

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 181**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2010 PCT/FR2010/051530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11010062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2010 E 10752057 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2456866**

54 Título: **Porfiranasas y su uso para hidrolizar polisacáridos**

30 Prioridad:

21.07.2009 FR 0955070

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (100.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**HEHEMANN, JAN-HENDRIK;
CORREC, GAËLLE;
MICHEL, GURVAN;
BARBEYRON, TRISTAN;
HELBERT, WILLIAM y
CZJZEK, MIRJAM**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 617 181 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

PORFIRANASAS Y SU USO PARA HIDROLIZAR POLISACÁRIDOS

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al aislamiento y la caracterización de dos proteínas con una nueva actividad enzimática, a saber, una actividad porfiranasasa. Dichas proteínas son útiles para hidrolizar polisacáridos que contengan agarocoloides sulfatados y para producir oligoporfiranos, en concreto, oligoporfiranos con estructura y tamaño definidos.

[0002] Los polisacáridos como los agares (agarosa, porfirano, etc.) y las carrageninas se usan ampliamente como agentes gelificantes o espesantes en varias ramas de actividad, en particular en la industria agroalimentaria y cosmética. Por ello, anualmente se extraen alrededor de 6000 toneladas de agar y 22000 toneladas de carrageninas de algas rojas marinas con fines agroalimentarios. Los agares se producen industrialmente a partir de algas rojas de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*. Además, el alga roja *Porphyra* (conocida con el nombre común de nori) es el alga más consumida del mundo. La producción anual se calcula en 90 000 toneladas/año (peso seco), que representa un mercado de 1,5 mil millones de dólares americanos aproximadamente.

[0003] Los polisacáridos y sus derivados presentan igualmente un interés en el ámbito terapéutico. Así, la enoxaparina (Lovenox®), comercializada para el tratamiento de trastornos tromboembólicos, es una mezcla de cadenas de polisacáridos sulfatados de longitudes variables y formados por unidades disacáridas recurrentes. Además, algunos polisacáridos y oligosacáridos sulfatados, como los oligofucanos sulfatados producidos a partir de polisacáridos de algas, son útiles como agentes antimicrobianos y/o antivirales para el hombre (Ghosh *et al.* 2009 Glycobiology. 19: 2-15).

[0004] Los agarocoloides son polisacáridos complejos. Algunas especies de algas contienen un agarocoloide determinado como compuesto mayoritario, como el alga *Porphyra*, que contiene como constituyente principal el agarocoloide denominado porfirano. Por abuso del lenguaje, los polisacáridos extraídos de algas rojas a veces también se denominan porfirano, cuando en realidad se trata de una mezcla de agarosa y de porfirano, donde el porfirano es el compuesto mayoritario.

[0005] La unidad disacáridica de base que forma el porfirano está constituida por una unidad D-galactosa (unidad G, ver Figura 1) unida en β -1,4 a una unidad L-galactosa modificada por una O-sulfatación sobre la posición 06 (unidad L6S, ver Figura 1). Las unidades disacáridas se conectan entonces entre ellas mediante enlaces α -1,3. Este polisacárido sulfatado está considerado comúnmente como el precursor de la agarosa. En un medio natural, otras modificaciones químicas, como la metilación, dan lugar a más variaciones todavía de esta estructura de base. Dichas modificaciones químicas tienen como consecuencia la modulación del carácter gelificante del polímero.

[0006] Hasta el momento se conocen y se utilizan principalmente enzimas capaces de degradar los agares: las agarasas y las β -agarasas. Las β -agarasas actúan sobre el enlace β -1,4 (Jam *et al.* Biochem J. 2005 385: 703-13) y las α -agarasas sobre el enlace α -1,3 (Flament *et al.* Appl Environ Microbiol. 2007 73: 4691-94) de la unidad disacáridica agarosa, y dichas enzimas son específicas de las unidades no sustituidas o no modificadas. Así, existen numerosas bacterias, esencialmente marinas, que producen enzimas capaces de hidrolizar los agares (Michel *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 2006 71: 23-33). A partir de estos microorganismos, se han clonado varios genes de β -agarasas y las proteínas correspondientes se han sobreexpresado y purificado.

[0007] Más concretamente, las primeras β -agarasas plenamente caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente han sido producidas por una cepa bacteriana aislada a partir del alga roja *Delesseria sanguinea* (Jam *et al.* Biochem J. 2005 385: 703-13, Allouch *et al.* J Biol Chem. 2003 278: 47171-80). Dicha cepa bacteriana se registró en la colección DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 8 de mayo 1998 con el número DSM 12170. La identificación taxonómica de esta cepa indica que esta define un nuevo género en la clase de las Flavobacterias y su caracterización le ha dado el nombre de *Zobellia galactanivorans* (Barbeyron *et al.* Int J Syst Evol Microbiol. 2001 51: 985-97). La κ -carragenasa de esta bacteria marina también se ha clonado y caracterizado (Barbeyron *et al.* Mol Biol Evol. 1998 15: 528-37).

[0008] En cambio, a día de hoy no se ha descrito ninguna enzima específica de los polisacáridos sulfatados como el porfirano.

[0009] Por abuso del lenguaje, algunas enzimas capaces de degradar los polisacáridos extraídos de algas rojas que contienen porfirano se han denominado incorrectamente porfiranasas en la literatura científica. Sin embargo, dichas enzimas poseen de hecho una actividad agarasa, y degradan los agares presentes en los polisacáridos extraídos de las algas rojas.

5

[0010] Así, Lee *et al.* (2006 Annual Meeting and International Symposium of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology) describen la clonación y secuenciación de una enzima de *Vibrio pelagius*, denominada porfiranasas. Sin embargo, dicha enzima hidroliza los enlaces β -1,4 D-galactosídicos, y conduce a la obtención de oligoagarosas como la neoagarotetraosa, la neoagarohexaosa y la neoagarooctaosa. Por tanto posee una actividad agarasa y no una actividad porfiranasas.

10

[0011] De forma similar, Hatada *et al.* (2006 J. Agric. Food Chem. 54: 9895-9900) mencionan las β -agarasa e indican que estas tendrían una actividad «porfiranasas». Sin embargo, estas enzimas se describen como capaces de hidrolizar los enlaces β -1,4 D-galactosídicos y de llevar a la obtención de oligómeros de agarosa. Dichas enzimas son, por tanto, agarasas y no porfiranasas.

15

[0012] Así mismo, Aoki *et al.* (2002 Marine and Highland Bioscience Center Report, 14: 33-41) describen la clonación de un gen codificante para una supuesta porfiranasas de *Pseudomonas sp.* ND 137. Sin embargo, no se ha demostrado nunca el hecho de que la proteína correspondiente degrade el porfirano, y su alta identidad de secuencia (40 %) con la agarasa de *Pseudomonas sp.* CY24 demuestra lo contrario. De hecho, la secuencia de la proteína clonada por Aoki *et al.* está anotada como agarasa y no como porfiranasas en la entrada n° BAB79291.1 de la base de datos de NCBI.

20

[0013] Ciertos productos de degradación del porfirano (oligoporfiranos) se han podido obtener por hidrólisis química (Zhao *et al.* 2006 Int J Biol Macromol. 38: 45-50). Sin embargo, este procedimiento conduce a la obtención de una mezcla muy heterogénea de oligoporfiranos. Además, la hidrólisis es incompleta y el peso molecular medio de la mezcla obtenida se mantiene elevado.

25

[0014] Por tanto hay una necesidad de enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de polisacáridos sulfatados como el porfirano, para obtener nuevos agentes utilizables en la industria agroalimentaria, cosmética y/o farmacéutica.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0015] Los inventores han aislado y caracterizado las dos primeras porfiranasas descritas a día de hoy. Aunque pertenecen a la familia de las GH16 de las glucosidasas, poseen menos de un 26 % de identidad de secuencia con los otros miembros de esta familia presentes en *Z. galactanivorans*.

35

[0016] Dichas porfiranasas, denominadas PorA y PorB se han clonado a partir de *Z. galactanivorans*. PorA y PorB están representadas por las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5 respectivamente. El dominio catalítico de PorA es un 26,9 % idéntico al de PorB.

40

[0017] Se ha demostrado que las proteínas PorA y PorB poseen una actividad β -porfiranasas, y que están desprovistas de actividad agarasa. Hasta el momento no se había descrito nunca una enzima con dicha actividad enzimática.

45

[0018] Se ha demostrado asimismo que las proteínas PorA y PorB pueden utilizarse para hidrolizar el porfirano y permiten la obtención de oligosacáridos de estructura y de tamaño definidos. Más concretamente, PorA y PorB permiten obtener mezclas homogéneas de neoporfirobiosa, neoporfirotetraosa y/o neoporfirohexaosa.

50

Polipéptidos según la invención

[0019] Los inventores han aislado y caracterizado las primeras porfiranasas descritas a día de hoy. Por ello, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado caracterizado porque posee una actividad porfiranasas.

55

[0020] En el marco de la presente invención, se entiende por «polipéptido» una molécula que comprende una cadena lineal de aminoácidos unidos los unos a los otros por enlaces peptídicos.

[0021] Por polipéptido (o ácido nucleico) «aislado» se entiende aquí un polipéptido (o ácido nucleico) aislado del organismo o del microorganismos en el que dicho polipéptido (o ácido nucleico) está naturalmente presente. Según un modo de realización preferido, el polipéptido o el ácido nucleico está en forma aislada y purificada. Según un modo de realización particularmente preferido, el polipéptido aislado es un polipéptido recombinante.

5

[0022] Por «porfirano» se entiende aquí la molécula constituida por un encadenamiento de unidades disacáridicas constituido por una unidad D-galactosa unida en β -1,4 con una unidad L-galactosa modificada por una O-sulfatación en la posición 06.

10 **[0023]** Por «actividad porfiranasa» se entiende aquí la capacidad de catalizar la hidrólisis del porfirano. Más concretamente, la actividad porfiranasa de los polipéptidos según la invención consiste en una actividad β -porfiranasa, es decir, la capacidad para catalizar la escisión de los enlaces β -1,4, entre la unidad D-galactosa («unidad G» en la Figura 1) y la unidad L-galactosa sulfatada en posición 6 («unidad L6S» en la Figura 1) de la unidad disacáridica del porfirano.

15

[0024] La actividad porfiranasa puede por ejemplo medirse realizando una cinética de la digestión del porfirano. Dicha cinética puede realizarse por ejemplo según se describe en el ejemplo 3. Más particularmente, se puede utilizar una solución que contenga un 1 % (w/v) de polisacárido previamente digerido por una β -agarasa. Por ejemplo se pueden incubar 50 ml de la solución polisacáridica a 30 °C con 6 μ g de enzima. Se pueden tomar partes alícuotas durante toda la hidrólisis hasta que se alcance la hidrólisis completa. La digestión del porfirano por una porfiranasa conduce a la obtención de oligoporfiranos.

20

[0025] Los polipéptidos según la invención están preferentemente desprovistos de actividad agarasa. En otras palabras, dichos polipéptidos catalizan específicamente la hidrólisis de polisacáridos sulfatados. La ausencia de actividad agarasa puede medirse fácilmente, por ejemplo, sobre un gel que comprende un 1 % de agarosa (ver Figura 2). Se puede colocar 1 μ g de enzima sobre dicho gel, por ejemplo. Tras una noche de incubación a 30 °C, la actividad agarasa puede observarse mediante coloración con lugol.

25

[0026] Según un modo de realización preferido, el polipéptido según la invención comprende o consiste en una secuencia elegida entre:

30

- los residuos 19 a 274 de la secuencia SEQ ID NO: 2 (que corresponden a un fragmento de PorA que comprende el dominio catalítico, fragmento denominado PorA-CM);
- los residuos 19 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2 (que corresponden a la proteína PorA madura);
- 35 - los residuos 1 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2 (que corresponden a la proteína PorA completa);
- los residuos 22 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5 (que corresponden a la proteína PorB madura); o
- los residuos 1 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5 (que corresponden a la proteína PorB completa).

35

[0027] Los polipéptidos incluyen igualmente polipéptidos derivados de las proteínas PorA y PorB de secuencia SEQ ID NO: 2 o 5, se entiende que dichos polipéptidos derivados conservan la actividad porfiranasa. Dichos polipéptidos derivados comprenden o consisten en una secuencia elegida entre:

40

a) una secuencia al menos un 26, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a los residuos:

45

- 19 a 274 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 19 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 1 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 22 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5; o
- 1 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5.

50

b) un fragmento con al menos 20, 50, 100, 150, 200, 210, 220, 230, 240 o 250 aminoácidos consecutivos de la secuencia (a); y

c) un fragmento de al menos 20, 50, 100, 150, 200, 210, 220, 230, 240 o 250 aminoácidos consecutivos de una secuencia que consiste en los residuos:

55

- 19 a 274 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 19 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 1 a 510 de la secuencia SEQ ID NO: 2;
- 22 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5; o
- 1 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5.

[0028] Por «secuencia al menos un 95 % (por ejemplo) idéntica a una secuencia de referencia» se entiende una secuencia idéntica a la secuencia de referencia salvo porque esta secuencia puede comportar hasta cinco mutaciones puntuales (sustituciones, eliminaciones y/o inserciones) por cada parte de cien aminoácidos de la secuencia de referencia. Así, para una secuencia de referencia con 100 aminoácidos, un fragmento de 95 aminoácidos y una secuencia de 100 aminoácidos que comporten 5 sustituciones respecto de la secuencia de referencia son dos ejemplos de secuencias un 95 % idénticas a la secuencia de referencia.

[0029] El porcentaje de identidad se determina generalmente utilizando un programa de análisis de secuencias. Por ejemplo, se puede usar el programa «needle», que recurre al algoritmo de alineamiento global «Needleman-Wunsch» para encontrar el alineamiento óptimo (con huecos) de dos secuencias en la totalidad de su longitud. Este programa está disponible en concreto en el sitio web ebi.ac.uk.

[0030] Los polipéptidos derivados pueden ser diferentes de la secuencia de referencia (en este caso la secuencia SEQ ID NO: 2 o 4 o uno de sus fragmentos) por la presencia de mutaciones de tipo eliminación, inserción y/o sustitución de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras.

[0031] Según un modo de realización particular, los polipéptidos derivados difieren de la secuencia de referencia únicamente por la presencia de sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son sustituciones de aminoácidos de misma clase, como sustituciones de aminoácidos en las cadenas laterales no cargadas (como la asparagina, la glutamina, la serina, la cisteína, y la tirosina), de aminoácidos en las cadenas laterales básicas (como la lisina, la arginina, y la histidina), de aminoácidos en las cadenas laterales ácidas (como el ácido aspártico y el ácido glutámico), de aminoácidos en las cadenas laterales apolares (como la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina y el triptófano).

[0032] Los polipéptidos derivados pueden corresponder igualmente a variantes alélicas de las proteínas PorA o PorB de secuencia SEQ ID NO: 2 o 4, a proteínas homólogas a PorA y PorB en otras especies diferentes a *Zobellia galactanivorans*, o a fragmentos de dichas variantes alélicas o proteínas homólogas que conserven la actividad porfiranasas.

[0033] De forma opcional, los polipéptidos comprenden un péptido señal. Si un péptido señal está presente, puede ser el péptido señal nativo de la proteína (es decir los residuos 1 a 18 de SEQ ID NO: 2 para PorA, y los residuos 1 a 21 de SEQ ID NO: 5 para PorB). Alternativamente, el péptido señal puede ser un péptido señal heterólogo a PorA o PorB, por ejemplo un péptido señal conveniente para la expresión de la proteína PorA o PorB madura en una célula anfitriona dada. Las secuencias SEQ ID NO: 2, 3, 5 y 6 son ejemplos de polipéptidos según la invención que comprenden ya sea un péptido señal nativo (SEQ ID NO: 2 y 5), ya sea un péptido señal heterólogo (SEQ ID NO: 3 y 6).

[0034] Los polipéptidos según la invención pueden prepararse por purificación a partir de su organismo o microorganismo de origen, por síntesis química o por ingeniería genética, utilizando las técnicas que conoce bien el experto en la materia. Según un modo de realización preferido, los polipéptidos según la invención se obtienen por ingeniería genética.

Ácidos nucleicos según la invención

[0035] La presente invención se refiere igualmente a un ácido nucleico aislado codificante para un polipéptido según la invención. Dicho polipéptido puede corresponder a cualquier porfiranasas descrita en el apartado anterior.

[0036] El término «ácido nucleico» se refiere tanto a moléculas de ADN como a moléculas de ARN, e incluye especialmente moléculas de ADNc y moléculas de ARNm. El ácido nucleico puede tener forma bicatenaria (por ejemplo en el caso de un ácido nucleico comprendido en un vector de expresión) o forma monocatenaria (por ejemplo en el caso de sondas o de cebadores).

[0037] Más concretamente, el ácido nucleico puede comprender o consistir en una secuencia elegida entre:

- a) los nucleótidos 1 a 1533 o 55 a 1533 de la secuencia SEQ ID NO: 1;
- b) los nucleótidos 1 a 882 o 64 a 882 de la secuencia SEQ ID NO: 4; y
- c) una secuencia complementaria a la secuencia (a) o (b).

[0038] El ácido nucleico puede asimismo comprender o consistir en secuencias derivadas de las secuencias SEQ ID NO: 1 o 4. Los ácidos nucleicos derivados incluyen los ácidos nucleicos cuyas secuencias comprenden o consisten en una secuencia elegida entre:

- 5 a) una secuencia al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a los nucleótidos:
- 1 a 1533 o 55 a 1533 de la secuencia SEQ ID NO: 1; o
 - 1 a 882 o 64 a 882 de la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 10 b) un fragmento de al menos 60, 150, 300, 450, 600 o 750 nucleótidos consecutivos de la secuencia (a);
- c) un fragmento de al menos 60, 150, 300, 450, 600 o 750 nucleótidos consecutivos de una secuencia que consiste en los nucleótidos:
- 15 - 1 a 1533 o 55 a 1533 de la secuencia SEQ ID NO: 1; o
- 1 a 882 o 64 a 882 de la secuencia SEQ ID NO: 4.
- d) una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida a la secuencia SEQ ID NO: 1 o 4 en condiciones de fuerte restricción; y
- 20 e) una secuencia complementaria a una de las secuencias (a) a (d).

[0039] El porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleotídicas se determina de la misma manera que el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos.

25 **[0040]** Las «condiciones de fuerte restricción» son condiciones conocidas por el experto en la materia, y por ejemplo pueden corresponder a condiciones de hibridaciones en ADN unido a un filtro en una solución amortiguadora salina de citrato de sodio (SSC) 5X, dodecilsulfato sódico (SDS) 2 %, 100 microgramos/ml de ADN monocatenario, a 55-65°C durante 8 horas, y lavado en SSC 0,2X y SDS 0,2 % a 60-65°C durante 30 minutos.

30 **[0041]** Las secuencias de ácidos nucleicos derivados pueden incluir mutaciones como sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de nucleótidos. Las sustituciones pueden ser silenciosas, o bien conducir a mutaciones en la proteína codificada por el ácido nucleico. Preferentemente, las sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en la secuencia nucleotídica no conducen a un cambio de fase de lectura, ni a la introducción de un codón finalizador.

35 **[0042]** Según un modo de realización preferido, el ácido nucleico derivado es un ácido nucleico codificante para la proteína PorA madura o completa de secuencia SEQ ID NO: 2, para la proteína PorB madura o completa de secuencia SEQ ID NO: 5, o para fragmentos de estas que conserven la actividad porfiranasa, pero cuya secuencia nucleotídica difiera de la secuencia SEQ ID NO: 1 o 4 en razón de la redundancia del código genético y/o en razón de una variación alélica.

40

[0043] Otro modo de realización particular preferido se refiere a los ácidos nucleicos codificantes para las proteínas homólogas de PorA o PorB en otras especies diferentes de *Zobellia galactanivorans*, o fragmentos de estas que conserven la actividad porfiranasa.

45 **[0044]** Otro aspecto trata sobre sondas y cebadores nucleotídicos que comprenden o consisten en un fragmento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. Dichas sondas y cebadores por ejemplo pueden comprender o consistir en 15 a 50 nucleótidos consecutivos, preferentemente 18 a 35 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. Dichas sondas y cebadores no son codificadores de un polipéptido según la invención pero son útiles para la clonación, la secuenciación y/o la detección de los ácidos nucleicos según la invención. Las sondas pueden, en su caso, estar marcadas, por ejemplo gracias a un marcador radioactivo o a un fluoróforo. Además, las sondas y cebadores pueden comprender, además de un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4, una secuencia heteróloga como la secuencia de un punto de restricción o una secuencia de enlace a un marcador.

50

55 **[0045]** Los ácidos nucleicos según la invención pueden prepararse por síntesis química o por ingeniería genética, utilizando las técnicas que conoce bien el experto en la materia y descritas, entre otros, en Sambrook *et al.* («Molecular Cloning: a Laboratory Manual» Ed. Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1989). Los ácidos nucleicos según la invención pueden por ejemplo obtenerse por amplificación de los genes de *Zobellia galactanivorans* con ayuda del método PCR (Polymerase Chain Reaction), como se describe en el ejemplo 1. El fragmento de ácidos nucleicos así

amplificado puede clonarse a continuación en un vector de expresión según las técnicas descritas en Maniatis («Molecular Cloning. A Laboratory Manual» New York, 1982) y/o en el ejemplo 1. En otro caso, la dosis de tratamiento comprende aproximadamente 80 mg.

5 Vectores de expresión y células anfitrionas según la invención

10 [0046] La invención se refiere igualmente a vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico según la invención. Dichos vectores de expresión, que por ejemplo pueden ser plásmidos, comportan, además de la secuencia de ácido nucleico según la invención, los medios necesarios para su expresión. Dichos medios pueden incluir por ejemplo un promotor y un finalizador de transcripción. El vector de expresión puede comportar igualmente otros elementos como un origen de multiplicación, un punto de clonación múltiple, un potenciador, un péptido señal que podrá fusionarse en fase con el polipéptido de la invención durante la clonación, y uno o varios marcadores de selección.

15 [0047] Otro aspecto se refiere a una célula anfitriona transformada por un vector de expresión o un ácido nucleico según la invención.

20 [0048] La célula anfitriona puede ser una célula procariota o una célula eucariota. Las células anfitrionas normalmente utilizadas para la expresión de células recombinantes incluyen en particular células de bacterias como *Escherichia coli*, células de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, células de hongos como *Aspergillus niger*, células de insecto y células de mamíferos (en particular humanas) como las estirpes celulares CHO, HEK 293, PER-C6, etc.

25 [0049] La transformación de las células procariotas y de las células eucariotas es una técnica que conoce bien el experto en la materia. En función de la célula que vaya a transformar, el experto en la materia podrá determinar fácilmente los medios necesarios para la introducción y la expresión del ácido nucleico según la invención en la célula anfitriona elegida. Así, el vector de expresión y el método de introducción del vector de expresión en la célula anfitriona serán seleccionados en función de la célula anfitriona elegida.

30 [0050] La célula anfitriona transformada por un vector de expresión o un ácido nucleico según la invención expresa preferentemente el polipéptido según la invención de forma estable. El experto en la materia puede comprobar fácilmente que la célula anfitriona expresa el polipéptido según la invención de forma estable, por ejemplo utilizando la técnica del Western Blot.

35 [0051] Las células anfitrionas según la invención son útiles en concreto para producir polipéptidos según la invención. La invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de producción de un polipéptido según la invención que comprende la etapa de cultivo de una célula anfitriona según la invención en condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido según la invención. Dicho procedimiento puede comprender además una etapa de purificación de dicho polipéptido según la invención. Las etapas de cultivo y de purificación pueden realizarse por ejemplo según se describe en el ejemplo 2.

Procedimientos de hidrólisis de polisacáridos según la invención

45 [0052] Los inventores han descubierto que las enzimas PorA y PorB pueden utilizarse para hidrolizar el porfirano y permiten la obtención de oligosacáridos de estructura y de tamaño definidos. Más concretamente, la hidrólisis del porfirano mediante PorA y PorB permite obtener oligoporfiranos, concretamente neoporfirobiosa, neoporfirotetraosa y/o neoporfirohexaosa.

50 [0053] Un aspecto de la invención se refiere, por tanto, al uso de un polipéptido según la invención para hidrolizar polisacáridos y/o para producir oligosacáridos.

55 [0054] Los polisacáridos utilizados en el contexto de este procedimiento son polisacáridos susceptibles de contener polisacáridos sulfatados, que pueden ser o no el compuesto mayoritario de dicho polisacárido. Preferentemente, los polisacáridos utilizados en el marco de este procedimiento comprenden o consisten en el porfirano. Alternativamente, los polisacáridos utilizados en el marco de este procedimiento pueden comprender o consistir en un polisacárido diferente del porfirano pero constituido al menos en parte por unidades disacáridicas constituidas por una unidad D-galactosa unida en β -1,4 con una unidad L-galactosa modificada por una O-sulfatación en la posición 06.

[0055] Dichos polisacáridos están presentes en los vegetales marinos. Por ejemplo, pueden obtenerse a partir de vegetales marinos y, en particular, a partir de algas rojas, utilizando protocolos de extracción que conoce el experto en la materia, como la técnica descrita en Morrice *et al.* (Eur J Biochem. 1983 133:673-84). En su caso, pueden ser separados de los otros compuestos eventuales mediante métodos de cromatografía líquida.

5

[0056] Según un modo de realización preferido, el polipéptido según la invención se utiliza para hidrolizar el porfirano y/o para producir oligoporfiranos, en concreto neoporfirobiosa, neoporfirrotetraosa y/o neoporfirohexaosa.

[0057] La invención se refiere igualmente a un procedimiento de hidrólisis de polisacáridos y/o de producción de oligosacáridos que comprende las siguientes etapas:

10

- a) proporcionar un polipéptido según la invención o una célula anfitriona según la invención; y
- b) poner en contacto dicho polipéptido o dicha célula anfitriona con un polisacárido en condiciones que conduzcan a la obtención de polisacáridos hidrolizados, por ejemplo, en condiciones que conduzcan a una hidrólisis completa.

15

[0058] Como aparece claramente tras la lectura de la presente solicitud, según un modo de realización preferido, el procedimiento de hidrólisis de polisacáridos y/o de producción de oligosacáridos consiste en un procedimiento de hidrólisis del porfirano y/o de producción de oligoporfiranos, en concreto de neoporfirobiosa, neoporfirrotetraosa y/o de neoporfirohexaosa. El experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones que conducen a la obtención de polisacáridos hidrolizados. Por ejemplo, se pueden utilizar las condiciones descritas en el ejemplo 3. El polipéptido o la célula anfitriona puede por ejemplo, ser puesto en contacto con el polisacárido a una temperatura de 30 °C. Al ponerse en contacto, se pueden añadir por ejemplo 6 µg de polipéptido a 50 ml de una solución que contenga un 1 % (w/v) de polisacárido. La duración de incubación se ajustará en función del polisacárido hidrolizado que se desee obtener. La incubación por ejemplo puede durar aproximadamente o como mínimo 6, 10 o 14 horas. Así, partiendo de una solución de polisacárido que contenga porfirano, será posible obtener los siguientes oligosacáridos en función de la duración de incubación: neoporfirobiosa, neoporfirrotetraosa y/o neoporfirohexaosa.

20

25

[0059] El procedimiento según la invención puede comprender, en su caso, una etapa (c) de purificación de dichos polisacáridos hidrolizados. El experto en la materia conoce dichas técnicas de purificación de polisacáridos hidrolizados. La purificación puede realizarse por ejemplo mediante cromatografía de exclusión, según se describe en el ejemplo 4. La muestra que contiene oligosacáridos se puede eluir por ejemplo con carbonato de amonio 50 mM a una velocidad de 1,5 ml/min durante 650 minutos.

35

[0060] Según un modo de realización preferido, los polisacáridos hidrolizados obtenidos mediante el procedimiento según la invención tienen un peso molecular medio (M_w) inferior o igual a 5800, 5500, 5000, 4500, 4000, 3500 o 3000 Da, más preferentemente inferior o igual a 5800 Da. Preferentemente, los polisacáridos hidrolizados obtenidos mediante el procedimiento según la invención poseen un peso molecular inferior a 1270, 1170, 850, 750 o 425 Da, por ejemplo aproximadamente 1261,04, 1163,97, 840,69, 743,62 o 420,344 Da.

40

[0061] Según otro modo de realización preferido, los polisacáridos hidrolizados obtenidos por el procedimiento según la invención comprenden al menos el 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de uno o varios oligoporfiranos elegidos entre la neoporfirobiosa, la neoporfirrotetraosa y la neoporfirohexaosa.

45

[0062] Por «neoporfirobiosa» se entiende la unidad disacárida del porfirano (que se representa en la figura 1). Por «neoporfirrotetraosa» se entiende un encadenamiento de dos unidades disacáridas del porfirano. Por «neoporfirohexaosa» se entiende un encadenamiento de tres unidades disacáridas del porfirano.

[0063] Los polisacáridos así hidrolizados y purificados pueden formularse entonces para composiciones agroalimentarias, cosméticas o farmacéuticas.

50

[0064] Por último, los polisacáridos hidrolizados, en particular, los oligoporfiranos, en concreto la neoporfirobiosa, en particular, los oligoporfiranos, en concreto la neoporfirobiosa, la neoporfirrotetraosa y/o la neoporfirohexaosa, susceptibles de ser obtenidos mediante el procedimiento según la invención son descritos así como compuestos agroalimentarios, cosméticos y farmacéuticos que contienen polisacáridos hidrolizados.

55

[0065] A continuación se va a describir la invención detalladamente con ayuda de la exposición experimental que aparece más adelante, que ilustra la invención sin limitar su alcance.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**[0066]**

- 5 **Figura 1:** Presentación esquemática de las unidades disacáridicas de la agarosa y del porfirano.
- Figura 2:** Actividad enzimática de las porfiranasas A y B. A) Actividad enzimática sobre gel de agarosa. 1 µg de las diferentes agarasas y porfiranasas se colocó sobre una placa de gel de agarosa de 1 % y se incubó durante una noche a 30 °C. A continuación se descubrió la actividad mediante coloración por lugol, indicada por la aparición de un halo luminoso sobre fondo negro. A: β-AgarasaA, B: β-agarasaB, C: β-agarasas, D: β-porfiranasasA, E: β-porfiranasasB. B) Análisis cinético de la digestión del porfirano. El porfirano fue previamente digerido por una β-agarasa, por lo que solo contiene unidades disacáridicas del tipo porfirano. Las líneas indican la cinética de digestión de PorA_CM (1), PorB (2), agaA (3) y agaB (4) de *Z. galactanivorans*.
- Figura 3:** Análisis mediante HPLC de los productos de degradación del porfirano obtenidos con la enzima PorA. DP2, DP4 y DP6 designan los di-, tetra- y hexasacáridos, que se analizaron a continuación mediante RMN.
- 10 **Figura 4:** Espectro 1H-RMN de las neoporfiro-bi-, tetra-, y hexaosas, obtenidas mediante la enzima PorA.
- Figuras 5 y 6:** Alineamiento de secuencias entre PorA y PorB. La flecha indica el fragmento C-terminal del PorA_CM.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL LISTADO DE SECUENCIAS20 **[0067]**

SEQ ID NO: 1 representa la secuencia nucleotídica de la porfiranasas A.
 SEQ ID NO: 2 representa la secuencia proteínica de la porfiranasas A.
 SEQ ID NO: 3 representa la secuencia proteínica de la porfiranasas A recombinante producida en el ejemplo 2.
 25 SEQ ID NO: 4 representa la secuencia nucleotídica de la porfiranasas B.
 SEQ ID NO: 5 representa la secuencia nucleotídica de la porfiranasas B.
 SEQ ID NO: 6 representa la secuencia proteínica de la porfiranasas B recombinante producida en el ejemplo 2.
 SEQ ID NO: 7 a 10 representan los cebadores convenientes para clonar los genes codificantes para la porfiranasas A y la porfiranasas B.

30

EJEMPLOSEjemplo 1: Clonación de los genes de porfiranasas A y B

- 35 **[0068]** Los marcos de lectura abierta codificantes para las enzimas PorA y PorB se han construido en base a las secuencias del genoma de *Z. galactanivorans*. Los genes elegidos se amplificaron en paralelo por PCR, partiendo del material ADN genómico de *Z. galactanivorans*, con los cebadores 5' y 3' como se indica en la Tabla 1 que aparece a continuación:

40 **Tabla 1:** Secuencia de los cebadores para la clonación de PorA_CM y Por calculada para obtener una Tm de ~70 °C.

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador 5'		
PorA_CM	7	ggggggggATCCAATTACCATCTCCTACAAACGGG
PorB	8	ggggggggATCCAAGAAGCTCCACATTTTAAGCCTG
Cebador 3'		
PorA_CM	9	CCCCCgAATTCTTAGTCAACCAATTTATACACCCGTACC
PorB	10	CCCCCgAATTCTTAATTCTTTGAATCAACCAATTGCCATG

- [0069]** El gen entero de la β-porfiranasas A (que contiene el dominio catalítico y los dos dominios que se asemejan a módulos de fijación al sustrato) se truncó para producir una proteína recombinante que contuviera únicamente el dominio catalítico (residuos 19-275), que en adelante se denominará PorA_CM. PorB, cuya secuencia indica un solo módulo que pertenece completamente a la familia GH16, se clonó íntegramente para obtener la proteína recombinante activa.

[0070] Los productos de la amplificación PCR se purificaron a continuación con el kit Qiaquick PCR y se eluyeron con 50 µl de H₂O. Los productos PCR purificados a su vez se digirieron durante tres horas a 37 °C con la mezcla de las enzimas de restricción BglII/EcoRI en sus soluciones amortiguadoras respectivas (NEB2 y BioLabs).

5 Tras la digestión los productos se purificaron con el kit Qiaquick PCR y se eluyeron con 25 µl de H₂O. Los productos de PCR se sometieron a fijación con el vector PFO4 (derivado del vector pET15), previamente desfosforilado y digerido con las enzimas de restricción adecuadas. Este procedimiento de fijación se efectuó con la T4 ADN ligasa a 4 °C durante una noche.

10 **[0071]** Para el procedimiento de transformación, se utilizaron células de *E. coli* (cepa DH5α), convertidas en competentes por vía química. Para ello, se colocaron las células sobre una mezcla de hielo, agua y NaCl durante 30 minutos, después se incubaron durante 30 minutos con la mezcla resultante de la fijación. La transformación se realizó aplicando un choque térmico durante 45 seg a 42 °C, después las células se colocaron de nuevo en la mezcla de hielo, agua y NaCl durante 30 minutos.

15

Ejemplo 2: Expresión y purificación de las PorA CAM y PorB:

[0072] PorA_CM y PorB se sobreexpresaron en las células de *E. coli* (cepa BL21, DE3). La sobreexpresión se realizó a 20 °C en 1 L de un medio ZYP-5052 con 100 µg ml⁻¹ de ampicilina (Studier 2005 Protein Expr Purif.

20 41(1):207-34). Las células se recolectaron por centrifugado (4000 g, 20 min, 4°C) tras un cultivo de 3 días y medio (OD final a 600 nm: aproximadamente 16). Seguidamente se suspendió el sedimento en una solución amortiguadora A (20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.5, lisozima, desoxirribonucleasa). Las células así suspendidas se sometieron a un lisado con lisozima durante 30 minutos en hielo, y después se sometieron a ultrasonidos. El lisado se clarificó por centrifugado (50000 g, 30 min, 4°C), y después por filtración utilizando filtros
25 (Millipore) de 0,2 mm. La solución filtrada de esta manera se cargó en una columna de 10 ml de resina IMAC HyperCell (Pall Corporation), que se cargó con una solución NiSO₄. La columna se había equilibrado previamente con el amortiguador A, sin lisozima ni desoxirribonucleasa. Tras una etapa de lavado con el amortiguador A (diez volúmenes de columna), la proteína se eluyó, a 1 ml min⁻¹, en 60 ml realizando un gradiente lineal entre el
30 amortiguador A y un amortiguador A al que se añadió un 60 % de amortiguador B (20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl y 500 mM imidazol). Las proteínas se concentraron por ultrafiltración sobre una membrana Amicon (polietersulfona, tamaño límite 30 kDa), para obtener un volumen final de 5 ml aproximadamente. Seguidamente se realizó una segunda etapa de purificación sobre una columna Sephacryl S-200 (GE Healthcare) preequilibrada con un
35 amortiguador C (20 mM Tris pH 8, 4 % (v/v) glicerol para PorA_CM, y 20 mM Tris para PorB) a una velocidad de 1 ml min⁻¹. Todas las fracciones que contenían la proteína pura (según análisis por SDS-PAGE) se añadieron y concentraron mediante filtrado/centrifugado (Amicon, tamaño límite 10 kDa) a 2,6 mg/ml para PorA_CM y aproximadamente 8 mg/ml para PorB. Todos los procedimientos de cromatografía se realizaron con un sistema
AKTA Explorer (GE-Healthcare) a temperatura ambiente.

Ejemplo 3: Degradación enzimática del porfirano

40

[0073] Una solución con un 1 % (w/v) del polisacárido se utilizó para la hidrólisis enzimática con las porfiranasas A y B. Un total de 50 ml de la solución polisacáridica se incubó con 6 µg de enzima a 30 °C durante una noche. Se extrajeron partes alícuotas durante toda la hidrólisis hasta que se alcanzó la hidrólisis completa (14 horas aproximadamente).

45

[0074] Tras digestión completa por la enzima, la solución se calentó a 96 °C durante 30 minutos para inactivar una posible actividad residual de la enzima. Después se centrifugó la solución durante 20 min a 5000 g y 4 °C y el sobrenadante se filtró con filtros de jeringa Millipore de 0,2 µm. El polisacárido digerido se congeló a -80 °C y después se liofilizó.

50

[0075] Las partes alícuotas se analizaron por el procedimiento de detección de los azúcares reductores mezclando 10 µl de alícuota de proteína con 90 µl de agua (dilución 10x), y después con 1 ml de la solución ferricianida (300 mg de potasio hexacianoferrato III, 29 g Na₂CO₃, 1 mL 5 M NaOH, completado hasta 1 l con agua). La mezcla se calentó a 100 °C durante 15 min, y después enfrió a temperatura ambiente para leer la absorbencia a
55 420 nm.

Ejemplo 4: Purificación de los oligoporfiranos por cromatografía de exclusión preparativa

[0076] La purificación de los oligoporfiranos se ha hecho mediante cromatografía de exclusión preparativa

con tres columnas Superdex 30 (26/60) de GE HealthCare en serie, integradas en un sistema HPLC system inyector/colector líquido (Gilson). Los oligosacáridos se detectaron mediante su índice refractivo (detector Spectra System RI-50) y la integración de los datos (Gilson y detector de refracción) mediante el programa Unipoint (Gilson).

- 5 **[0077]** El producto de digestión polisacáridica, congelado y liofilizado, se diluyó en agua desmineralizada para obtener una solución al 4 % (w/v). Tras filtración sobre una membrana porosa de 0,45 µm, se inyectaron 4 mL de la muestra, después se eluyeron con carbonato de amonio [(NH₄)₂CO₃] 50 mM a una velocidad de 1,5 mL/min durante 650 minutos. Las fracciones de oligosacáridos se recogieron y analizaron directamente mediante HPLC.
- 10 **[0078]** Según este procedimiento, es posible preparar oligosacáridos compuestos únicamente por el motivo de repetición porfirano u oligosacáridos híbridos que contengan motivos porfirano asociados a motivos de tipo agarosa. Así hemos aislado y purificado oligoporfiranos del disacárido al hexasacárido (Figuras 3 y 4), correspondiente al peso molecular de 420,344 Da (neoporfirobiosa, llamada diporfirano en la Figura 4), 840,69 y/o 743,62 Da (neoporfirotetraosa, llamada tetraporfirano en la Figura 4) y 1261,04 y/o 1163,97 Da (neoporfirohexaosa, llamada hexaporfirano en la Figura 4), respectivamente.

Ejemplo 5: Resultados y discusión

20 **[0079]** Se realizó la secuenciación del genoma completo de la bacteria *Zobellia galactanivorans* (registrada en la Colección DSMZ el 8 de mayo 1998 con el número DSM 12170). La secuenciación permitió identificar dieciséis genes que pertenecen a la familia GH16 de las glucosidasas. Entre estos dieciséis genes, los genes codificantes de la κ-carragenasa CgkA y las β-agarasas AgaA y AgaB ya se conocen y están caracterizados (Barbeyron *et al.* Mol Biol Evol. 1998 15: 528-37; Jam *et al.* Biochem J. 2005 385:703-13; Allouch *et al.* J Biol Chem. 2003 278: 47171-80).

25 **[0080]** Otros dos genes que pertenecen a la familia GH16 de las glucosidasas se clonaron como se expone en el ejemplo 1 anterior. Dichos genes, denominados porA y porB son codificantes de las proteínas denominadas PorA y PorB respectivamente. La proteína PorA está compuesta por 510 aminoácidos y tiene una masa molecular teórica de 57311 kDa. Tras la eliminación del péptido señal, dicha proteína tiene una masa molecular calculada de 55193 kDa. La proteína PorB está compuesta por 293 aminoácidos. Tras la eliminación del péptido señal, dicha proteína tiene una masa molecular teórica de 31271 kDa.

[0081] Como se muestra en la tabla 2 que aparece más abajo, estos dos genes presentan menos del 25 % de identidad con las β-agarasas y la κ-carragenasa de *Zobellia galactanivorans*.

35 **Tabla 2: Matriz de identidad de secuencia entre los módulos catalíticos de ciertas glucosidasas de la familia GH16 de *Zobellia galactanivorans*.**

	1	2	3	4	5
1. AgaA		35,6	24,2	25,2	22,8
2. AgaB			18,4	22,0	20,0
3. CgkA				23,3	21,0
4. PorA					26,9
5. PorB					

40 **[0082]** Una vez realizada la clonación, las proteínas PorA y PorB se sobreexpresaron en *Escherichia coli* como se expone en el ejemplo 2.

[0083] La actividad de las proteínas PorA y PorB sobre varios galactanos de algas rojas se estudió a continuación (ejemplo 3). Se constató que dichas enzimas no tienen ninguna actividad sobre los carragenanos o sobre la agarosa (Figura 2A). En cambio, dichas enzimas presentan una fuerte actividad sobre el porfirano (Figura 45 2B).

[0084] La purificación de los oligosacáridos producidos y su caracterización mediante 1H-RMN (ejemplo 4) demuestra que las enzimas PorA y PorB hidrolizan específicamente el porfirano y descomponen los enlaces β-1,4 entre las unidades Dgalactosa y las unidades L-galactosa sulfatada en posición 6. La sulfatación es necesaria para

la actividad de la enzima y es exclusiva respecto de frente a las actividades β -agarasas, como muestra la actividad de PorA y PorB sobre porfirano, predigerido por una β -agarasa (Figura 2B).

[0085] Como se indica en el ejemplo 4, la hidrólisis del porfirano por PorA y PorB permite obtener mezclas homogéneas de neoporfirobiosa, neoporfirotetraosa y/o neoporfirohexaosa.

[0086] Por consiguiente, las proteínas PorA y PorB son las primeras β -porfiranasas descritas a día de hoy.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0087]

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)

<120> Porfiranasas y su uso para hidrolizar polisacáridos

15 <130> BET10P1064

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1533

20 <212> ADN

<213> *Zobellia galactanivorans*

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(54)

25 <400> 1

ES 2 617 181 T3

atgaaaaaag tattactatt ttttaattttt ttagtaagcg caaatctttc tgcgcaatta 60
 ccatctccta caaacgggaa gaaatgggaa aagggtgaac aattatccga tgaatttaac 120
 ggcaactcca ttgacaccaa taagtggat gattaccacc ctttttggga gggccgagcc 180
 cccagcaatt ttaaaaaagg gaatgctttc gtaagtgcg gtttcctaaa ccttcgttct 240
 acattaagaa aagaaccaag tagcgttcaa gatcctttta aggatatttg ggtagatgct 300
 gccgcggcgg tttccaagac caaggcccaa cccggatatt attacgaggc tcgctttaag 360
 gcctcctctt tgtctatgac ttcttcgttt tggttccgcg ttggccaatt ttctgaaatc 420
 gatgttatcg agcatattgg aaatccatcc aaagaaaacc gacaggacga tcttccttat 480
 caatatcatg ttaatacaca ttattacgga aaacatgccg gattgcaacc acttggaaacc 540
 gaatataaaa tgcccggcag gggaagggat aatttttaca cctatggatt ctggtggaag 600
 agtcctaatag aacttctttt ttacttcaat ggcaagcagg ttatgcgtat cgttccaaga 660
 gtgcctttag acgaggaatt aagaatgatt tttgacacag aagtattccc ttttgccacg 720
 gcaggtggtg ccaatatcgg acttcctaag ccggaaaacc tccgtgacaa ttctaaaaac 780
 accatgaaag tagattgggt acgggtgtat aaattggttg acggcaccgc cgcggaagac 840
 agttccgatg ctccgatcgg cagttacatt tccctcaaaa aaacgcaagg cgacggtaaa 900
 tttgtaaccg gtgaaaaaga tggcagccaa ttggttgcaa gaggctcgac cgttcaaagc 960
 tgggaaaaat tcaaagtaga aaaacaccct aaaggcggga ttacccttaa ggccaattcc 1020
 aatggtaaat atgtacaagt tcaaggaagc gacatcaaca aaccggtaag ggccgcgggc 1080
 gattttcagg gcgattggga acaattcgaa tggaaatcca aaggaaacgg acttgtagcc 1140
 ttgaaaaacg tgcttacggg caaatggcta caggctccat ggaccgaaaa caacgcgata 1200
 atccgaccga aagggcccgt agataatggt tgggaaactt ttgcttgga aaaggagaca 1260

 tcacctaccg ccagtacggc gctttccgcc cagttggaga caaagaccgt agatggaata 1320
 agagtgtatc ccagccccgc atcggaaacc ttgactattg agggagtgga gggcgaaaat 1380
 ggtttacgtg tttttgactc gacgggcaat ccagtcctta aaaaagaagg catactaggc 1440
 cgtaaagaac gattaaacgt ttccggtctt atcaaaggca actacctatt gcgcactgga 1500
 tcaggtgaac aaacctggtt tcagaaaaac tga 1533

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> *Zobellia galactanivorans*

5 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(18)

<400> 2

```

Met Lys Lys Val Leu Leu Phe Leu Ile Phe Leu Val Ser Ala Asn Leu
 1          5          10          15

Ser Ala Gln Leu Pro Ser Pro Thr Asn Gly Lys Lys Trp Glu Lys Val
          20          25          30

Glu Gln Leu Ser Asp Glu Phe Asn Gly Asn Ser Ile Asp Thr Asn Lys
          35          40          45

Trp Tyr Asp Tyr His Pro Phe Trp Glu Gly Arg Ala Pro Ser Asn Phe
 50          55          60

Lys Lys Gly Asn Ala Phe Val Ser Asp Gly Phe Leu Asn Leu Arg Ser
 65          70          75          80

Thr Leu Arg Lys Glu Pro Ser Ser Val Gln Asp Pro Phe Lys Asp Ile
          85          90          95

Trp Val Asp Ala Ala Ala Ala Val Ser Lys Thr Lys Ala Gln Pro Gly
          100          105          110

Tyr Tyr Tyr Glu Ala Arg Phe Lys Ala Ser Ser Leu Ser Met Thr Ser
          115          120          125

Ser Phe Trp Phe Arg Val Gly Gln Phe Ser Glu Ile Asp Val Ile Glu
          130          135          140

His Ile Gly Asn Pro Ser Lys Glu Asn Arg Gln Asp Asp Leu Pro Tyr
          145          150          155          160

Gln Tyr His Val Asn Thr His Tyr Tyr Gly Lys His Ala Gly Leu Gln

```


ES 2 617 181 T3

Glu Thr Lys Thr Val Asp Gly Ile Arg Val Tyr Pro Ser Pro Ala Ser
435 440 445

Glu Thr Leu Thr Ile Glu Gly Val Glu Gly Glu Asn Gly Leu Arg Val
450 455 460

Phe Asp Ser Thr Gly Asn Pro Val Leu Lys Lys Glu Gly Ile Leu Gly
465 470 475 480

Arg Lys Glu Arg Leu Asn Val Ser Gly Leu Ile Lys Gly Asn Tyr Leu
485 490 495

Leu Arg Thr Gly Ser Gly Glu Gln Thr Trp Phe Gln Lys Asn
500 505 510

<210> 3

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Porfirinasa A recombinante

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> Introducido por el vector

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (9)..(64)

<223> Porfirinasa

<400> 3

ES 2 617 181 T3

Thr Lys Ala Gln Pro Gly Tyr Tyr Tyr Glu Ala Arg Phe Lys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Ser Met Thr Ser Ser Phe Trp Phe Arg Val Gly Gln Phe Ser
 115 120 125

Glu Ile Asp Val Ile Glu His Ile Gly Asn Pro Ser Lys Glu Asn Arg
 130 135 140

Gln Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Tyr His Val Asn Thr His Tyr Tyr Gly
 145 150 155 160

Lys His Ala Gly Leu Gln Pro Leu Gly Thr Glu Tyr Lys Met Pro Gly
 165 170 175

Arg Gly Arg Asp Asn Phe Tyr Thr Tyr Gly Phe Trp Trp Lys Ser Pro
 180 185 190

Asn Glu Leu Leu Phe Tyr Phe Asn Gly Lys Gln Val Met Arg Ile Val
 195 200 205

Pro Arg Val Pro Leu Asp Glu Glu Leu Arg Met Ile Phe Asp Thr Glu
 210 215 220

Val Phe Pro Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Asn Ile Gly Leu Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Glu Asn Leu Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Met Lys Val Asp Trp
 245 250 255

Val Arg Val Tyr Lys Leu Val Asp
 260

<210> 4

<211> 882

5 <212> ADN

<213> *Zobellia galactanivorans*

<220>

<221> six_peptide

<222> (1)..(63)

ES 2 617 181 T3

<400> 4

```

atgaagcttt ccaaccaatt cctaataaca attacctac taatcacaag tattacattc      60
gctcaagaag ctccacattt taagcctgga gaagacccaa ggcaacctca tcaggaatgg      120
aaattaattg aaaacatgtc cgatgaattt gaagggaaaa agatagatga aaaaaaatgg      180
cagatttcgg gccaaaggatg gataggctgc gctccgggat tgtttcttgc agaaaatatt      240
tccttaaata acggaagttt acaaataact acaactatgc tgccagaacc tatagtcaaa      300
aacaataaaa cctatacgca cggaggtggt tacgttggct caagaaatgg tatgacctat      360
ggctattatg agtgcgaaat gaaagccaac aaaaccttca tgtcctctac attttggtta      420
attaatgaag ggaaagaccg attaggatgc gacaaaagaa caacggaatt ggacattcag      480
gaatctgttg gacaaataac gaatgatgcc gactggatga aatactttga ccaaaccatg      540
aactccaata cccacagtag aaatattccg gagggatgtg aatacgaaaa aggatcgagc      600
aaaggcaaag cggagttagg aggaaaagca tacgaagatt tccatgttta tgggtgtttgg      660
tggaaatcta aggatgaaat tatatTTTTc ttggacggca agatgcaatc taaagtaacg      720
ccccggccg attttgatat tgaaatgtat ttacgaatgg tcgttgagac ctatgattgg      780
aatccggtac ctaaagacgg cggcatgaca ggttcaaaaag aagatagaac tacaacgtac      840
aattgggtaa ggtcatggca attggttgat tcaaagaatt aa                          882

```

5 <210> 5

<211> 293

<212> PRT

<213> *Zobellia galactanivorans*

<220>

10 <221> SEÑAL

<222> (1)..(21)

<400> 5

ES 2 617 181 T3

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

ES 2 617 181 T3

Ala Asn Lys Thr Phe Met Ser Ser Thr Phe Trp Leu Ile Asn Glu Gly
 130 135 140

Lys Asp Arg Leu Gly Cys Asp Lys Arg Thr Thr Glu Leu Asp Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Gly Gln Ile Thr Asn Asp Ala Asp Trp Met Lys Tyr Phe
 165 170 175

Asp Gln Thr Met Asn Ser Asn Thr His Ser Arg Asn Ile Pro Glu Gly
 180 185 190

Cys Glu Tyr Glu Lys Gly Ser Ser Lys Gly Lys Ala Glu Leu Gly Gly
 195 200 205

Lys Ala Tyr Glu Asp Phe His Val Tyr Gly Val Trp Trp Lys Ser Lys
 210 215 220

Asp Glu Ile Ile Phe Phe Leu Asp Gly Lys Met Gln Ser Lys Val Thr
 225 230 235 240

Pro Pro Ala Asp Phe Asp Ile Glu Met Tyr Leu Arg Met Val Val Glu
 245 250 255

Thr Tyr Asp Trp Asn Pro Val Pro Lys Asp Gly Gly Met Thr Gly Ser
 260 265 270

Lys Glu Asp Arg Thr Thr Thr Tyr Asn Trp Val Arg Ser Trp Gln Leu
 275 280 285

Val Asp Ser Lys Asn
 290

<210> 6

<211> 280

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Porfiranasa B recombinante

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> Introducido por el vector

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (9) .. (280)

<223> Porfiranasa

<400> 6

ES 2 617 181 T3

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

ES 2 617 181 T3

Thr Gly Ser Lys Glu Asp Arg Thr Thr Thr Tyr Asn Trp Val Arg Ser
 260 265 270

Trp Gln Leu Val Asp Ser Lys Asn 275 280

5 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> cebador
 <400> 7
 ggggggggat cccaattacc atctcctaca aacggg 36
 <210> 8
 <211> 37

15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8

20 ggggggggat cccaagaagc tccacattt aagcctg 37
 <210>9
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 cccccgaat tcttagtcaa ccaattata caccgtacc 40
 <210> 10

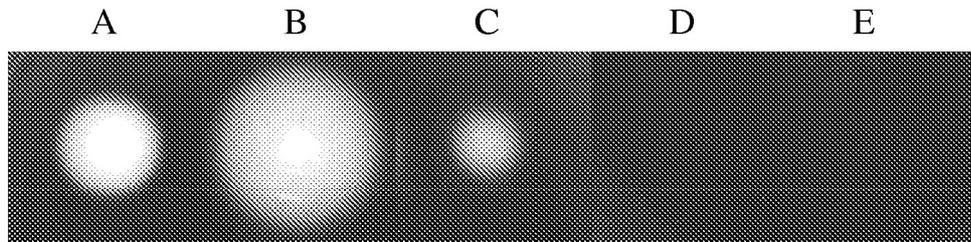
30 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador

35 <400> 10
 cccccgaat tcttaattct ttgaatcaac caattgcat g 41

Reivindicaciones

1. Polipéptido aislado **caracterizado porque** posee una actividad porfiranasa, que comprende una
5 secuencia elegida entre:
- (i) una secuencia al menos un 90 % idéntica a los residuos 19 a 274 de la secuencia SEQ ID NO: 2,
 - (ii) una secuencia al menos un 90 % idéntica a los residuos 22 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5, y
 - (iii) un fragmento con al menos 200 aminoácidos consecutivos de la secuencia (i) o (ii).
- 10
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es un polipéptido recombinante.
3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia elegida
15 entre:
- a) una secuencia al menos un 95 % idéntica a los residuos:
 - 19 a 274 de la secuencia SEQ ID NO: 2; o
 - 22 a 293 de la secuencia SEQ ID NO: 5;
 - b) un fragmento con al menos 250 aminoácidos consecutivos de la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID
NO: 5.
- 20
4. Ácido nucleico aislado codificante para un polipéptido como el que se ha definido en cualquiera de las
25 reivindicaciones 1 a 3.
5. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.
- 30 6. Célula anfitriona transformada por un vector de expresión según la reivindicación 5.
7. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para hidrolizar polisacáridos.
8. Procedimiento de hidrólisis de polisacáridos que comprende las siguientes etapas:
35
- a) proporcionar un polipéptido como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o
una célula anfitriona como la que se ha definido en la reivindicación 6; y
 - b) poner dicho polipéptido o dicha célula anfitriona en contacto con un polisacárido en condiciones que
40 permitan la obtención de polisacáridos hidrolizados.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende además una etapa (c) de purificación de
dichos polisacáridos hidrolizados.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende además una etapa (d) de formulación de
45 dichos polisacáridos hidrolizados y purificados en compuestos agroalimentarios, cosméticos o farmacéuticos.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dichos polisacáridos
contienen porfirano

A)



B)

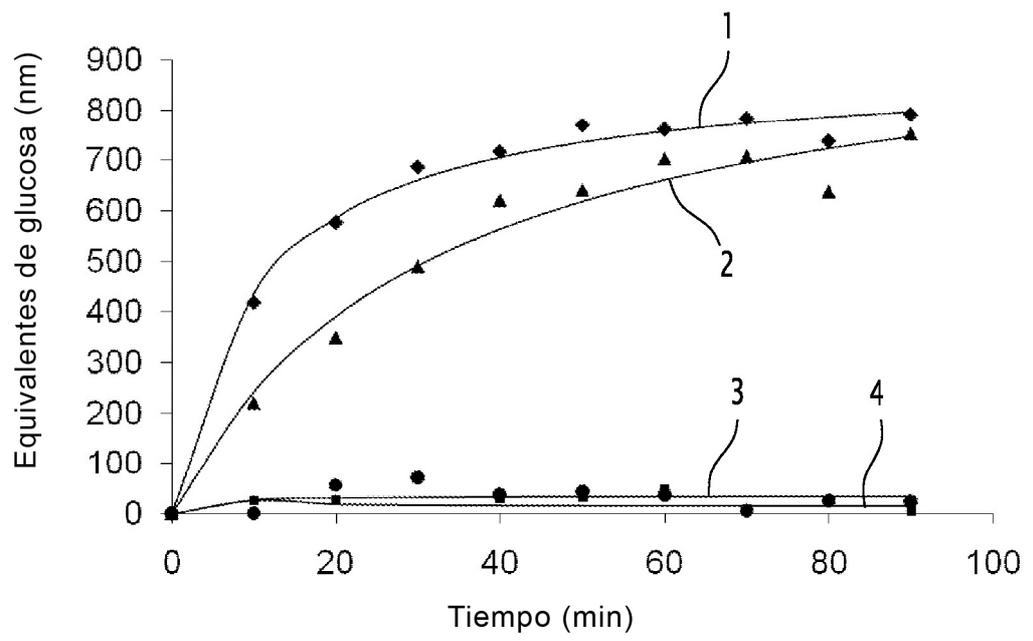


FIG.2

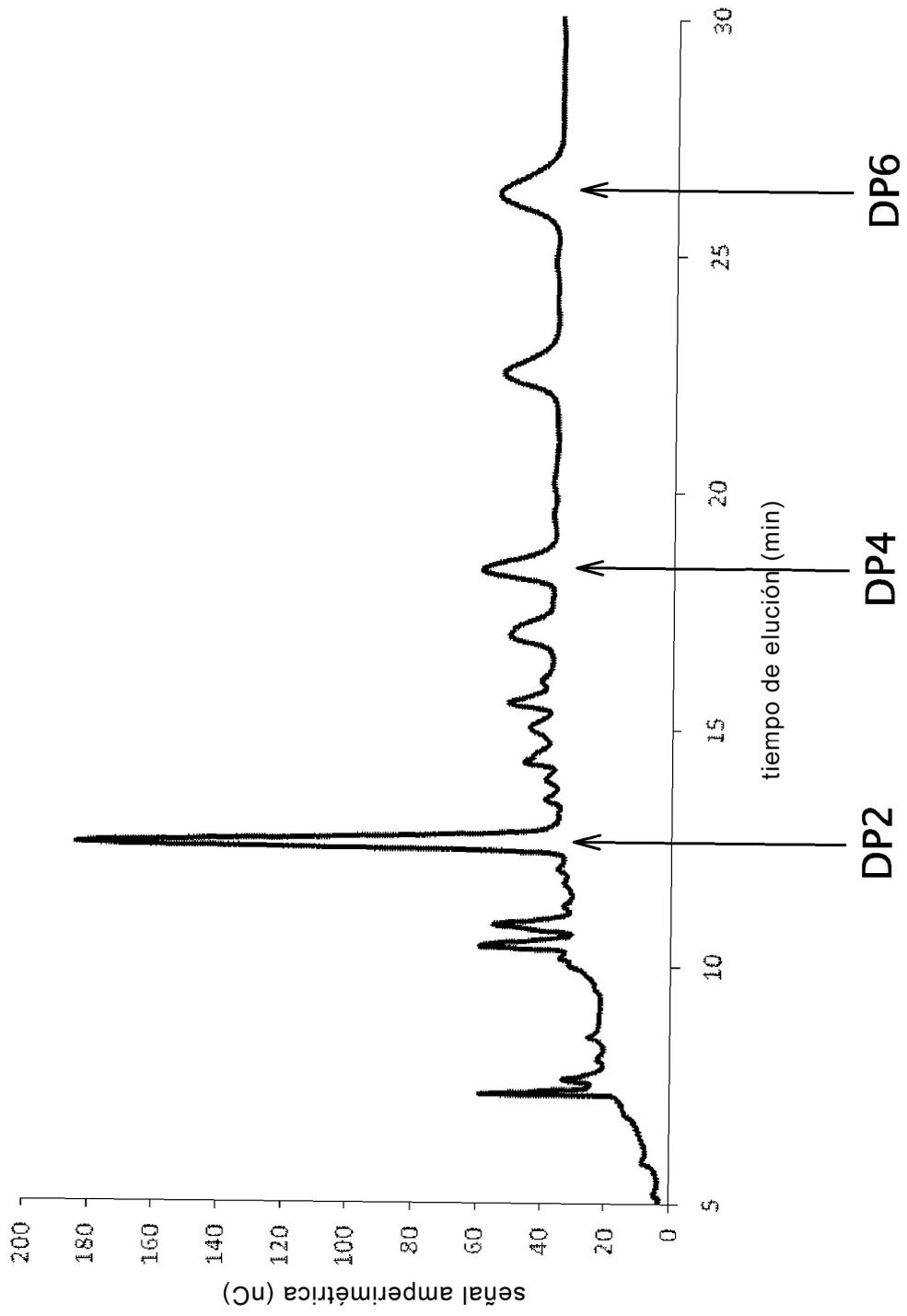


FIG.3

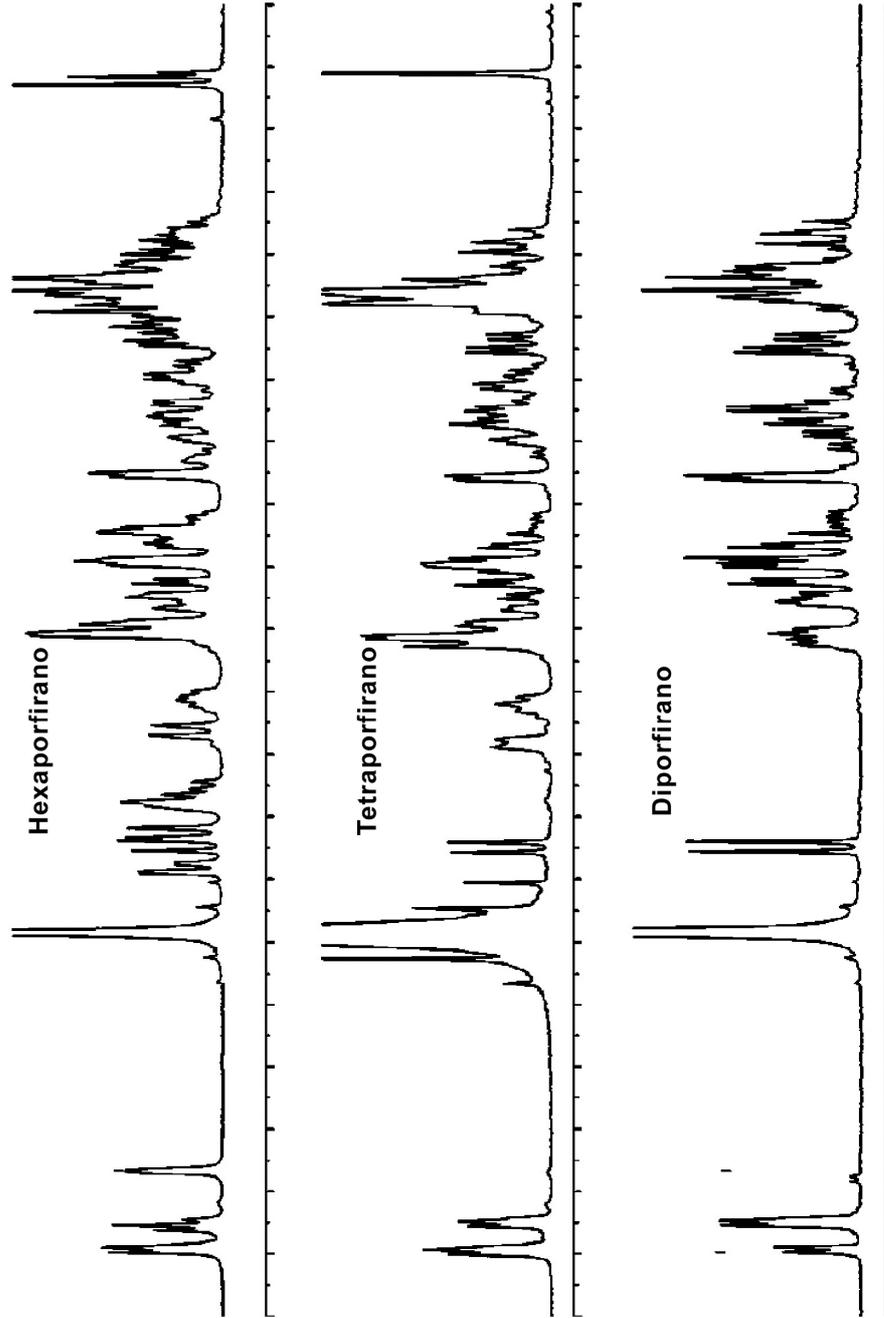


FIG.4

PorA	367	EQFEWKSNGLVALKNVLTGKWLQAPWTENNAIIRPKGPFVDNGWETFAW	416
PorB	294		293
PorA	417	KKETSPTASTALSAQLETKTVDGIRVYPSASETLTIEGVEGENGLRVFD	466
PorB	294		293
PorA	467	STGNPVLKKEGILGRKERLNVSGLIKGNYLRLRTGSGEQTFWQKN	510
PorB	294		293

FIG.6