum

<400> 19

Pro Gly Glu Asn Gln Phe Phe Ile Leu Lys  
 1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Flavobacterium heparinum

<400> 20

Phe Thr Leu Ala Leu Asp Thr Ile Gln Tyr Val Lys  
 1 5 10

ES 2 421 134 T3

<210> 21  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 21  
 Val Leu Gln Arg Glu Thr His Gln Gly Leu Thr Asn Glu Ser Ala Trp  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Gly Gln Ala Trp Gly Leu Tyr Gly Tyr Thr Met Ser Tyr Lys  
 20 25 30

<210> 22  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 22  
 His Ser Val Gly Ala Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Ile Asp Thr Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ala Leu Lys  
 20 25

<210> 23  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 23  
 Thr Ala Val Ile Gln Leu Thr Arg Ala Ala Gln Thr Tyr Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Met Asn Pro Arg Ser Val Asn Pro Asp Gly Thr Val Arg Leu Ala Pro  
 20 25 30

Pro Arg

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una glicuronidasa  $\Delta$ 4,5-insaturada sustancialmente pura o aislada con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas a un ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4.
2. Una glicuronidasa según la reivindicación 1, en la que la glicuronidasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3.
3. Una composición que comprende la glicuronidasa  $\Delta$ 4,5-insaturada como se definió en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 10 4. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:
- a) moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos mostrada como la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 y que codifican una glicuronidasa  $\Delta$ 4,5-insaturada,
- 15 b) moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico de (a) en secuencia de codones debido a degeneración del código genético y
- c) complementos de (a) o (b).
5. Una molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4, en la que la molécula de ácido nucleico aislada se codifica para la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.
- 20 6. Una molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4, en la que la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.
7. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, unido de manera operable a un activador.
8. Una célula huésped que comprende un vector de expresión según la reivindicación 7.
9. Una preparación farmacéutica que comprende:
- 25 una glicuronidasa según la reivindicación 1 ó 2, una composición según la reivindicación 3, un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4-6 o un vector según la reivindicación 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Un método *in vitro* para escindir un glicosaminoglicano, que comprende poner en contacto un glicosaminoglicano con una glicuronidasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición según la reivindicación 3.
- 30 11. Un método *in vitro* de eliminación de heparina de un fluido que contiene heparina, que comprende poner en contacto un fluido que contiene heparina con una glicuronidasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición según la reivindicación 3.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que la glicuronidasa se inmoviliza sobre un soporte sólido, preferiblemente en el que también se inmoviliza la heparinasa sobre el soporte sólido.
- 35 13. Un método para analizar un glicosaminoglicano, que comprende poner en contacto un glicosaminoglicano con una glicuronidasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición según la reivindicación 3.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que el método es un método para:
- a) identificar la presencia de un glicosaminoglicano particular en una muestra,
- b) determinar la pureza de un glicosaminoglicano en una muestra,
- 40 c) determinar la composición de un glicosaminoglicano en una muestra y/o
- d) determinar la secuencia de unidades sacáridas en un glicosaminoglicano.
15. Un método según la reivindicación 14, en el que el método es un método para determinar la secuencia de unidades sacáridas en un glicosaminoglicano, que comprende además una técnica analítica adicional seleccionada del grupo que consiste en: espectrometría de masas, espectroscopía de RMN, electroforesis en gel, electroforesis capilar y HPLC.
- 45

16. Un método *in vitro* según la reivindicación 10, en el que el glicosaminoglicano comprende al menos una unidad disacárida.
17. Un método según la reivindicación 16, en el que la longitud del glicosaminoglicano excede de dos unidades sacáridas y/o en el que el glicosaminoglicano consta de:
- 5 a) unidades disacáridas  $\Delta UH_{NAC}$ ,  
b) unidades disacáridas  $\Delta UH_{NAC,6S}$ ,  
c) unidades disacáridas  $\Delta UH_{NS,6S}$ ,  
d) unidades disacáridas  $\Delta UH_{NS}$  y/o  
e)  $\Delta UH_{NH_2,6S}$ .
- 10 en el que  $\Delta U$  es un ácido urónico, H es una hexosamina, NAc es N-acetilación, 6S es sulfatación de C6, NS es N-sulfatación y NH<sub>2</sub> es una amina.
18. Un método según la reivindicación 16, en el que el glicosaminoglicano:
- a) no contiene un uronidato 2-0 sulfatado,  
b) es 6-0 sulfatado y/o
- 15 c) contiene una glicosamina N-no sustituida.
19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11, 13 ó 16, en el que el uso de la glicuronidasa es concurrente con o sigue un tratamiento con heparinasa.
20. Un método según la reivindicación 13 o la reivindicación 16, en el que el glicosaminoglicano es heparina, heparina de bajo peso molecular (LMWH) o heparán sulfato.
- 20 21. Una preparación farmacéutica según la reivindicación 9 o un glicosaminoglicano preparado por el método según la reivindicación 10, para uso en:
- a) inhibición de la angiogénesis,  
b) tratamiento del cáncer,  
c) inhibición de la proliferación celular y/o
- 25 d) tratamiento de un trastorno de la coagulación.
22. Una glicuronidasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, una composición según la reivindicación 3, un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4-6 o un vector según la reivindicación 7, para uso en tratamiento.



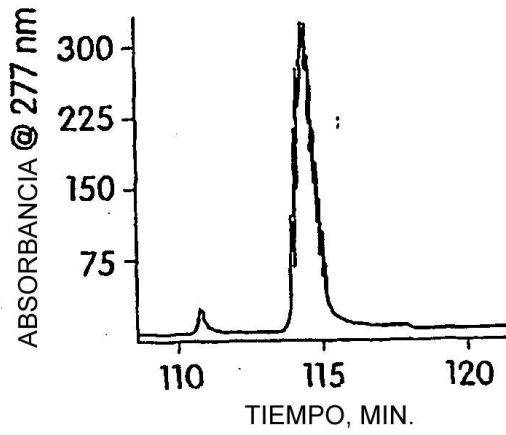


Fig. 1A

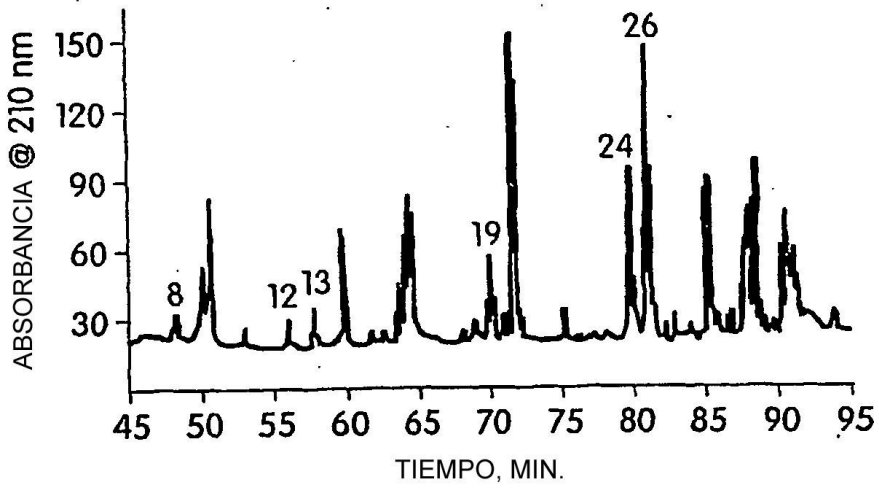


Fig. 1B

<u>PICO N°</u>	<u>SECUENCIA PEPTÍDICA</u>
8	EFNKPEWFDAAK
12	PGENQFFILK
13	FTLALDTIQYVK
19	VLQRETHQGLTNESAWARGQAWGLYGYTMSYK
24	HSVGALLYNSEIDTPLNYADYYYLEALK
26	TAVIQLTRAAQTYTPGMNPRSVNPDGTVRLAPPR

Fig. 1C

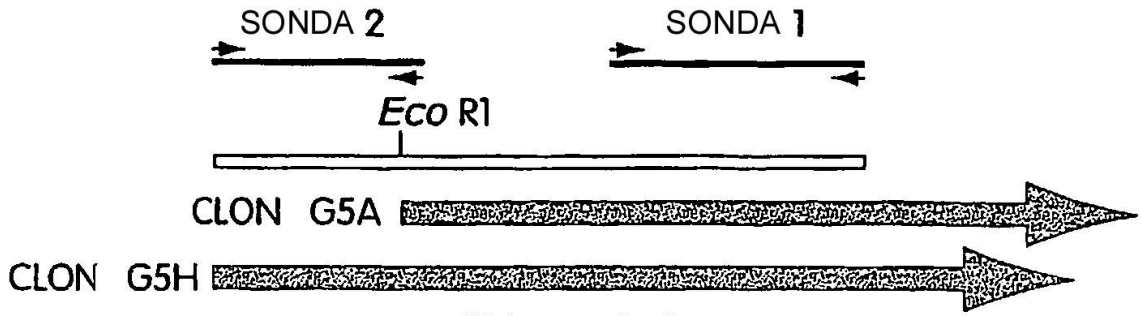


Fig. 2A

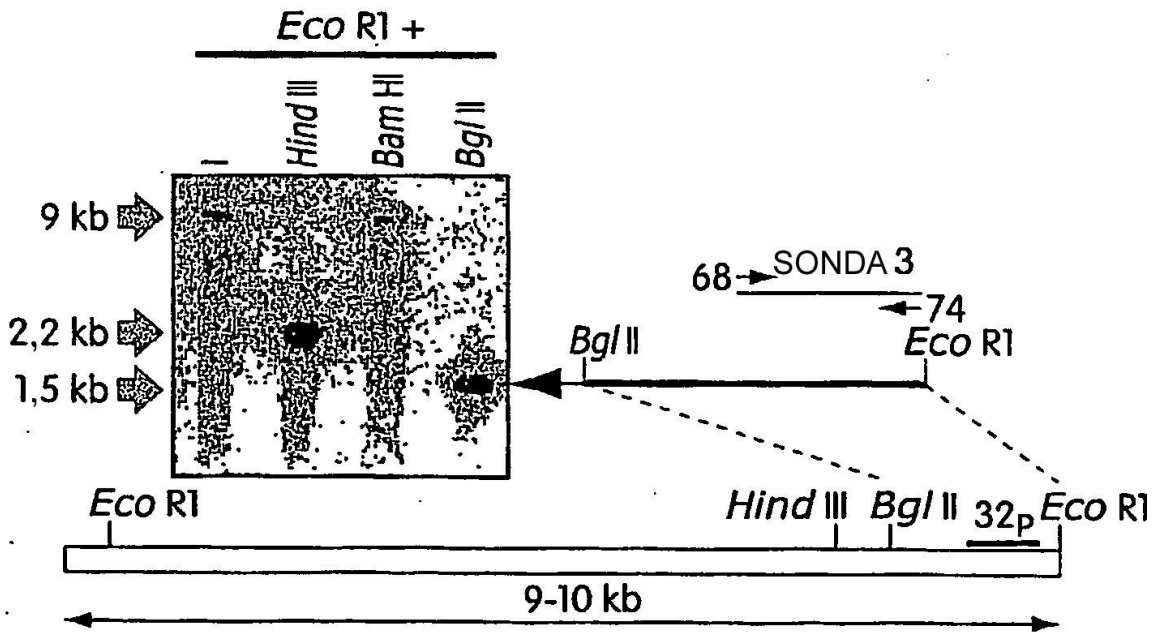


Fig. 2B

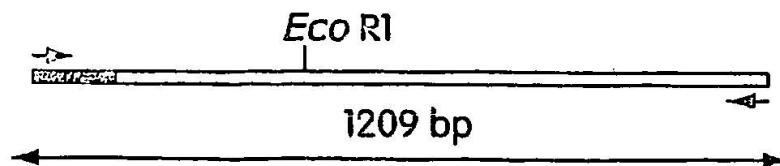


Fig. 2C

aagcggttttcctcgggcatcagacacaactcctttttagttagtattttgggcatagagcgttaaggttaccg  
 caccaataattaatagcagtaaaaatctattcataacatttttttagttttacataatttggtttattgacaaa  
 acgaatgtatagcactccaaccagaatgaatttaggtattgatcaaatgctatcacttttgattaatcactcat  
 ttttcacaaaaatagatgctgtaatccaaaaaaatcaggcattccaatctctaataatgaatatatccgatac  
 ttaaagccttacatctttacactcctacctcatcattataaaaaacaaaacttagatcggaaaataatt  
 atgaaatcactactcagtcgctttgttgcgactattgcattaataggatctgcaaacgggatgacagttacgaaa  
 1 M K S L L S A F V A T I A L I G S A N G M T V T K  
 ggcaacggcgatgactgggttaagaaatcaactaaaaccgcagtaatacagttaacacgggctgcacaaacctat  
 26 G N G D D W L K K S T K T A V L O E T R A A O T Y  
 acaccaggcatgaacccaaggctctgtcaatcgggacgggacggtaaggctggccctccccgcgactggaccaca  
 51 T P C M N P R S V N P D G T V R L A P P P R D W T T  
 ggtttttcccggaacggttggtatggttatgaactatcgggcgataaaaacctggcgccgaagccaaaaga  
 76 G F F P G T L W Y G Y E L S G D K N L A A E A K R  
 tttacccttgcttagatagatacaatatgtaaagatcgcacgacctgggctttatggtgattgttcttat  
 101 F T L A L D T L O Y V K D T H D L G F M L Y C S Y  
 ggcaatgcctaccgtgaaccggagacaagatttacctgaagccatagaaaaaggctggcccaatttatatgcc  
 126 G N A Y R V T G D K I Y L K P L E N G A A N L Y A  
 cgtttcaataaaaaagtagggccatccgctcatgggatttcggacactggcaatttcggtaattatagacaac  
 151 R F N K K V G A I R S W D F G H W Q F P V I I D N  
 ctgatgaacctggagttttataactgggcaggaaaggaattcaataagccagaatggttcgatgctgctaaaaa  
 176 L M N L E Y L Y W A G K E F N K P E W F D A A K T  
 catgcggttacgaccatgaaaaaccatttcagaaaagattatagttcttaccatggtatcagttacgatacctg  
 201 H A V T T M K N H F R K D Y S S Y H V I S Y D T L  
 tctggaagactgcaacgtgaaacccatcagggacttaccacgaatcggcctgggcacgggggcaagcctgg  
 226 S G K V L O R E R H O G L T N E S A N A R C O A W  
 ggactttacggctataccatgagctataaggatagcaagacaaaaaattcatcgaacatgcagagcatatcgct  
 251 G L Y G Y T M S Y K D T K D K K F I E H A E H I A  
 gctttcatcatgaaccacctgcaatgcccggcagataaaaattccactttgggactttgatgtccacaaccgcgac  
 276 A F I M N H P A M P A D K I P L W D F D V H N R D  
 aggtcgccaagggatgcttctgctgctgcagtaattgcttcagccctgctagacctgagcacgcaggtaaaagat  
 301 R S P R D A S A A A V I A S A L L D L S T Q V K D  
 ggtcagaaatattttaaatttgccgaggatcctgaaaacattgtcatcagatgaatacctggcgaacccggc  
 326 G Q K Y F K F A E D I L K T L S S D E Y L A K P G  
 gagaaccagtttttatattgaaacatagtgtaggtgcatgctgtacaattcggaaatcgatacacctttgaa  
 351 E N O F P I L K H S V G A L L Y N S E L D T P F L N  
 tatgccgactattactatctggaggctttaaaccgctatgcagagattaaaaaattgacctgaaaacaattaat  
 376 Y A D N V M R L E A L K R Y A E I K K I D L K T I N  
 cagctc taatttaaaccaacagcattataccaaaacagcaaggctaccagggttggtagcctttgctgtttg  
 401 Q S STOP  
 atagttttaaagaatttaaatcagttatgaaacattttggcagggtatttttttaatttggtgacaagaatt  
 aagaataaaat

Fig. 3

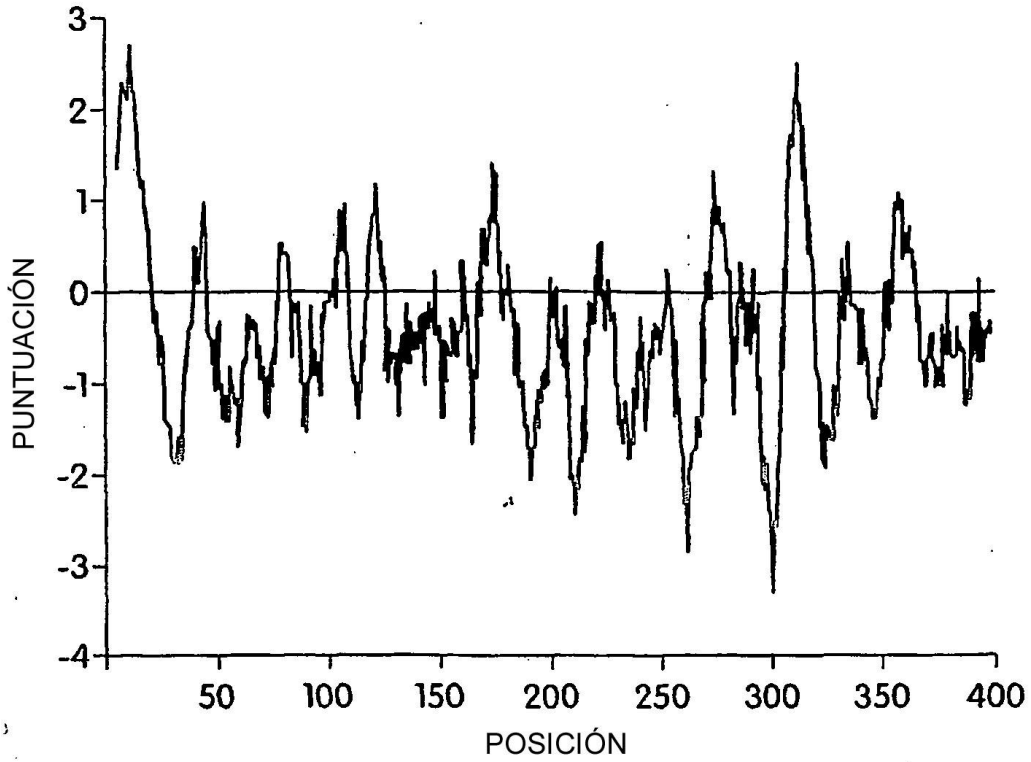


Fig. 4A

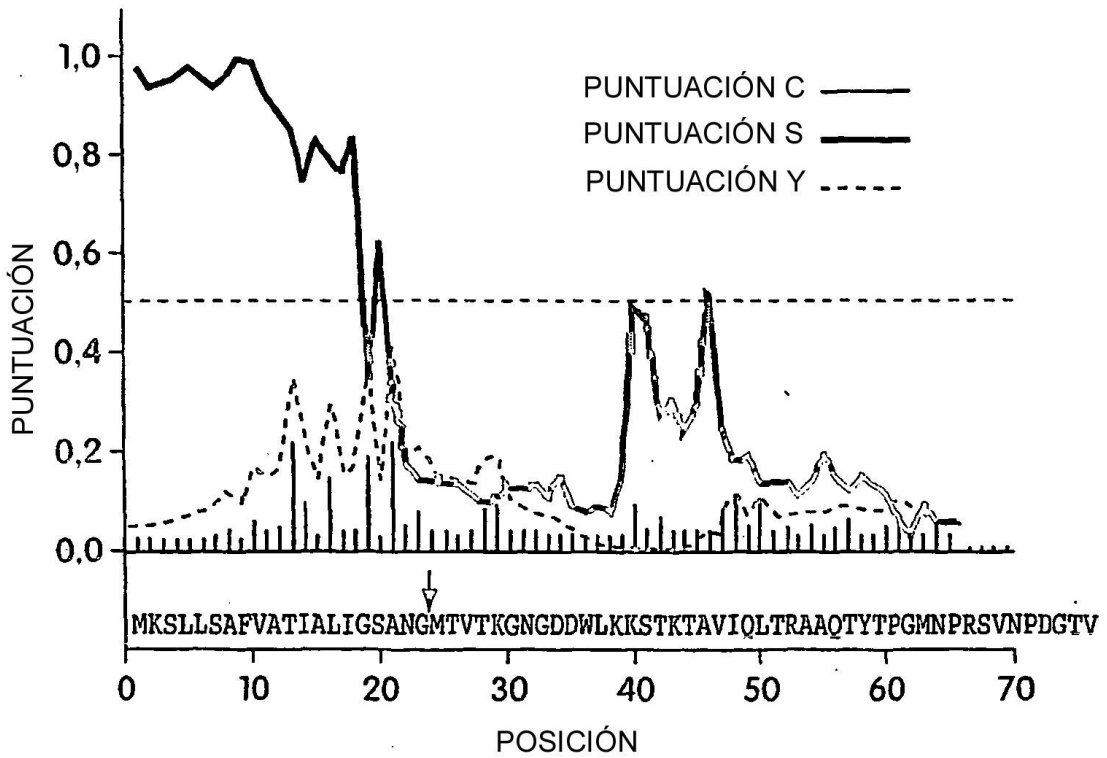


Fig. 4B

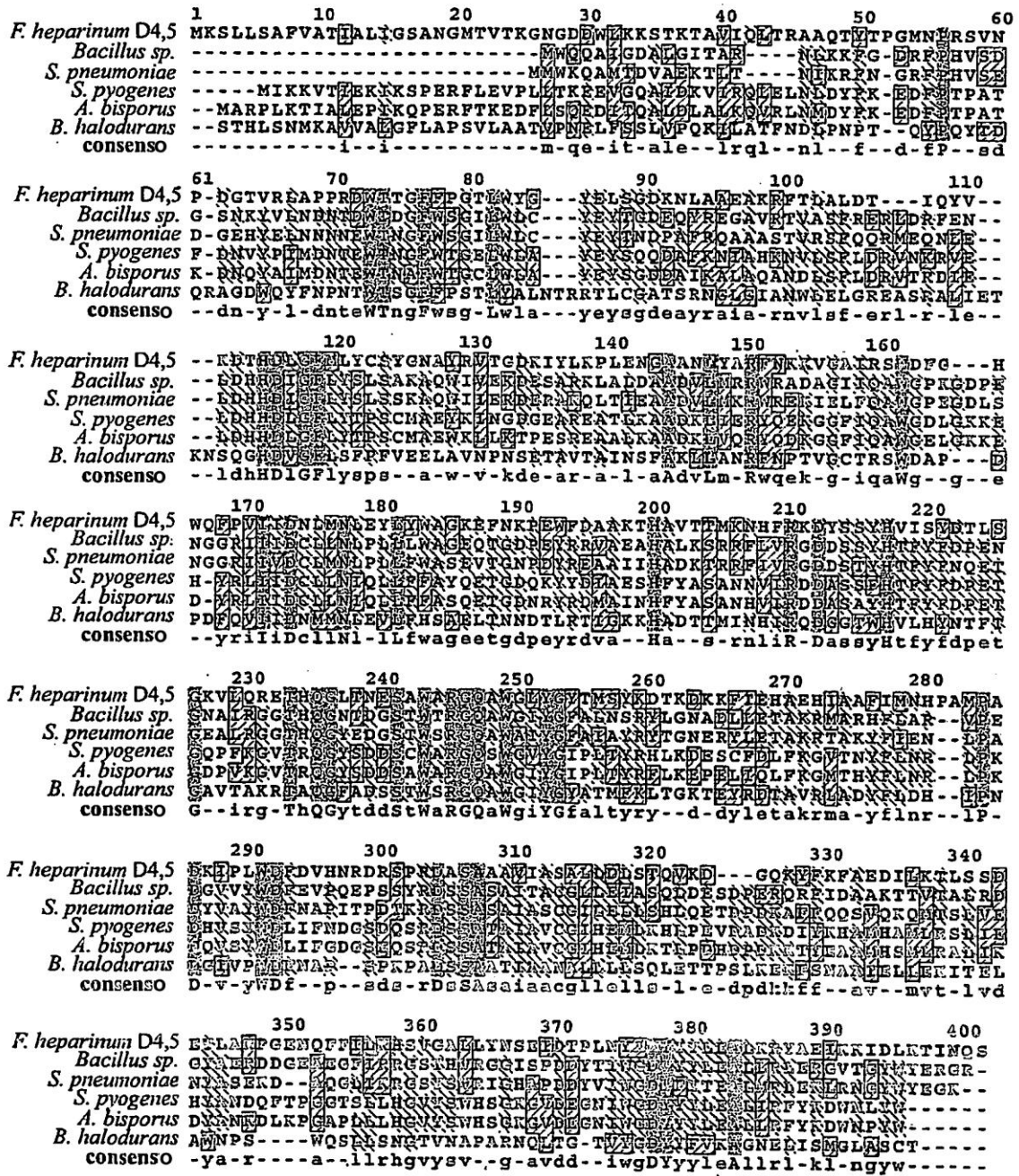


Fig. 4C

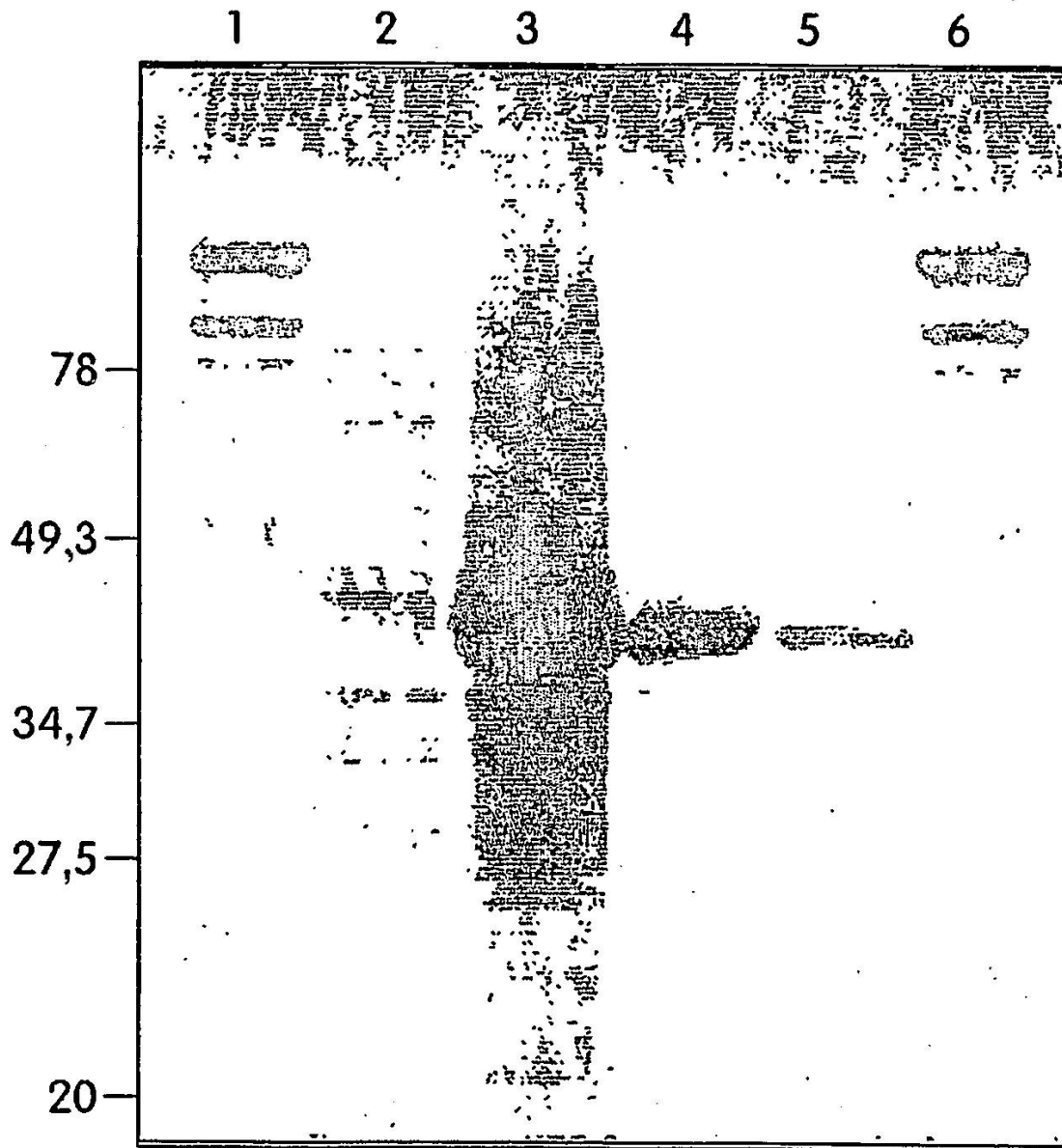


Fig. 5

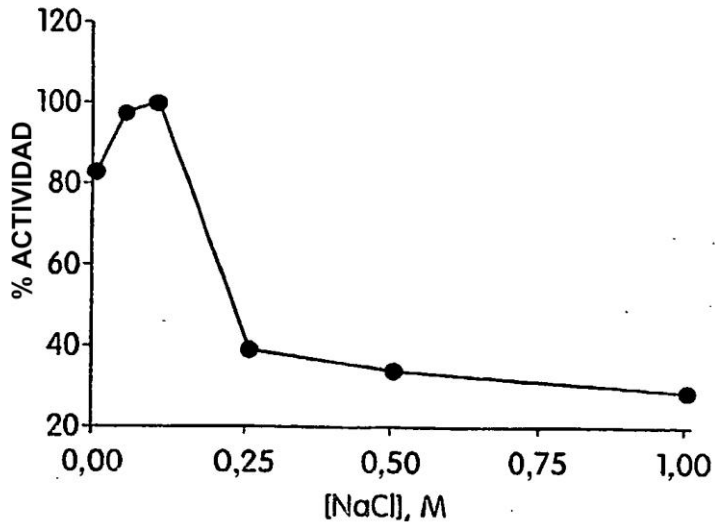


Fig. 6A

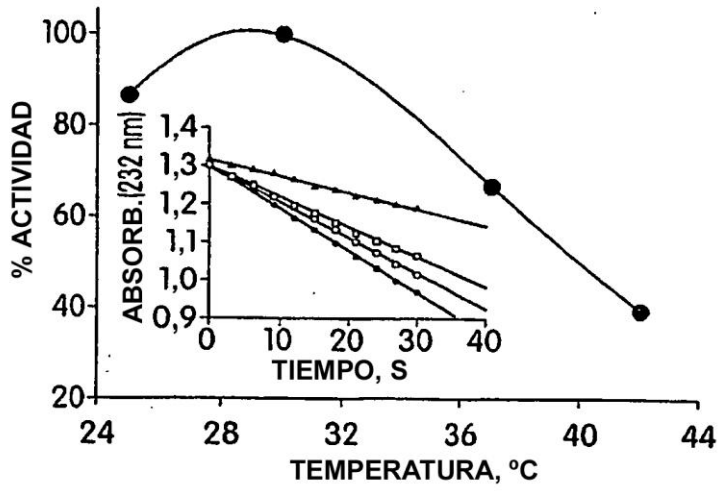


Fig. 6B

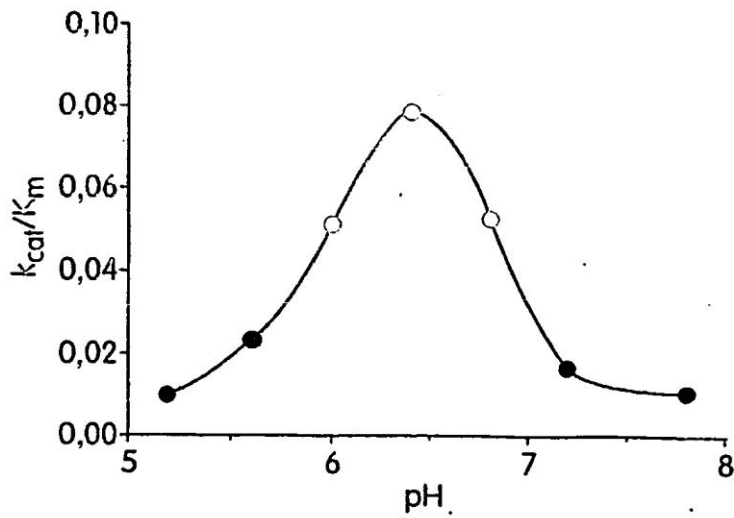


Fig. 6C

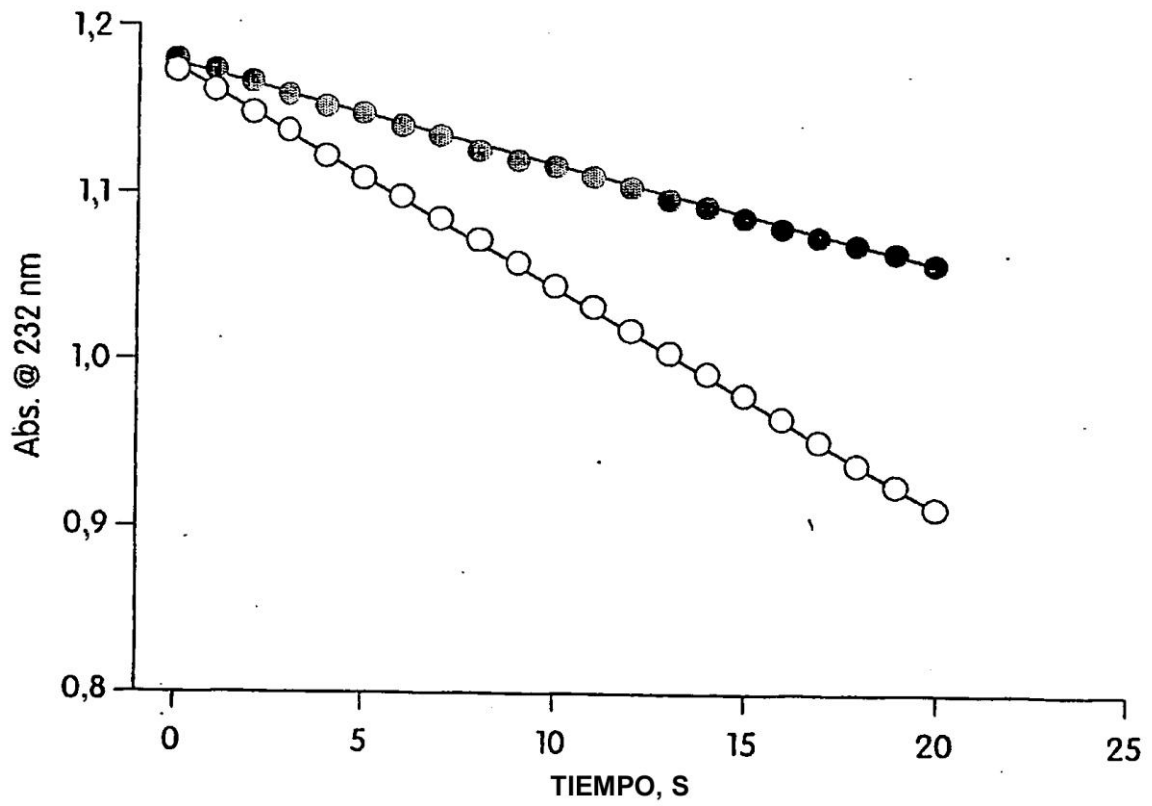


Fig. 7



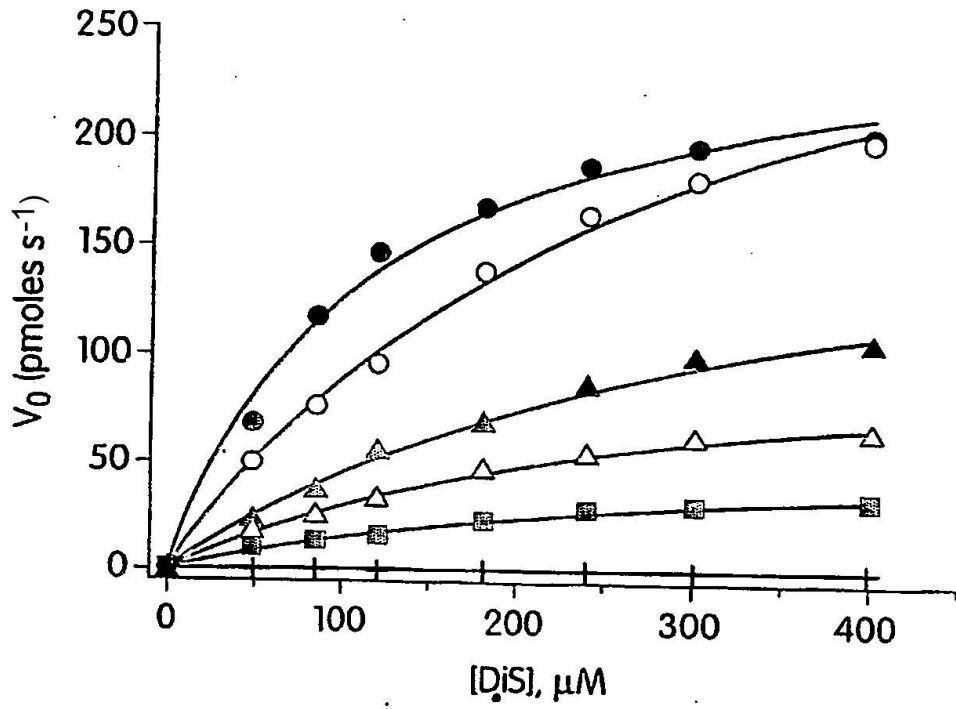


Fig. 8A

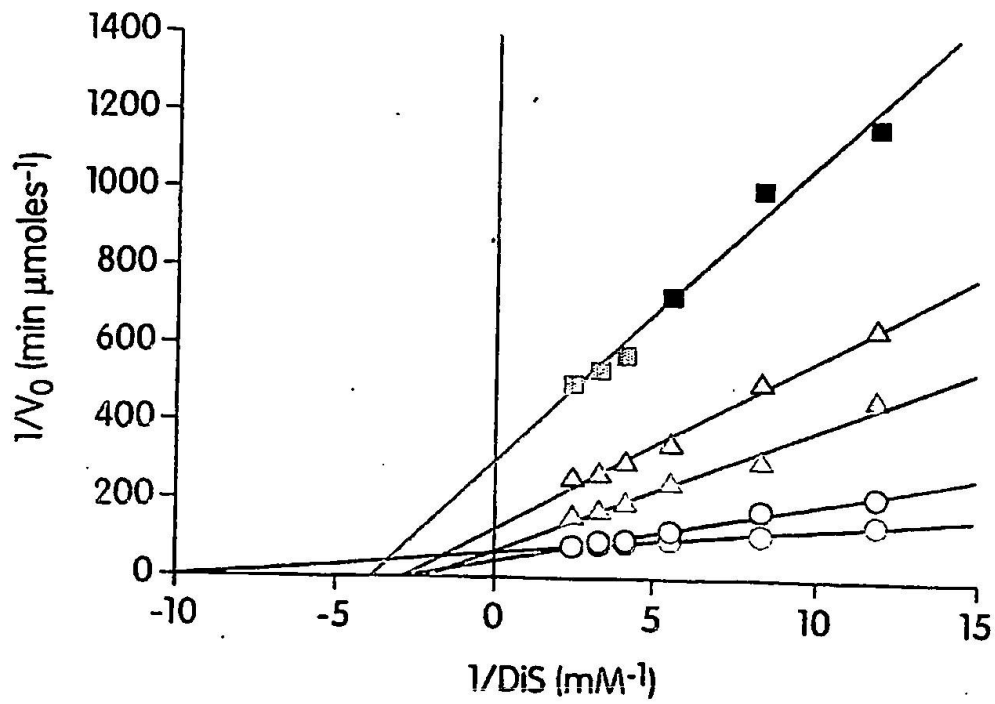


Fig. 8B

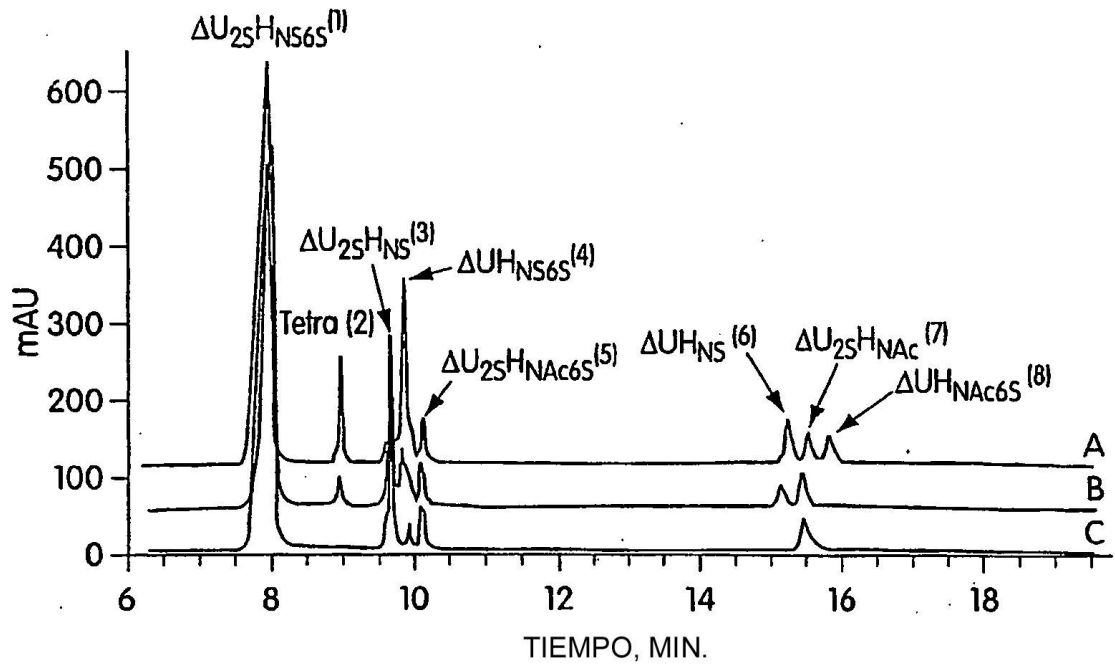


Fig. 9