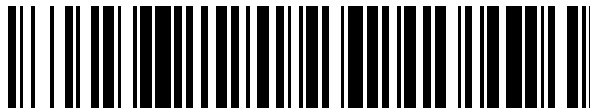


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 453**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A23L 35/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123223**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13748609 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2814835**

54 Título: **Enzimas y métodos para escindir N-glicanos de glicoproteínas**

30 Prioridad:

14.02.2012 US 201261598593 P

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

24.10.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**GARRIDO, DANIEL;
GERMAN, J. BRUCE;
LEBRILLA, CARLITO B. y
MILLS, DAVID A.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 728 453 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

Enzimas y métodos para escindir N-glicanos de glicoproteínas

5 **Antecedentes de la invención**

La presencia de ciertas especies de *Bifidobacterium* se observa comúnmente en niños en periodo de lactancia (Roger y McCartney, *Microbiology* 156: 3317-3328 (2010)), y se cree que una microbiota dominante de bifidobacterias está asociada con efectos de salud beneficiosos (Le Huerou-Luron *et al.*, *Nutr Res Rev* 23: 23-36 (2010); Conroy *et al.*, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 197-201 (2009)). Este enriquecimiento se ha explicado en parte por la capacidad de las bifidobacterias para degradarse y usar oligosacáridos de leche humana (HMO) como una fuente de carbono (Ward *et al.*, *Mol Nutr Food Res* 51: 1398-1405 (2007)). Los HMO son estructuras libres complejas que escapan de la digestión por enzimas intestinales (Kunz *et al.*, *Annu Rev Nutr* 20: 699-722 (2000)). Entre las bifidobacterias asociadas a los bebés, se ha estudiado la cepa 15697 de ATCC de *B. longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*) por su capacidad para consumir HMO *in vitro* e *in vivo* (LoCascio *et al.*, *J Agric Food Chem* 55: 8914-8919 (2007); Marcobal *et al.*, *Cell Host Microbe* 10: 507-514 (2011); Sela *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18964-18969 (2008); Sela *et al.*, *J Biol Chem* 286: 11909-11918 (2011); Garrido *et al.*, *PLoS One* 6:e17315 (2011); Sela *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* (2011)).

Una gran variabilidad en los tipos y abundancia es de las proteínas se encuentra en la leche de mama de diferentes madres en diferentes etapas de la lactancia (Mitoulas *et al.*, *Br J Nutr* 88:2 9-37 (2002)). Las proteínas de la leche son fácilmente usadas por el bebé (Prentice *et al.*, *Acta Paediatr Scand* 76: 592-598 (1987)), y pueden desempeñar funciones fundamentales en la protección del recién nacido. Por ejemplo, la lactoferrina humana (hLF) es una de las proteínas más abundantes en la leche humana, y la hLF o sus péptidos derivados presentan amplios efectos antimicrobianos y antiinflamatorios, entre varias actividades biológicas (Gonzalez-Chavez *et al.*, *Int J Antimicrob Agents* 33: 301 e301-308(2009)).

Muchas proteínas de la leche humana, así como prácticamente todas las proteínas secretadas en eucariotas, están glicosiladas (Frøehlich *et al.*, *J Agric Food Chem* 58: 6440-6448 (2010)). Aunque las caseínas de la leche son lactoferrina glicosilada unida a O, y glicanos unidos a N que contienen inmunoglobulinas (Picariello *et al.*, *Proteomics* 8: 3833-3847 (2008)). La glicosilación relacionada con la asparagina es la modificación posterior a la traducción más común de proteínas eucariotas (Apweiler *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1473: 4-8 (1999)). La glicosilación unida a N (N-glicosilación) desempeña un papel en el plegamiento, secreción, y resistencia a la proteólisis (Weber *et al.*, *J Biol Chem* 279: 34589-34594 (2004); Roth *et al.*, *Mol Cells* 30: 497-506 (2010)), función proteica, tal como reconocimiento de bacterias (Mathias y Corthesy, *J Biol Chem* 286: 17239-17247 (2011)), señalización intracelular (Sun *et al.*, *J Biol Chem* 281: 11144-11151 (2006)) y unión y presentación de antígeno a (Ryan *et al.*, *J Exp Med* 208: 1041-1053 (2011)).

Ciertos microorganismos, en su mayoría patógenos, también han adquirido la capacidad de liberar N-glicanos de glicoproteínas, por ejemplo, para uso como una fuente de carbono (Renzi *et al.*, *PLoS Pathog* 7: e1002118 (2011)) o para alterar la función biológica de ciertas glicoproteínas tales como inmunoglobulinas (Collin *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4265-4270 (2008)). Las Endo- β -N-acetilglucosaminidasas bacterianas (endoglicosidasas EC 3.2.1.96;) son enzimas que escinden la N-N-diacetil quitobiosa del pentasacárido Man₃GlcNAc₂ de núcleo encontrado en todos los N-glicanos (Varki, *Essentials of glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 2ª Ed pp xxix, 784 p. (2009)). Estas enzimas pertenecen a las familias GH18 o GH85 de la glicosil hidrolasa. Los ejemplos relevantes son EndoH de *Streptomyces plicatus* (Trimble y Maley, *Biochem Biophys Res Commun* 78: 935-944 (1977)), EndoE de *Enterococcus faecalis* (Collin y Fischetti, *J Biol Chem* 279: 22558-22570 (2004)) y EndoS de *Streptococcus pyogenes* (Allhorn *et al.*, *PLoS One* 3:e1413 (2008)), mientras que EndoD de *Streptococcus pneumoniae* (Muramatsu *et al.*, *J Biochem* 129: 923-928 (2001)) es un miembro de GH85. Las endoglicosidasas GH18 y GH85 caracterizadas previamente son de una especificidad de sustrato limitada, para cualesquiera N-glicanos de alto contenido en manosa o complejos y algunos requieren exoglicosidasas adicionales para una escisión completa del N-glicano.

En el presente documento se proporcionan enzimas de desglicosilación (endoglicosidasas) que escinden los N-glicanos de las glicoproteínas, pero con una amplia gama de sustratos, capaces de escindir N-glicanos de alto contenido de manosa, y heridos y complejos de N-glicoproteínas. Las enzimas de desglicosilación son activas en N-glicanos con fucosilación terminal y/o sialilación, y/o fucosilación de núcleo, y en una amplia gama de condiciones.

60 **Breve resumen de la invención**

En el presente documento se describen enzimas de desglicosilación con una amplia gama de sustratos para N-glicanos (véase, por ejemplo, la Sección III que sigue a continuación). Además se describen N-glicanos libres liberados por las enzimas, y proteínas desglicosiladas producidas por las enzimas. También se describen métodos para generar y usar las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente, N-glicanos libres, y proteínas desglicosiladas.

En el presente documento se describe un polipéptido recombinante, por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III, en la que el polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína. En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una
5 secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4, 5, y 7-20 (por ejemplo, una identidad de un 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 %). En algunos aspectos, el N-glicano incluye fucosilación de núcleo, fucosilación terminal, o sialilación terminal. En algunas realizaciones, el polipéptido es activo (escinde de forma detectable el N-glicano de una glicoproteína) a un pH de aproximadamente 4-8, por ejemplo, 4,5-7,5, o 5-7. En
10 algunos aspectos, el polipéptido es activo después de un tratamiento de 5 minutos 95 °C.

También se describe un polipéptido recombinante, por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III, en la que el polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y en la que el polipéptido se expresa en una célula, por ejemplo, como una proteína
15 transmembrana en la superficie celular. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % (por ejemplo, una identidad de un 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 %) con respecto a la secuencia madura de longitud completa de EndoBI-1 o EndoBI-2. En consecuencia, se describen adicionalmente células, por ejemplo, celulosa recombinante, que expresan el polipéptido (enzima de desglicosilación) que comprende una secuencia de
20 GLDIDME (SEQ ID NO: 1), en la que el polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína. En algunos aspectos, las células son células bacterianas, por ejemplo, bacterias de calidad alimentaria.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante y un
25 excipiente farmacéuticamente aceptable para administración oral, en la que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y que carece de un dominio transmembrana. La presente invención también proporciona dicha composición farmacéutica para uso en un método terapéutico para (i) favorecer la resistencia a infecciones bacterianas o por levaduras, (ii) reducir una
30 respuesta alérgica a glicoproteínas, o (iii) tratar al menos uno de síndrome intestinal inflamatorio, estreñimiento, diarrea, colitis, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, trastorno intestinal funcional (FBD), síndrome del colon irritable (IBS), bacterias reductoras del exceso de sulfato, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), y colitis ulcerosa en un individuo que comprende administrar la composición farmacéutica al individuo, opcionalmente en la que el individuo es un bebé.

La presente invención proporciona adicionalmente un producto alimentario que comprende un polipéptido recombinante, en el que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa,
40 complejos, e híbridos de una glicoproteína, y que carece de un dominio transmembrana. La presente invención también proporciona el uso de dicho producto alimentario en un método no terapéutico para inducir saciedad en un individuo que comprende la administración del producto alimentario al individuo.

También se proporcionan métodos de desglicosilación de una glicoproteína que comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido, el método comprendiendo poner en contacto la glicoproteína con
45 un polipéptido (por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III), desglicosilando de ese modo la glicoproteína y generando proteína desglicosilada y glicanos libres, en la que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y que carece de un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el contacto se realiza *in vitro*,
50 por ejemplo, en un laboratorio o de otro modo no en el cuerpo de un organismo hospedador. En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente la separación de la proteína desglicosilada, por ejemplo, del glicano libre y polipéptido (enzima de desglicosilación). En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente la separación del glicano libre, por ejemplo, de la proteína desglicosilada y el polipéptido (enzima de desglicosilación).

Por lo tanto en el presente documento también se describen métodos para producir glicano libre que comprende poner en contacto una glicoproteína que comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido con un polipéptido como se describe en el presente documento (por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III), desglicosilando de ese modo la glicoproteína y generando proteína desglicosilada y glicano libre, y separando el glicano libre de la proteína desglicosilada y polipéptido. En algunos
60 aspectos, el contacto se realiza *in vitro*. En algunos aspectos, la glicoproteína es una glicoproteína de leche (por ejemplo, de un ser humano, bovino, o cabra), una glicoproteína de huevo o una glicoproteína vegetal. En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular. En algunos aspectos, el polipéptido es una proteína transmembrana en una célula. En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente la caracterización del glicano libre (por ejemplo, usando espectrometría de masas, determinación de tamaño, determinación de la composición del sacárido, etc.). En algunos aspectos, se proporciona una composición
65 que comprende glicanos libres (N-glicanos) producidos por la puesta en contacto de una glicoproteína que

comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido con un polipéptido que comprende una secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1), en la que el polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína. En algunos aspectos la composición comprende al menos dos o tres tipos de N-glicano. En algunas realizaciones, el N-glicano libre tiene una estructura del núcleo de Man₃GlcNAc (es decir, un núcleo de GlcNAc en lugar de dos). En algunos aspectos, el N-glicano libre incluye fucosilación de núcleo, fucosilación terminal, o sialilación terminal. En algunos aspectos, el glicano libre está incluido en un producto alimentario, bebida, composición farmacéutica o producto para consumidor. En algunos aspectos, el producto alimentario o bebida se usa para estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas (por ejemplo, *Bifidobacteria*) en un ser humano o animal, o para mejorar la respuesta inmunológica de un individuo a una glicoproteína o glicano libre dados.

En el presente documento también se describen métodos para producir proteína desglicosilada que comprende poner en contacto una glicoproteína que comprende un N-glicano de alto contenido de manosa complejo o híbrido con un polipéptido como se describe en el presente documento (por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III), desglicosilando de ese modo la glicoproteína y generando proteína desglicosilada y glicano libre, y separando la proteína desglicosilada del glicano libre y polipéptido. En algunos aspectos, la puesta en contacto se realiza *in vitro*. En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende una membrana celular. En algunos aspectos, el polipéptido es una proteína transmembrana en una célula. En algunos aspectos, la glicoproteína es una glicoproteína de leche (por ejemplo, de un ser humano, bovino, o cabra), una glicoproteína de huevo, o una glicoproteína vegetal. En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente la caracterización de la proteína desglicosilada (por ejemplo, determinación del tamaño, secuencia, carga, etc.). En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende proteína desglicosilada producida por la puesta en contacto de una glicoproteína que comprende un N-glicano de alto contenido de manosa complejo o híbrido con un polipéptido que comprende una secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1), en la que el polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína. En algunos aspectos, la proteína desglicosilada retiene un grupo GlcNAc en un sitio previamente glicosilado. En algunos aspectos, la proteína desglicosilada está incluida en un producto alimentario, bebida o producto para el consumidor. En algunos aspectos, el producto alimentario o bebida se usa para aumentar la eficacia de la ingestión de proteínas y/o inducir saciedad y/o reducir la respuesta alérgica a una glicoproteína en un individuo.

En el presente documento también se describen métodos para producir un polipéptido de forma recombinante (por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III), en los que dicho polipéptido comprende una secuencia de: GLDIDME (SEQ ID NO: 1) y puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, que comprenden poner en cultivo una célula que comprende un polinucleótido recombinante que codifica el polipéptido en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido, produciendo de ese modo el polipéptido de forma recombinante. En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende una membrana celular. En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente el aislamiento del polipéptido (por ejemplo, separación de la proteína de otros componentes celulares). En algunos aspectos, el polipéptido es una proteína transmembrana en una célula.

La presente invención también proporciona una composición que comprende (i) un polipéptido recombinante that comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y que carece de un dominio transmembrana; y (ii) una glicoproteína que comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido. También se describe la composición que comprende (i) un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de: GLDIDME (SEQ ID NO: 1), en la que dicho polipéptido puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína (por ejemplo, una enzima de desglicosilación como se desvela en la Sección III); y (ii) una glicoproteína, en la que la glicoproteína comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido. En algunos aspectos, la glicoproteína es una glicoproteína de leche (por ejemplo, de un ser humano, bovino, o cabra), una glicoproteína de huevo, o una glicoproteína vegetal. En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular. En algunos aspectos, el polipéptido es una proteína transmembrana en una célula.

Además se describen polipéptidos recombinantes obtenidos a partir de las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente con propiedades manipuladas. Por ejemplo, los polipéptidos recombinantes de función manipulada de ese tipo pueden incluir menos de todas las actividades de las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente, o que añaden una actividad (por ejemplo, unión a un resto de separación, etc.). Un ejemplo específico polipéptidos recombinantes de función manipulada con menos actividades incluyen polipéptidos manipulados para tener la misma capacidad o una capacidad similar para unirse a glicanos y glicoproteína como una enzima de desglicosilación que se describe en el presente documento, pero que carecen de actividad de desglicosilación significativa. Los polipéptidos de ese tipo actúan como "lectinas", es decir, proteínas que se unen a glicanos y restos de carbohidrato, pero que no se escinden. Los polipéptidos de ese tipo se pueden diseñar mediante manipulación de los restos conservados de sitio activo, por ejemplo, dentro de las SEQ ID NOs: 1 y 2. Se muestra el ejemplo de proteína D184N de EndoBI-1 shown, por ejemplo, en el Ejemplo 4. Los polipéptidos

recombinantes de función manipulada, similares a lectina de ese tipo se pueden usar para separar glicoproteínas, por ejemplo, para caracterización o desglicosilación posteriores.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1: Actividad de endoglicosidasa en aislados de *Bifidobacterium*. A: Tiempo de desglicosilación de ARNsaB por la cepa 15697 de ATCC de *B. infantis*. La incubación durante la noche con ARNsaB se realizó con otros aislados de *B. longum* (B), *B. infantis* (C) o *B. breve* (D). E: Representación filogenética de secuencias de endoglicosidasa encontradas en aislados de bifidobacterias.

10 La Figura 2: Representación de paisajes genéticos de endoglicosidasas encontrados en organismos que se enumeran en el listado de la figura. IMG se usó para obtener coordenadas genéticas. GH: glicosil hidrolasa; SBP: proteína de unión a soluto; PTS: sistema de fosfotransferasa.

15 La Figura 3: Caracterización de endoglicosidasas recombinantes en bifidobacterias. A: Tolerancia al calor de EndoBI-1, EndoBI-2 o EndoBB evaluada en geles de SDS-PAGE. B: Coincubaciones de bLF y hLF con EndoBI-1 (1), EndoBI-2 (2), EndoBB (3) o PNGasaF (4). Las reacciones no digeridas de Control (C) se incluyeron en paralelo.

20 La Figura 4: MALDI de glicanos libres liberados de (A) bLF, (B) hLF, y (C) IgA después de la exposición a EndoBI-1.

La Figura 5: MALDI de glicanos libres liberados de (A) ARNsaB, (B) IgG, (C) hLF en modo negativo, y (D) IgA en modo negativo después de la exposición a EndoBI-1.

25 La Figura 6: Propiedades de EndoBI-1 mutante para D184N. (A) Análisis de matriz de glicano de D184N de EndoBI-1 a glicanos de mamífero (eje x). Las barras representan DT de sextuplicados. (B) Unión de D184N de EndoBI-1 o EndoBI a glicoproteínas revestidas, tal como se detecta con un anticuerpo FITC-AntiHis. Las barras de error representan DT de experimentos por triplicado. Los asteriscos representan muestras con $p < 0,05$ en comparación con BSA.

30 La Figura 7: Actividad de EndoBI-1 en N-glicanos de leche. (A) Gel de SDS-PAGE incubación durante la noche de leche humana (calle 1, control) con EndoBI-1 (calle 2), EndoBI-1 D184N (calle 3) o PNGaseF (calle 4). (B) Cantidad de N-glicosilación (proporcional a α -manosa) en muestras de A. Las barras de error representan DT de experimentos por triplicado. Los asteriscos representan muestras con $p < 0,05$ en comparación con control.

35 La Figura 8: Factores de cambio en la expresión genética de EndoBI-1 durante el tiempo de coincubación con bLF o hLF, tal como se indica en la leyenda de la figura. Las etiquetas del locus se describen en el texto. Las barras de error representan DT de tres replicados biológicos.

40 La Figura 9: Factores de cambio en la expresión genética para genes de la cepa 15697 de ATCC de *B. infantis* durante el tiempo de coincubación con bLF o hLF, tal como se indica. Las barras de error representan DT de tres replicados biológicos. (A) Genes asociados al metabolismo de GlcNAc y situados cerca de EndoBI-1. (B) Genes que previamente se les pidió que estaban asociados o inducidos por oligosacáridos de leche humana (HMO).

45 La Figura 10: Crecimiento de aislados de bifidobacterias en 10 mg/ml de ARNsaB. Las líneas son representativas de tres replicados.

Descripción detallada de la invención

50 I. Introducción

Las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente tienen una serie de propiedades útiles. A diferencia de las enzimas de desglicosilación conocidas, las presentes enzimas de desglicosilación tienen al menos los siguientes beneficios:

- Escisión indiscriminada de N-glicanos, incluyendo N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos, y los que incluyen fucosilación y/o sialilación;
- Estabilidad térmica, es ventajosa para producción a gran escala y aplicaciones de laboratorio;
- 60 • Las *Bifidobacterias*, que expresan las enzimas de desglicosilación presentes en la superficie celular, se consideran de calidad alimentaria, o reconocidas generalmente como seguras (GRAS), facilitando de ese modo cualquier obstáculo regulatorio para su uso en productos alimentarios o de consumo.

Las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente también se pueden expresar (por ejemplo, de forma heteróloga) en otras bacterias de calidad alimentaria.

65

Aplicaciones a modo de ejemplo de las presentes enzimas de desglicosilación:

- 5 • Inclusión en productos alimentarios (ya sea como un polipéptido o como una proteína transmembrana celular), por ejemplo:
 - Para aumentar la digestibilidad de glicoproteínas, tales como las encontradas en la que se;
 - Para estimular el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas, por ejemplo, en bebés;
 - Para reducir la respuesta alérgica a glicoproteínas alimentarias, por ejemplo, en leche, frutos secos, soja, etc.;
 - 10 ◦ Para inducir saciedad, por ejemplo, para pérdida o mantenimiento de peso.
- Inclusión en productos farmacéuticos, por ejemplo:
 - Para reducir el potencial alérgico y mejorar la actividad de glicoproteínas terapéuticas;
 - 15 ◦ Para mejorar la respuesta inmunológica a glicanos libres.
- Aplicaciones analíticas, por ejemplo, proteómica y glicoproteómica de alto rendimiento.
- Producción de proteínas desglicosiladas, por ejemplo:
 - Uso en un producto alimentario o de consumo con un potencial alérgico reducido;
 - Uso en una composición farmacéutica con un potencial alérgico reducido y propiedades químicas más predecibles;
 - Uso en un producto alimentario con un aumento de la digestibilidad;
 - Uso para caracterización de proteínas y estudios proteómicos.
 - 20
- Producción de glicanos libres para, por ejemplo:
 - Uso en un producto alimentario, por ejemplo, como un prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas;
 - Uso en una composición farmacéutica, por ejemplo, para estimulación inmunológica o protección patogénica;
 - Uso para caracterización de glicanos y estudios glicoproteómicos.
 - 25
 - 30

II. Definiciones

35 A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende una persona con una experiencia habitual en la materia. Véase, por ejemplo, Lackie, *DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier (4ª ed. 2007); Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Cualquier método, dispositivo y materiales similares equivalentes a los que se describen en el presente documento se pueden usar en la práctica de la presente invención.

45 El término "N-glicano" se refiere a un oligosacárido que comprende un pentasacárido de núcleo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. El N-glicano se puede unir a una proteína (glicoproteína) mediante el nitrógeno de un resto de asparagina (u ocasionalmente arginina), o libre en solución. En el contexto de la presente divulgación, el término "glicano" se refiere a un N-glicano a menos que se especifique de otro modo. Las expresiones "glicano libre", "N-glicano libre", y "oligosacárido" se refieren a un glicano que no se une mediante enlace covalente a una proteína. Una referencia útil para nomenclatura de glicano, glicoproteínas, y oligosacárido se puede encontrar en la página web chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/glycp.html.

50 A menos que se especifique, la expresión "enzima de desglicosilación" se refiere a las endoglicosidasas que se desvelan por la presente con una amplia gama de sustratos, así como a enzimas con especificidades de sustrato más limitadas. Generalmente el término "desglicosilación" se refiere a la retirada de N-glicanos de una proteína. La expresión "proteína desglicosilada" o "polipéptido desglicosilado" se refiere a un polipéptido que estaba glicosilado (N-glicosilado) en un punto, pero que se ha expuesto a una enzima de desglicosilación en condiciones apropiadas para reducir el número de o elimina completamente los glicanos unidos.

60 La expresión "carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular", con referencia a una proteína, indica que la proteína no se extiende a una membrana celular como lo haría en su estado nativo. La proteína puede incluir un dominio con las características de un dominio transmembrana (por ejemplo, restos hidrófobos).

65 Los términos "aislar", "separar", y "purificar" no pretenden ser términos absolutos, sino que se refieren a la separación de un polinucleótido, proteína, glicano, célula u otro componente de otros materiales en una muestra, enriqueciendo de ese modo esencialmente al componente. Por ejemplo, en el contexto de una reacción de desglicosilación, el aislamiento de los glicanos libres podría implicar la separación de los glicanos libres de la proteína desglicosilada y la enzima de desglicosilación, por ejemplo, usando métodos basados en el tamaño o la

afinidad, u otros métodos familiares en la técnica.

El término "caracterizar" puede hacer referencia a la determinación de cualquier característica de un polinucleótido, proteína, glicano, célula u otro componente. Por ejemplo, la caracterización de una proteína podría implicar la determinación de la secuencia, el tamaño o la función de la proteína. La caracterización de un glicano podría implicar la determinación, por ejemplo, del tamaño o la composición de sacáridos del glicano usando métodos conocidos, por ejemplo, espectrometría de masas.

El término "*Bifidobacterias*" y sus sinónimos se refieren a un género de bacterias anaerobias que tienen propiedades beneficiosas para los seres humanos. Las *Bifidobacterias* son una de las principales cepas de bacterias que forman la flora intestinal, las bacterias que residen en el tracto gastrointestinal y tienen beneficios para la salud para sus hospedadores. Véase, por ejemplo, Guarner F y Malagelada JR. Lancet (2003) 361, 512-519, para una descripción adicional de las *Bifidobacterias* en la flora intestinal normal.

Un "prebiótico" o "nutriente prebiótico" es generalmente un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa a un hospedador cuando se ingiere al estimular de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una bacteria o un número limitado de bacterias en el tracto gastrointestinal. Tal como se usa en el presente documento, el término "prebiótico" se refiere a los ingredientes alimentarios no digeribles que se han descrito anteriormente en sus estados no naturales, por ejemplo, después de purificación, síntesis química o enzimática a diferencia de, por ejemplo, en leche completa humana.

Un "probiótico" se refiere a microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud en el hospedador.

Una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos es "heteróloga para" un organismo o una segunda secuencia si se origina a partir de una especie diferente o, si proviene de la misma especie, se modifica a partir de su forma original. Por ejemplo, un promotor unido de forma operativa a una secuencia de codificación heteróloga se refiere a una secuencia de codificación de una especie diferente a partir de la cual se obtuvo el promotor, o, si es de la misma especie, una secuencia de codificación que no está asociada de forma natural con el promotor (por ejemplo, una secuencia de codificación diseñada genéticamente o un alelo de un ecotipo o variedad diferente). De manera similar, un casete de expresión heterólogo incluye secuencia o secuencias que son de una especie diferente a la de la célula en la que se introduce el casete de expresión, o si ellas de la misma especie, se modifica genéticamente.

"Recombinante" se refiere a un polinucleótido, polipéptido, célula, tejido u organismo modificado genéticamente. Cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, el término indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula se obtiene a partir de una célula modificada de ese modo. De ese modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan de manera anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante (o una copia o complemento de un polinucleótido recombinante) es uno que ha sido manipulado para que sea diferente de su forma natural. Un casete de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a un segundo polinucleótido (por ejemplo, una secuencia de codificación) puede incluir un promotor que es heterólogo al segundo polinucleótido como resultado de la manipulación humana (por ejemplo, con métodos que se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989) o Current Protocols in Molecular Biology Volúmenes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)). Un casete de expresión recombinante (o vector de expresión) generalmente comprende combinaciones de polinucleótidos que no se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, los sitios de restricción o secuencias de vectores de plásmidos manipulados por el ser humano pueden flanquear o separar el promotor de otras secuencias. Una proteína recombinante es una que se expresa a partir de un polinucleótido recombinante, y las células, tejidos y organismos recombinantes son aquellos que comprenden secuencias recombinantes (polinucleótidos y/o polipéptidos).

Las expresiones "ácido nucleico", "oligonucleótido", "polinucleótido" y términos similares generalmente se refieren a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, ya sea en forma de cadena sencilla o doble, y complementos de los mismos. El término "nucleótido" generalmente se refieren a un monómero. Los términos abarcan ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos o restos o enlaces de la estructura principal modificados o conocidos, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de análogos de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptídicos nucleicos (PNA).

A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. De forma específica, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que la

tercera posición de uno o más codones (o todos) seleccionados está sustituida con restos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

5 El término "gen" se refiere a un segmento de ADN involucrado en la producción de una proteína; incluye las regiones precedentes y siguientes a la región de codificación (líder y tráiler), así como las secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones). El líder, el tráiler así como los intrones incluyen elementos reguladores que son necesarios durante la transcripción y la traducción de un gen (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.). Un "producto génico" puede hacer referencia al ARNm o a la proteína expresada a partir de un gen particular.

15 Los términos "complementario" o "complementariedad" se refieren a la capacidad de un ácido nucleico en un polinucleótido para formar un par de bases con otro ácido nucleico en un segundo polinucleótido. Por ejemplo, la secuencia A-G-T es complementaria a la secuencia T-C-A. La complementariedad puede ser parcial, en la que solo algunos de los ácidos nucleicos coinciden según el emparejamiento de bases, o completos, donde todos los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con el emparejamiento de las bases.

20 Los términos "transfección" o "transfectado" se refieren a la introducción de un ácido nucleico en una célula mediante métodos no basados en virus o basados en virus. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser secuencias genéticas que codifican proteínas completas o partes funcionales de las mismas. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88.

25 El término "expresión" o "expresado" como se usa en el presente documento en referencia a un gen se refiere al producto de transcripción y/o de traducción de ese gen. El nivel de expresión de una molécula de ADN en una célula se puede determinar sobre la base de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente dentro de la célula o la cantidad de proteína codificada por ese ADN producido por la célula.

30 La expresión de un gen transfectado se puede producir de forma transitoria o de forma estable en una célula. Durante la "expresión transitoria", el gen transfectado no se transfiere a la célula hija durante la división celular. Dado que su expresión está limitada a la célula transfectada, la expresión del gen se pierde con el tiempo. Por el contrario, la expresión estable de un gen transfectado se puede producir cuando el gen se cotransfecta con otro gen que confiere una ventaja de selección a la célula transfectada. Dicha ventaja de selección puede ser una resistencia hacia una determinada toxina que se presenta a la célula.

35 Un vector de expresión se refiere a un ácido nucleico que incluye una secuencia de codificación y secuencias necesarias para la expresión de la secuencia de codificación. El vector de expresión puede ser viral o no viral. Un "plásmido" es un vector de expresión no viral, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica genes y/o elementos reguladores necesarios para la expresión de genes. Un "vector viral" es un ácido nucleico obtenido a partir de virus que es capaz de transportar otro ácido nucleico a una célula. Un vector viral es capaz de dirigir la expresión de una proteína o proteínas codificadas por uno o más genes portados por el vector cuando está presente en el entorno apropiado. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores virales retrovirales, adenovirales, lentivirales y adenoasociados.

45 Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente para indicar un polímero de aminoácido o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos que interactúan o se unen. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos de origen natural y al polímero de aminoácidos de origen no natural.

50 El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Los análogos de ese tipo tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los términos "aminoácido de origen no natural" y "aminoácido no natural" se refieren a análogos de aminoácidos, aminoácidos sintéticos y miméticos de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza.

65 En el presente documento los aminoácidos se pueden mencionar ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica

IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, se pueden mencionar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

5 Las "variantes modificadas de manera conservativa" se aplican tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU
10 codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Las variaciones de ácido nucleico de ese tipo son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Alguien con experiencia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias de sondas reales.

20 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, alguien con experiencia reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que altera, añade o produce de elección de un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Las variantes modificadas de manera conservativa pueden incluir variantes polimórficas, homólogos interespecies (ortólogos), homólogos intraespecies (parálogos) y variantes alélicas.

30 El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico o aminoácido idéntico en
35 ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

40 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o aminoácidos que son iguales (es decir, una identidad de aproximadamente un 60 %, preferentemente un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, una identidad más elevada con respecto a una región específica, cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima con respecto a una ventana de comparación o una región designada, tal como se mire usando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros determinados previamente por efecto, o mediante alineamiento manual e inspección visual. Véase por ejemplo, el sitio web del NCBI en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Entonces se dice que las secuencias de ese tipo son "básicamente idénticas". Esta definición también se refiere, o se puede aplicar, al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen
45 sustituciones. Los algoritmos preferentes pueden explicar los espacios y similares. La identidad se calcula generalmente sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferentemente sobre una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos, o sobre toda la longitud de una secuencia dada.

55 Una muestra o valor de "control" se refiere a una muestra que sirve como referencia, generalmente una referencia conocida, para comparación con una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede incluir una solución que comprende glicoproteína expuesta a un polipéptido con un dominio endoglicosidasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2), mientras que la muestra de control no incluye el polipéptido, o incluye uno diferente, conocido dominio de escisión de glicanos. En otro ejemplo, se puede tomar una muestra de ensayo de un paciente sensible a una glicoproteína particular, y compararla con muestras de un individuo normal conocido (no sensible). Un control también puede representar un valor promedio obtenido de una población de individuos similares, por ejemplo, pacientes o individuos sanos con antecedentes médicos similares, de la misma edad, peso, etc. También se puede obtener un valor de control del mismo individuo, por ejemplo, de una muestra obtenida anteriormente, antes del inicio de la afección o síntoma que se tiene como objeto, o antes del tratamiento. Alguien con experiencia reconocerá que
60 los controles se pueden diseñar para evaluar cualquier número de parámetros.

Alguien con experiencia en la materia entenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basados en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la importancia de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado son muy variables en los controles, la variación en las muestras de ensayo no se considerará significativa.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión composición "farmacéutica" se usa como sinónimo de fisiológicamente aceptable y farmacológicamente aceptable. Una composición farmacéutica generalmente comprenderá agentes para el tampón ambiente y conservación durante el almacenamiento, y puede incluir tampones y vehículos para el suministro apropiado, dependiendo de la vía de administración.

10 Los términos "dosis" y "dosificación" se usan indistintamente en el presente documento. Una dosis se refiere a la cantidad de principio activo que se administra a un individuo en cada administración. Para la presente invención, la dosis generalmente a la referencia a la cantidad de antibiótico o agente antiinflamatorio, aunque la dosificación también se puede expresar en términos de concentración bacteriana. La dosis variará dependiendo de una serie de factores, incluyendo frecuencia de administración; tamaño y tolerancia del individuo; gravedad de la afección; riesgo de efectos secundarios; y la vía de administración. Alguien con experiencia reconocerá que la dosis se puede modificar dependiendo de los factores mencionados anteriormente o basándose en el progreso terapéutico. La expresión "forma de dosificación" se refiere al formato particular del producto farmacéutico y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede estar en forma líquida para nebulización, por ejemplo, para agentes inhalantes, en un comprimido o líquido, por ejemplo, para administración oral o una solución salina, por ejemplo, para inyección.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "terapéutico", "prevenir" y "profiláctico" no pretenden ser términos absolutos. Los términos se pueden referir a cualquier retraso en el inicio, reducción en la frecuencia o gravedad de los síntomas adversos, mejora en la comodidad del paciente, etc. El efecto del tratamiento se puede comparar con un individuo o grupo de individuos que no reciben un tratamiento dado, o con el mismo paciente antes, o después del cese, del tratamiento.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiera la cantidad del agente terapéutico suficiente como para mejorar la afección o síntomas que se tienen como objetivo. Por ejemplo, para el parámetro dado, una cantidad terapéuticamente eficaz mostrará un aumento o disminución de al menos un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 75 %, un 80 %, un 90 %, o al menos un 100 %. La eficacia terapéutica también se puede expresar como "número de veces" de aumento o disminución. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede tener un efecto de al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, o más con respecto a un control.

III. Enzimas de desglicosilación

40 Las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente pertenecen a las familias GH18 y GH85 de endoglicosidasas. Estas enzimas son capaces de escindir una gama mucho más amplia de N-glicanos de proteínas N-glicosiladas que las enzimas de desglicosilación que se han caracterizado previamente.

45 La N-glicosilación de proteínas es común en eucariotas, certamen se observan bacterias. La N-glicosilación está implicada en el plegamiento de proteínas, direccionamiento de la glicoproteína a la membrana o para secreción, resistencia a proteólisis, adhesión celular, señalización intracelular, y presentación de antígenos. Las N-glicoproteínas incluyen proteínas de la leche (por ejemplo, lactoferrina, IgA, y suero de leche), inmunoglobulinas, y proteínas vegetales (por ejemplo, proteína de soja).

50 Los N-glicanos se dividen en tres clases: alto contenido de (u oligo) manosa, complejos, e híbridos. Los tres comparten una molécula núcleo de dos restos N-acetilglucosaminas y tres restos de manosa (Man₃GlcNAc₂), que forman dos ramificaciones. Los N-glicanos de alto contenido en manosa comprenden sacáridos manosa en ambas ramificaciones. Los N-glicanos complejos incluyen tipos de sacáridos adicionales, por ejemplo, D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), Manosa, L-fucosa (Fuc), ácido siálico (por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)), N-acetilgalactosamina, y N-acetilglucosaminas (GlcNAc) adicionales, en ambas ramificaciones. Los sacáridos adicionales están en organismos menos complejos. Los N-glicanos híbridos tienen una ramificación de manosa y una ramificación compleja.

60 Las enzimas de desglicosilación que se desvelan por la presente son únicas porque retiran los tres tipos de N-glicanos. En algunos aspectos, las presentes enzimas de desglicosilación escinden N-glicanos con fucosilación terminal y/o sialilación, y/o fucosilación de núcleo.

65 En consecuencia, en el presente documento se proporcionan enzimas de desglicosilación con una amplia gama de sustratos de N-glicano, es decir, capaces de escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una proteína. En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación es un polipéptido de endoglicosidasa GH18 que comprende una secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular (es decir, el polipéptido no está presente en su

forma natural que se extiende a una membrana de una célula). En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %, con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7-20. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad de más de un 85 % con respecto a la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene con una identidad superior. 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %, con respecto a la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 5.

En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación con una amplia gama de sustratos de N-glicano es un polipéptido de endoglicosidasa GH85 que comprende una secuencia de FINQET (SEQ ID NO: 2). En algunos aspectos, el polipéptido carece de un dominio transmembrana que se extiende a una membrana celular (es decir, el polipéptido no está presente en su forma natural que se extiende a una membrana de una célula). En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %, con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 21-31. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 % con respecto a la SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %, con respecto a la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 6.

En algunos aspectos, el polipéptido está en una solución *in vitro* con una N-glicoproteína, en el que la N-glicoproteína comprende un N-glicano de alto contenido en manosa, complejo, y/o híbrido. Por ejemplo, una endoglicosidasa GH18 o GH85 como se describe en el presente documento se puede usar en un laboratorio o entorno industrial para escindir N-glicanos de N-glicoproteínas, creando a lo largo del tiempo una solución de endoglicosidasa, una cantidad decreciente de N-glicoproteínas, y cantidades crecientes de glicanos libres y proteínas desglicosiladas. En algunos aspectos, el N-glicano comprende fucosilación de núcleo, fucosilación terminal, o sialilación terminal. El polipéptido, aunque no se extiende a una membrana celular en su forma natural, puede incluir un dominio transmembrana. En algunos aspectos, el polipéptido se puede unir a un sustrato, por ejemplo, una superficie de perla o placa.

En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación con una amplia gama de sustratos de N-glicano es un polipéptido de endoglicosidasa GH18 que comprende una secuencia de GLDIDME (SEQ ID NO: 1) y se expresa de forma recombinante en una célula. En algunos aspectos, el polipéptido se extiende a la membrana de la célula. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad esencial (por ejemplo, una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %) con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7-20. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 % con respecto a la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad mayor que esencial (por ejemplo, una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %) con respecto a la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad esencial (por ejemplo, una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %) con respecto a la secuencia de polipéptido madura de longitud completa de EndoBI-1 o EndoBI-2.

En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación con una amplia gama de sustratos de N-glicano es un polipéptido de endoglicosidasa GH85 que comprende una secuencia de FINQET (SEQ ID NO: 2) y se expresa de forma recombinante en una célula. En algunos aspectos, el polipéptido se extiende a la membrana de la célula. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad esencial (por ejemplo, una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %) con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 21-31. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad superior a un 85 % con respecto a la SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad esencial (por ejemplo, una identidad superior a un 85 %, por ejemplo, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, o un 100 %) con respecto a la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 6.

En algunos aspectos, el polipéptido expresado recombinante mente en una célula está en una solución *in vitro* con una N-glicoproteína, en el que la N-glicoproteína comprende un N-glicano de alto contenido en manosa, complejo, y/o híbrido. Por ejemplo, las células recombinantes que expresan una endoglicosidasa GH18 o GH85 como se describe en el presente documento se pueden usar en un laboratorio o entorno industrial para escindir N-glicanos de

N-glicoproteínas, creando a lo largo del tiempo una solución de células, una cantidad decreciente de N-glicoproteínas, y cantidades crecientes de glicanos libres y proteínas desglicosiladas. En algunos aspectos, el N-glicano comprende fucosilación de núcleo, fucosilación terminal, o sialilación terminal.

- 5 Las enzimas de desglicosilación que se describen en el presente documento se pueden usar para generar glicanos libres, para generar polipéptidos desglicosilados para su uso en aplicaciones nutricionales, profilácticas, o terapéuticas. Las enzimas de desglicosilación también se pueden usar para estudios proteómico o glicoproteómicos, proporcionando una desglicosilación en una etapa que facilita la caracterización de proteínas o glicanos que normalmente son inaccesibles o que normalmente requieren múltiples tratamientos enzimáticos o químicos antes de su estudio.

IV. Métodos para preparar enzimas recombinantes

- 15 Las enzimas de desglicosilación que se describen en el presente documento se pueden expresar y producir de forma recombinante usando métodos bien conocidos en la técnica. Se pueden encontrar técnicas de rutina en el campo de la expresión y producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª Ed, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); Y en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1994-1999).

- 20 Las *Bifidobacterias* se designan como GRAS y, por lo tanto, se pueden usar para la expresión recombinante de las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente. Las *Bifidobacterias* a modo de ejemplo (por ejemplo, *Bifidobacterias* que expresan de manera recombinante una enzima de desglicosilación) pueden incluir, pero no se limitan a, *B. longum* bv *infantis*, *B. longum* bv *longum*, *B. breve*, y *B. adolescentis*.

- 25 Una persona con experiencia reconocerá, sin embargo, que muchas células eucariotas y procariotas se pueden usar para clonación, expresión y producción de rutina de las enzimas de desglicosilación que se desde la en el presente documento. Estas incluyen células de animales, células de insectos, bacterias, hongos y levaduras, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Por ejemplo, se pueden usar cepas comunes de laboratorio de células de *E. coli*, levadura o mamíferos para producir las enzimas de desglicosilación recombinantes. Los métodos para la introducción y expresión de ácidos nucleicos aislados o heterólogos en una célula se conocen bien, y se pueden encontrar, por ejemplo, en la referencia general, que se ha mencionado anteriormente. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona células hospedadoras y vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos que se describen en el presente documento.

- 35 Los ácidos nucleicos que codifican las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente se pueden preparar usando técnicas convencionales o de síntesis. Los ácidos nucleicos pueden ser ARN, ADN o híbridos de los mismos. Alguien con experiencia puede construir una diversidad de clones que contengan ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como los ácidos nucleicos que codifican el mismo polipéptido. Las metodologías de clonación para lograr estos fines y los métodos de secuenciación para verificar la secuencia de los ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica.

- 45 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se sintetizan *in vitro*. Los desoxinucleótidos se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22 (20): 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado, por ejemplo, como se describe en Needham-VanDevanter, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984). En otros aspectos, la secuencia de ácidos nucleicos deseada se puede obtener mediante una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR.

- 50 Alguien con experiencia estará familiarizada con los métodos para generar alteraciones o variantes de una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos dada, por ejemplo, para expresión óptima en una célula dada.

- 55 Para obtener un alto nivel de expresión de una secuencia deseada (por ejemplo, una secuencia que da como resultado la ablación de las PGC), se construye un vector de expresión que incluye elementos tales como un promotor para transcripción directa, un terminador de transcripción/traducción, un sitio de unión a ribosoma para inicio de la traducción, y similares. Los promotores bacterianos adecuados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en las referencias que proporcionan métodos y protocolos de clonación de la expresión que se citan en lo sucesivo en el presente documento. Los kits para los sistemas de expresión de ese tipo están disponibles comercialmente. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras y células de insectos se conocen bien en la técnica y también están disponibles en el mercado.

- 60 Además del promotor, el vector de expresión por lo general contiene una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico en las células hospedadoras. Por lo tanto, un casete de expresión habitual contiene un promotor unido de forma operativa a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína o polinucleótido inhibidor, y las señales requeridas para una poliadenilación eficaz del transcrito, sitios de unión al ribosoma y terminación de la traducción.

65

El casete de expresión puede contener una región de terminación de la transcripción cadena abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener de diferentes genes.

5 El vector de expresión particular usado para transportar la información genética a la célula no es particularmente crítico. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariontas. Los vectores de expresión bacterianos convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET15b, pET23D, pET-22b(+) y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. Las etiquetas de epítipo también se pueden añadir a proteínas recombinantes para proporcionar métodos
10 convenientes de aislamiento, por ejemplo, 6-his. Estos vectores comprenden, además del casete de expresión que contiene la secuencia de codificación, el promotor T7, el iniciador y el terminador de la transcripción, el sitio ori de pBR322, una secuencia de codificación bla y un operador lac1.

Los vectores o plásmidos de expresión se pueden transferir a la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos, tales como transformación con cloruro de calcio para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, fusión liposomal o electroporación para células de mamíferos. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por resistencia a los antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

20 El nivel de expresión de un gen se puede determinar detectando ARNm, proteína o actividad de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm se pueden detectar mediante transferencias de Northern, PCR de transcripción inversa (RT-PCR) o RT-PCR cuantitativa (en ocasiones denominada qPCR en tiempo real). Las técnicas de ese tipo se revisan, por ejemplo, en VanGuilder *et al.* (2008) *Biotechniques* 44: 619 y Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Caister Academic Press (2009). Los niveles de proteína se pueden
25 detectar mediante ensayos basados en anticuerpos, por ejemplo, transferencias de Western o los ELISA. En algunos aspectos, la expresión de la proteína se puede detectar mediante la detección de una etiqueta de proteína unida de forma operativa, por ejemplo, GFP, 6-histina o biotina.

En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación producida de forma recombinante se puede purificar a partir de la célula, por ejemplo, separada de otros componentes celulares, usando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando la enzima de desglicosilación carece de un dominio transmembrana, la enzima generalmente se aísla y se usa por separado de la célula recombinante. En algunos aspectos, la enzima de desglicosilación producida de forma recombinante incluye un dominio transmembrana, y se usa la célula que expresa la enzima de desglicosilación.

35 **V. Composiciones y aplicaciones prebióticas y probióticas**

Como se ha indicado anteriormente, las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente, así como las glicanos libres y/o proteínas desglicosiladas liberadas por las enzimas, se pueden usar con fines nutricionales, profilácticos y terapéuticos.

40 Las enzimas de desglicosilación que se describen en el presente documento pueden estar implicadas en la modulación de la estabilidad de proteínas y el reconocimiento inmunológico de proteínas N-glicosiladas, por ejemplo, en un organismo hospedador. Por ejemplo, el reconocimiento de bacterias Gram-positivas por IgA depende de su glicosilación (Mathias y Corthesy, *J Biol Chem* 286: 17239-17247 (2011)). La señalización intracelular y la activación de NF- κ B del receptor 3 de tipo toll (Sun *et al.*, *J Biol Chem* 281: 11144-11151 (2006)) se modula con N-glicanos. C Las lectinas de tipo C, galectinas y lectinas de tipo Ig que se unen al ácido siálico son mediadores de la respuesta inmunológica y celular que reconocen de forma específica diferentes epítopos en N-glicanos (Varki, *Essentials of glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 2ª Ed pp xxix, 784 p. (2009)). Por consiguiente, las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente se pueden administrar a un individuo, ya sea en forma aislada o expresada de forma recombinante en una célula para modular el reconocimiento inmunológico y/o señalización y/o procesamiento de proteínas glicosiladas.

En algunos aspectos, las composiciones de la invención se administran a aquellos que necesitan estimulación del sistema inmunológico y/o para la estimulación de la resistencia a infecciones bacterianas o por levaduras, por
55 ejemplo, Candidiasis o enfermedades inducidas por bacterias reductoras de sulfato.

Los glicanos producidos por las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente se pueden administrar como una formulación prebiótica (es decir, sin bacterias) o como una formulación de probióticos (es decir, con bacterias deseables, tales como *Bifidobacterias* u otras bacterias de calidad alimentaria). Además, una formulación de probióticos puede incluir células recombinantes (por ejemplo, *Bifidobacterias* u otras bacterias de calidad alimentaria) que expresan una enzima de desglicosilación como se describe en el presente documento.

Los glicanos (u oligosacáridos) producidos por las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente se pueden aislar y usar por separado o de forma individual. Los N-glicanos vienen en una amplia diversidad de estructuras y tamaños, y pueden incluir estructuras complejas de oligosacáridos. Las enzimas de desglicosilación aisladas de bacterias intestinales beneficiosas, tales como *Bifidobacterias*, producen generalmente N-glicanos que

estimulan el crecimiento de las bacterias beneficiosas, así como las proteínas desglicosiladas pues pueden ser diferidas más fácilmente por el hospedador.

Los ejemplos de N-glicanos libres que se pueden usar individualmente o en cualquier combinación son los que figuran en las Tablas en el Ejemplo 8, que describe la composición de N-glicanos liberados a partir de glicoproteínas de leche bovina por la enzima EndoBI-1. los ejemplos adicionales de N-glicanos libres que se pueden usar individualmente o en cualquier combinación son los que se muestran en las Figuras 4 y 5. Los oligosacáridos de leche que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.197.872 y en el documento WO2012/009315 proporcionan ejemplos adicionales.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan composiciones prebióticas o probióticas que comprenden al menos uno de los N-glicanos libres generados por las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente, por ejemplo,

un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex (glucosa, galactosa, o manosa) y 5 restos de HexNAc (GlcNAc o GalNAc);

un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc;

un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuAc (ácido N-acetilneuramínico);

un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 3 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuAc;

un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 3 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuAc;

un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuAc;

un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 1 resto de Fuc (fucosa), 3 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuGc (ácido N-glicolilneuramínico); y

un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 3 restos de HexNAc, y 2 restos de NeuAc.

En algunos aspectos la composición prebiótica o probiótica comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de los N-glicanos libres generados por las enzimas de desglicosilación que se describen por la presente. En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona una composición que comprende N-glicanos libres, en la que dichos N-glicanos líderes se producen poniendo en contacto una enzima de desglicosilación (por ejemplo, una enzima GH18a, GH18b, o GH85) con leche. En algunos aspectos, la composición comprende los N-glicanos libres separados de los componentes restantes de la leche. En algunos aspectos, la composición comprende N-glicanos libres y proteínas de la leche desglicosiladas.

En general, cualquier alimento o bebida que pueda ser consumida por bebés o adultos humanos o animales se puede usar para hacer formulaciones que contengan las composiciones prebióticas y probióticas de ese tipo. Los alimentos a modo de ejemplo incluyen aquellos con una consistencia semilíquida para permitir una dispersión fácil y uniforme de las composiciones prebióticas y probióticas de la divulgación. Sin embargo, otras consistencias (por ejemplo, polvos, líquidos, etc.) también se pueden usar sin limitación. Por consiguiente, dichos alimentos incluyen, pero no se limitan a, productos lácteos tales como queso, requesón, yogur y helados, formulaciones que contienen frutos secos tales como manteca de cacahuete, productos vegetales tales como tofu u otros productos de soja y Formulaciones que contienen luego, por ejemplo, natillas y productos de huevo procesados. Las frutas y verduras procesadas, incluyendo las destinadas a bebés/niños pequeños, tales como salsa de manzana o guisantes y zanahorias triturados, también son adecuadas para usar en combinación con las formulaciones prebióticas y probióticas. Además de los alimentos destinados al consumo humano, los alimentos para animales también se pueden suplementar con las composiciones prebióticas y probióticas de la divulgación.

Las composiciones prebióticas y probióticas también se pueden usar para suplementar una bebida. Los ejemplos de las bebidas de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, fórmula infantil, fórmula de continuación, bebida para niños pequeños, leche, leche de soja, leche fermentada, uno de frutas, bebidas a base de frutas y bebidas deportivas. En la técnica se conocen muchas fórmulas para bebés y niños pequeños y están disponibles en el mercado, incluyendo, por ejemplo, Carnation Good Start (Nestle Nutrition Division; Glendale, Calif.) y Nutrish A/B producida por Mayfield Dairy Farms (Athens, Tenn.). Otros ejemplos de fórmulas para bebés o bebés incluyen las que se desvelan en el documento de patente de Estados Unidos N.º 5.902.617. Otras formulaciones beneficiosas de las composiciones de la presente divulgación incluyen la suplementación de leches animales, tales como la leche de vaca.

Las composiciones prebióticas y probióticas se pueden formular en píldoras o comprimidos o se pueden encapsular en cápsulas tales como cápsulas de gelatina. Las formas de comprimido pueden incluir opcionalmente, por ejemplo, uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, agentes desintegrantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las pastillas para chupar o formas de caramelo pueden comprender las composiciones con un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden las composiciones en una base inerte, tales como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de goma arábica, geles y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica. Las formulaciones prebióticas o probióticas de la invención también pueden contener cargas y agentes de expansión de complementos alimenticios convencionales tales como, por ejemplo, harina de arroz. Se pueden

encontrar formulaciones adecuadas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17ª Ed. (1985).

5 Las dosificaciones de las composiciones prebióticas y probióticas de la presente divulgación variarán dependiendo de los requisitos del individuo y tendrán en cuenta factores tales como edad (infantil frente a adulto), peso y razones para la pérdida de bacterias intestinales beneficiosas (por ejemplo, terapia con antibióticos, quimioterapia, enfermedad o edad). En algunos aspectos, la cantidad administrada a un individuo debería ser suficiente para establecer la colonización del intestino con bacterias beneficiosas a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de los efectos secundarios adversos que puedan acompañar la administración de la composición prebiótica o probiótica que se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el intervalo de dosificación será eficaz como un complemento alimenticio y para restablecer las bacterias beneficiosas en el tracto intestinal.

15 En algunos aspectos, la dosis de los N-glicanos libres puede variar de aproximadamente 1 microgramo/l a aproximadamente 25 gramos/l de galacto-oligosacáridos. En algunos aspectos, la dosis de N-glicanos libres es de aproximadamente 100 microgramos/l a aproximadamente 15 gramos/l. En algunos aspectos, la dosis de N-glicanos libres es de 1 gramo/l a 10 gramos/l. Las dosificaciones a modo de ejemplo de células recombinantes (por ejemplo, *Bifidobacterias*) que expresan las enzimas de desglicosilación que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan, de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (CFU) por dosis, por ejemplo, de 10^6 a 10^{10} CFU por dosis. Los ejemplos de N-glicanos son oligosacáridos de la leche, por ejemplo, de un ser humano (HMO), bovino, u ovino.

25 Las formulaciones prebióticas o probióticas de la divulgación se pueden administrar a cualquier individuo con necesidad de las mismas. En algunos aspectos, el individuo es un bebé o niño pequeño. Por ejemplo, en algunos aspectos, el individuo tiene menos de, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, un año, dos años o tres años. En algunos aspectos, el individuo es un adulto. Por ejemplo, en algunos aspectos, el individuo tiene más de 50, 55, 60, 65, 70 o 75 años. En algunos aspectos, el individuo es inmunodeficiente (por ejemplo, el individuo tiene SIDA o se está sometiendo a quimioterapia).

30 Las *Bifidobacterias* a modo de ejemplo (por ejemplo, *Bifidobacterias* que expresan de manera recombinante una enzima de desglicosilación) que se pueden incluir en las composiciones probióticas de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, *B. longum* bv *infantis*, *B. longum* bv *longum*, *B. breve*, y *B. adolescentis*. El *Bifidobacterium* usado puede depender en parte del consumidor que se tiene como objeto. Por ejemplo, un probiótico de *B. longum* bv *infantis* general se administra a un bebé o niño pequeño (por ejemplo, menor de 5 años de edad). En algunos aspectos, *B. longum* bv *infantis* se incluye en, o en conjunto con, una fórmula infantil o una fórmula de continuación. En algunos aspectos, la composición probiótica se administra a un adulto o una persona mayor. En algunos aspectos, la persona tiene al menos 50, 60, 70 o 80 años de edad. Alguien con experiencia reconocerá que la cepa bacteriana no es fundamental siempre que exprese una enzima de desglicosilación como se describe en el presente documento.

40 Se observará que para algunas aplicaciones puede ser ventajoso incluir otros factores Bifidogénicos en las formulaciones de la presente divulgación. Los componentes adicionales de ese tipo pueden incluir, pero no se limitan a, fructooligosacáridos tales como Raftilosa (Rhone-Poulenc, Cranbury, NJ), inulina (Imperial Holly Corp., Sugar Land, Texas) y Nutraflora (Golden Technologies, Westminster, Colo.), así como lactosa, xilooligosacáridos, soyoligosacáridos, lactulosa/lactitol, entre otros.

50 En algunos aspectos, las composiciones de la invención se administran a un ser humano o animal con necesidad de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran a una persona o animal que tiene al menos una afección seleccionada entre el grupo que consiste en síndrome intestinal inflamatorio, estreñimiento, diarrea, colitis, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, trastorno intestinal funcional (FBD), síndrome del colon irritable (IBS), bacterias reductoras de exceso de sulfato, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), y colitis ulcerosa. El síndrome del intestino irritable (IBS) se caracteriza por dolor abdominal y malestar, hinchazón y función intestinal alterada, estreñimiento y/o diarrea. Hay tres grupos de IBS: IBS con predominio de estreñimiento (C-IBS), IBS alternante (A-IBS) e IBS con predominio de diarrea (D-IBS).

55 VI. Kits

60 Las enzimas de desglicosilación que se describen en el presente documento se pueden incluir como parte de un kit, por ejemplo, para generar glicanos libres y/o polipéptidos desglicosilados. En algunos aspectos, el kit incluye un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación para una enzima de desglicosilación que se describe en el presente documento (por ejemplo, una endoglicosidasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 con una amplia especificidad hacia el sustrato). En algunos aspectos, el kit incluye una célula recombinante que comprende un vector de expresión de ese tipo. En algunos aspectos, el kit incluye la enzima de desglicosilación, por ejemplo, en un tampón o forma liofilizada.

65

En algunos aspectos, el kit incluye un control, por ejemplo, un conjunto de glicanos libres convencionales, glicoproteínas convencionales, proteínas desglicosiladas convencionales, u otra enzima de desglicosilación (por ejemplo, una con una especificidad limitada hacia el sustrato).

- 5 En algunos aspectos, el kit puede incluir componentes para separar glicanos libres y proteínas desglicosiladas, por ejemplo, componentes de separación basados en afinidad con basados en el tamaño tales como reactivos para columnas de centrifugación o reactivos de cromatografía. Cuando las enzimas que se desvelan por la presente se van a usar para generar glicanos libres y/o proteínas desglicosiladas para caracterización adicional, el kit puede incluir adicionalmente tampones para los glicanos libres y/o proteínas desglicosiladas. En algunos aspectos, el kit puede incluir reactivos para caracterización adicional, por ejemplo, gel o reactivos para determinación de tamaño, reactivos para preparación de una muestra para análisis de MALDI, etc.

- 15 En algunos aspectos, el kit se puede usar para generar glicanos libres y/o proteínas desglicosiladas para administración (por ejemplo, como un producto alimentario, agente profiláctico o terapéutico). En esos casos, el kit puede incluir excipientes y/o tampones farmacéuticamente aceptables.

- 20 Los kits de ese tipo también pueden incluir reactivos convencionales para técnicas recombinantes, por ejemplo, vector de expresión, medios, tampones, etc. A menudo los kits también incluyen instrucciones para usar los componentes de los kits, por ejemplo, para condiciones de desglicosilación dependientes de una aplicación óptima. El kit también puede incluir consumibles, tales como tubos, pipetas, y/o material de vidrio para llevar a cabo los métodos de la invención.

- 25 Se entiende que los ejemplos y realizaciones que se describen en el presente documento son solamente para fines ilustrativos.

VII. Ejemplos

A. Ejemplo 1. Los aislados infantiles de bifidobacterias presentan actividad de endo-N-acetilglucosaminidasa

- 30 La ribonucleasa B bovina (ARNsaB) es una glicoproteína de 17 kD que contiene un sitio de glicosilación, compuesto por glicanos unidos a N con alto contenido de manosa. La escisión por endoglicosidasas da como resultado una molécula de 14 kDa. Las incubaciones durante la noche de aislados bifidobacterianos con ARNsaB sugirieron que la actividad de endoglicosidasa está presente solo en algunos aislados. Ninguna de las cepas de *B. bifidum* examinadas mostró este fenotipo, y las cepas de *B. infantis* degradaron débilmente la ARNsaB. La incubación de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis* con 5 mg/ml de ARNsaB condujo a una desglicosilación gradual de esta glicoproteína a lo largo del tiempo (Figura 1A). Ciertos aislados de *B. breve* tales como KA179 y JCM7019, desglicosilaron la ARNsaB completamente (Figura 1B-D).

- 40 Distribución de secuencias genéticas de endo-N-acetilglucosaminidasa en bifidobacterias. Las secuencias de proteínas de las endo-N-acetilglucosaminidasas encontradas en los genomas secuenciados de *Bifidobacterium* se alinearon y se diseñaron cebadores degenerados para amplificar las regiones conservadas (véanse las Tablas 1-3). Los productos de la PCR de 77 aislados de *Bifidobacterias* (Tabla 4) se secuenciaron, y las secuencias genéticas completas se determinaron usando un enfoque de ADN en avance. Varios aislados codificaron proteínas que pertenecían a la familia 18 (GH18) u 85 (GH85) de glicohidroasa. Todas las cepas que contenían una de estas secuencias también escindieron la ARNsaB *in vitro*, y las cepas que carecen de dichos genes no mostraron actividad de endoglicosidasa, lo que indica que las enzimas de tipo GH18 o GH85 fueron responsables de la escisión observada en la RNasaB.

- 50 Un árbol filogenético (Figura 1D) clasificó estas secuencias de proteínas en tres tipos. Un grupo se encontró exclusivamente en cepas de *B. infantis*, incluyendo la secuencia encontrada en la cepa ATCC 15697 (denominada GH18a), que está relacionada con EndoE. Otro grupo de secuencias contenidas en cepas de *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* también pertenecen a la familia GH18, pero con solo una similitud de un 60 % con GH18a, se denominó GH18b. Las secuencias pertenecientes a GH85 se encontraron casi exclusivamente en aislamientos de *B. breve*. Los alineamientos múltiples revelaron un alto grado de conservación del sitio activo propuesto para cada familia de glicosidasas (Tabla 1). El paisaje genómico de estos genes también apoya su vinculación con el consumo de glucanos. El gen de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis*, Blon_2468, está en un grupo de genes que también contiene un sistema de fosfotransferasa (PTS) específico para N-acetilglucosamina (Figura 2). BLIF_1310 en la cepa 157F de *B. infantis* (GH18b), y BLD_0197 en la cepa DJO10A de *B. longum* (GH85) están ubicados cerca de los transportadores de ABC que se predice que importan oligosacáridos y dos o tres α -manosidasas (Figura 2).

- 60 **B. Ejemplo 2: Propiedades enzimáticas de endo-N-acetilglucosaminidasas bifidobacterianas**

- Basándose en los alineamientos de secuencias (Figura 1D), un gen representativo de cada grupo se clonó, se expresó y se purificó en *E. coli*. Las endo-p-N-acetilglucosaminidasas de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis* (EndoBI-1), SC142 de *B. infantis* (EndoBI-2), y *B. breve* (EndoBB) presentaban una actividad glicolítica máxima a pH 5,0 y temperaturas óptimas que variaban de 37 a 45 °C. Una propiedad interesante de EndoBI-1 y EndoBI-2 era que

su actividad no se vio alterada de forma significativa por incubación a 95 °C durante 5 minutos, lo que sugiere que son enzimas resistentes al calor (Figura 3A).

Propiedades de EndoBI-1, EndoBI-2 y EndoBB

	EndoBI-1	EndoBI-2	EndoBB
Familia	GH18	GH18	GH85
PM Calculado (proteína recombinante)	47 kDa	47 kDa	98 kDa
Dominios transmembrana	2	2	1
pH óptimo	5,0	5,0	5,0
Temperatura óptima	37-45 °C	37-45 °C	30-45 °C
Resistencia al calor	Si	Si	No

5 La lactoferrina humana (hLF) contiene núcleos de N-glicanos complejos fucosilados, predominantemente en dos glicositos (Yu *et al.*, *Glycobiology* 21: 206-224 (2011)). La lactoferrina bovina (bLF) representa una fracción menor de la leche bovina, y contiene glicanos unidos a N con alto contenido de manosa e híbridos en cinco glicositos (Nwosu *et al.*, *J Proteome Res* 10: 2612-2624 (2011)). Las incubaciones durante la noche de bLF y hLF con las tres endoglicosidasas de *Bifidobacterium* indicaron que todas ellas eran capaces de escindir bLF, como se observó por cambios discretos en el PM en geles de SDS-PAGE (Figura 3B). EndoBI-1 y EndoBI-2 escindieron hLF (Figura 3C).

C. Ejemplo 3: EndoBI-1 escinde el núcleo de la quitobase en N-glicanos de alto contenido de manosa y complejos

15 Las Figuras 4 y 5 muestran datos de espectrometría de masas (MALDI) de N-glicanos liberados de diversas N-glicoproteínas por EndoBI-1. La Figura 4 muestra los resultados de (A) bLF, (B) hLF y (C) IgA, mientras que la Figura 5 muestra los resultados de (A) ARNsA, (B) IgG, (C) hLF en modo negativo y (D) IgA en modo negativo.

D. Ejemplo 4: EndoBI-1 se une de forma específica al núcleo de glicanos unidos a N

20 El sitio activo conservado en las enzimas GH18 incluye un motivo D-X-E, en el que se ha informado que D y E son necesarios para la actividad. La Asp184 en EndoBI-1 se mutó mediante mutagénesis dirigida al sitio en Asn184 (D184N de EndoBI-1 mut o EndoBI-1). La enzima mutante se unió de forma específica al núcleo de N-glicanos, Man₃GlcNAc₂ en una matriz de glicanos de mamíferos (Figura 6A). La D184N de EndoBI-1 también mostró una unión significativa con el pentasacárido fucosilado en α 1-6, característico de las glucoproteínas unidas a N humanas. Cuando las cantidades equimolares de ARNsA, bLF y hLF se revistieron en placas de micropocillos, tanto la D184N tanto de EndoBI-1 como de EndoBI-1 mostró una unión significativa a estas proteínas en comparación con los controles no glicosilados (Figura 6B).

E. Ejemplo 5: EndoBI-1 tiene actividad en glicoproteínas de leche humana.

30 La leche materna es un fluido complejo, caracterizado por diversos tipos y altas cantidades de proteínas Unidas a N, unidas a O y no glicosiladas. La incubación durante la noche de una muestra de leche materna recién obtenida con EndoBI-1 o PNGaseF produjo un cambio en el peso molecular de la lactoferrina principalmente (Figura 7A). No se observó ningún cambio cuando la muestra de leche se incubó con D184N de EndoBI-1. En un experimento paralelo, la cantidad total de glicanos unidos a N, calculada como la cantidad de α -manosa detectada por Concanavalina A conjugada a FITC (ConA-FITC), se determinó en muestras de leche digerida. EndoBI-1 y PNGaseF, pero no D184N de EndoBI, disminuyó de forma significativa la cantidad de α -manosa en la leche materna (Figura 7B), lo que indica una amplia retirada de glicanos unidos a N.

F. Ejemplo 6: Impacto de hLF y bLF en la expresión del gen de *B. infantis*

45 La cepa ATCC 15697 de *B. infantis* en presencia de bLF o hLF reveló un aumento en la expresión de Blon_2468 (EndoBI-1), en comparación con las células cultivadas con glucosa. Sin embargo, el nivel de expresión fue similar al de las células cultivadas con lactosa (Figura 8). bLF y hLF dieron como resultado una mayor expresión de otros genes adyacentes a Blon_2468 (EndoBI-1- véase la Figura 2), incluyendo Blon_2470 y Blon_2471, que codifican parte de un sistema PTS específico para GlcNAc, (Figura 9A). Una tendencia similar se observó para los genes Blon_0177 y Blon_0178, también asociados a los sistemas de PTS en *B. infantis*. Otros genes inducidos por estas glicoproteínas fueron Blon_0881 y, en menor grado, Blon_0882, enzimas fundamentales que participan en el metabolismo de GlcNAc y ácido siálico. Los supuestos genes en *B. infantis* asociados con el metabolismo de la manosa (Blon_2380, proteína de unión a soluto para mano-oligosacáridos, y Blon_0868 y Blon_0869, α -manosidasas) no se vieron afectados por la presencia de bLF o hLF. Por el contrario, varios genes asociados a la importación y el consumo de oligosacáridos de la leche humana en *B. infantis* fueron inducidos de forma significativa por hLF y, en menor medida, por bLF (Figura 9B). En general, la mayor inducción se observó después de 1 hora.

Estos genes incluyen Blon_2344, Blon_2347, Blon_0883 y Blon_2177, proteínas de unión a solutos que unen diferentes clases de HMO asociados a transportadores de ABC, así como Blon_2335 y Blon_2336, dos fucosidasas fundamentales en el genoma de *B. infantis*.

5 G. Ejemplo 7: Uso de glicanos liberados.

Las bacterias que expresan enzimas GH18, tales como *E. faecalis*, *S. pyogenes*, y *Capnocytophaga canimorsus* pueden usar diversas pueden usar diversas glicoproteínas como fuente de carbono. Además, EndoS de *S. pyogenes*, desglicosila la IgG de forma específica, perjudicando gravemente la reacción inmunológica con respecto a las bacterias y aumentando su supervivencia en la sangre. Los aislados de *Bifidobacterium* pueden crecer bien en glicanos unidos a N como una fuente principal de carbono. Como se muestra en la Figura 10, la cepa KA179 de *B. breve* y la cepa JCM7019 de *B. breve* mostraron un crecimiento mínimo usando 10 mg/ml de ARNsaB.

15 H. Ejemplo 8: EndoBI-1 tiene actividad en glicoproteínas de la leche bovina

EndoBI-1, la enzima GH18 expresada por la cepa 15697 de la ATCC de *B. infantis* (Blon_2468), se sometió a ensayo para su actividad en glicoproteínas leche bovina usando muestras de una lechería local. La composición de N-glicanos liberados se determinó mediante Nano-LC (cromatografía líquida) Q-TOF (tiempo de vuelo cuadrupolo), y se muestran las tablas que siguen a continuación. Los N-glicanos se caracterizaron como sigue a continuación:

- Hex: Glucosa, galactosa, o manosa
- Fuc: Fucosa
- NeuAc: Ácido N-acetilneuramínico
- NeuGc: Ácido N-glicolilneuramínico

25

Muestra 1 de leche bovina

Compuesto	Masa	Tiempo de retención	Volumen (máximo)	Hex	Fuc	HexNAc	NeuAc	NeuGc
1	1437,51	11,547	31856	5	0	3	0	0
2	1437,51	12,212	57092	5	0	3	0	0
3	1031,35	14,304	63882	5	0	1	0	0
4	1519,57	14,913	160198	3	0	5	0	0
5	1478,54	15,505	73266	4	0	4	0	0
6	1519,57	15,727	276803	3	0	5	0	0
7	1728,61	15,907	24540	5	0	3	1	0
8	1478,54	16,345	203480	4	0	4	0	0
9	1687,58	16,809	57655	6	0	2	1	0
10	1437,52	16,956	88016	5	0	3	0	0
11	1810,67	18,249	59921	3	0	5	1	0
12	1810,67	19,062	166554	3	0	5	1	0
13	1769,64	19,492	255565	4	0	4	1	0
14	1769,64	19,823	48888	4	0	4	1	0
15	1728,61	20,047	194087	5	0	3	1	0
16	1769,64	20,163	429713	4	0	4	1	0
17	1728,61	20,792	551414	5	0	3	1	0
18	1421,55	28,295	127956	4	1	3	0	0
19	1745,64	28,445	76358	6	1	3	0	0

ES 2 728 453 T3

(continuación)

Compuesto	Masa	Tiempo de retención	Volumen (máximo)	Hex	Fuc	HexNAc	NeuAc	NeuGc
20	1728,67	33,518	79818	5	0	3	1	0
21	1566,61	49,239	285443	4	0	3	1	0

Muestra 2 de leche bovina

Compuesto	Masa	Tiempo de retención	Volumen (máximo)	Hex	Fuc	HexNAc	NeuAc	NeuGc
1	1519,58	14,817	44196	3	0	5	0	0
2	1478,55	15,4	19365	4	0	4	0	0
3	1519,58	15,644	122126	3	0	5	0	0
4	1478,55	16,233	68580	4	0	4	0	0
5	1437,53	16,833	44391	5	0	3	0	0
6	1687,59	16,988	26907	6	0	2	1	0
7	1810,68	18,351	136099	3	0	5	1	0
8	1769,65	18,894	57851	4	0	4	1	0
9	1810,68	19,075	243243	3	0	5	1	0
10	1769,65	19,453	570306	4	0	4	1	0
11	1728,62	20,006	391845	5	0	3	1	0
12	1769,65	20,115	2E+06	4	0	4	1	0
13	1744,62	20,729	82204	5	0	3	0	1
14	1728,62	20,761	3E+06	5	0	3	1	0
15	1890,68	22,574	54025	5	1	3	0	1
16	1890,68	23,261	249499	5	1	3	0	1
17	1769,65	23,571	152940	4	0	4	1	0
18	2051,71	24,02	167688	5	0	3	0	2
19	2035,71	24,096	157601	5	0	3	1	1
20	2019,72	24,227	296020	5	0	3	2	0
21	2051,71	24,364	200140	5	0	3	0	2
22	2035,72	24,432	115802	5	0	3	1	1
23	2019,72	24,47	104626	5	0	3	2	0
24	2019,72	24,743	246864	5	0	3	2	0

- 5 Los resultados muestran que N-glicano el primario producido en las muestras 1 y 2 comprende 5 restos de Hex, 3 restos de HexNAc, y 1 resto de NeuAc (compuestos 17 y que 14, respectivamente). Sin embargo, cada uno de los glicanos libres producidos por la enzima de desglicosilación se puede usar sólo o en combinación para composiciones prebióticas o probióticas, por ejemplo, para mejorar la salud del intestino o para aumentar el crecimiento de bifidobacterias. La reacción de desglicosilación como resultado una riqueza de glicanos libres, así como proteínas de la leche desglicosiladas que se pueden digerir más fácilmente. Los resultados muestran que una enzima producida por *B. infantis* puede actuar sobre la leche de múltiples organismos para producir glicanos libres.
- 10

I. Sumario

Las endoglicosidasas GH18 y GH85 escinden de forma específica el núcleo de *N-N*-diacetilquitobiosa de glicanos unidos a N. EndoBI-1 y EndoBI-2 son representativas de los clados de secuencias de GH18 encontrados en bifidobacterias (Figura ID). Aunque sus secuencias de aminoácidos solamente son idénticas en un 60 % y tenían diferentes contextos genéticos (Figura 2), compartían un sitio activo conservado, y actuaban en lactoferrina bovina y humana.

La especificidad de las endoglicosidasas las más conocidas se limita a glicanos de alto contenido de manosa (por ejemplo, EndoH). EndoS actúa únicamente sobre IgG. Las endoglicosidasas F1, F2 y F3 muestran una preferencia para cualquiera de los oligosacáridos de alto contenido de manosa o complejos, pero no ambos. Por el contrario, EndoBI-1 mostró una amplia especificidad de sustrato, liberando N-glicanos de IgA, IgG, RNasa B humanas y fetuina bovina, así como leche humana (Figuras 4, 5, y 7). Cada una de estas proteínas tiene un tipo de N-glicosilación única, lo que sugiere que EndoBI-1 puede escindir los N-glicanos de alto contenido de manosa, híbridos o complejos que contienen núcleo de en fucosilación α 1-6, fucosilación de polilactosamina en α 1-3, y sialilación terminal.

Las enzimas de desglucosilación que se desvelan por la presente retuvieron su actividad después de la incubación a 95 °C durante 5 minutos. Esta propiedad permite la desnaturalización del sustrato de glicoproteína para un mayor acceso a los sitios glicosilados y una mayor actividad. Además, las Bifidobacterias ya están designadas GRAS por la FDA, por lo que las enzimas se pueden expresar de forma recombinante en estas bacterias para aplicaciones de probióticos. A diferencia de PNGasaF, EndoBI-1 escinde un GlcNAc residual unido a la asparagina de la proteína, que puede ser útil para la determinación de glicosito en aplicaciones de glucoproteómica.

En este estudio varias bifidobacterias poseían una enzima GH85. EndoBB (BLD_0197) de la cepa DJO10A de *B. longum* escindió los glicanos de alto contenido de manosa, escindiendo ARNsaB y bLF, pero no hLF. La función de las endoglicosidasas GH85 en estos aislados de *B. breve* puede estar asociada a β -galactosidasas, β -hexosaminidasas y α -sialidasas. La presencia de α -manosidasas y un importador de ABC para oligosacáridos cerca de estos genes indican una función relacionada, y que estos grupos pueden ser activos en oligosacáridos obtenidos a partir de plantas.

La EndoBI-1 de endoglicosidasa en ATCC 15697 de *B. infantis* se expresó de forma constitutiva durante la coincubación con lactoferrina bovina y humana. Las cepas de *B. infantis* pueden usar HMO como única fuente de carbono (Locascio *et al.*, Microb Biotechnol 2: 333-342 (2009)). Los genes inducidos por HMO en *B. infantis*, tales como proteínas de unión a solutos y α -fucosidasas (Garrido *et al.*, PLoS One 6:e17315 (2011); Sela *et al.*, Applied and Environmental Microbiology (2011)), también se de forma positiva por hLF y bLF (Figura 9), lo que sugiere que las respuestas bacterianas a estos componentes de la leche están en parte corregidas.

J. Materiales y métodos

Bacterias y medios. Las cepas de *Bifidobacterium* usadas en este estudio se enumeran en la Tabla 4. para experimentos de rutina, las bifidobacterias se cultivaron en caldo de cultivo de Mann-Rogose-Sharp sin fuente de carbono (mMRS), suplementado con L-cisteína al 0,05 % en p/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y lactosa al 2 %. El medio de Zhang-Mills-Block (ZMB-1) se usó para evaluación del crecimiento bacteriano en glicoproteínas o análisis transcripcionales. Las se cultivaron de forma anaeróbica en una cámara de vinilo (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI) a 37 °C durante 24 h. Las células BL21 Star y Top10 de *Escherichia coli* competentes eran de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las células de *E. coli* transformantes se cultivaron en Caldo de Cultivo Luria con 50 μ g/ml de Carbenicilina (Teknova, Hollister CA) cuando era necesario a 37 °C.

Incubaciones de bifidobacterias con glicoproteínas. Los aislados de bifidobacterias se cultivaron en 2 ml de mMRS con lactosa al 2 % a la fase exponencial media-tardía. Los cultivos se centrifugaron durante 1 min a 12000 rpm, y se volvieron a suspender en 2 ml de mMRS suplementado con 5 mg/ml de ribonucleasa B de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las incubaciones se desarrollaron durante 18 horas, y los sobrenadante se recuperaron después de centrifugación durante 1 min a 12000 rpm. Una dilución a 1:10 de cada sobrenadante se les naturalizó en tampón de desnaturalización de glicoproteínas (SDS al 0,5 % y DTT 40 mM) y se analizó sobre geles de SDS-PAGE fundidos previamente al 4-15 % (Bio-Rad, Carlsbad CA). El crecimiento de bacterias específicas también se analizó en placas de 96 pocillos que contenían 200 μ l de medio ZMB-1 y 10 mg/ml de ARNsaB, o 5 mg/ml de lactoferrina de leche humana (Sigma) y lactoferrina de leche bovina (Sigma). Los cultivos se inocularon a un 2 % y crecieron durante 72 h en un lector de microplacas PowerWave (BioTek Instruments, Inc., Winoosky, VT), en condiciones anaerobias. El crecimiento se monitorizó usando Gen5 1.10 (BioTek). Los cultivos crecieron por triplicado, y los controles que no contenían glicoproteína y no contenían bacterias se incluyeron y se arrestaron de los valores de la DO600.

Determinaciones de secuencia de endoglicosidasa. Las secuencias de codificación de proteína que pertenecen a GH18 encontradas en los que genomas de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis* (Blon_2468), 157F *B. infantis* (BLIF_1310, y OG1RF de *Enterococcus faecalis* (EndoEa) se alinearon usando MUSCLE. Las regiones conservadas

se seleccionaron y se convirtieron en ADN para diseñar cebadores degenerados (Tabla S2). Un enfoque similar se usó consecuencias que codificaban enzimas GH85, encontradas en las secuencias genómicas publicadas de la cepa DJO10A de *B. longum* (BLD_0197), NCC2703 de *B. longum* (BL1335) y UCC2003 de *B. breve*.

5 El ADN genómico se preparó a partir de cultivos durante la noche en MRS para cada cepa usada en este estudio usando el Kit de Sangre y Tejido DNeasy (Qiagen, Valencia CA). 50 µl de reacciones de PCR contenían 1 U de ADN polimerasa Phusion (Finnzymes, Vantaa, Finlandia), 1 ng de ADN, 0,2 mM de dNTPs y 0,5 µM de cada cebador degenerado (Tabla S2), y se desarrollaron en un aparato PTC200 Thermo Cycler (MJ Research, Ramsey, MN). El programa de PCR incluía una desnaturalización inicial a 98 °C durante 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C
10 30 s, hibridación a 55 °C durante 90 s, extensión a 72 °C durante 2 min, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de producto de PCR Qiaquick (Qiagen), y secuenciaron en las instalaciones de secuenciación de ADN de UC Davis. Las secuencias de GH18 se analizaron usando BioEdit 7.1.3, y posteriormente se expandieron y se determinaron totalmente usando el Kit DNA Walking SpeedUp Premix (Seegene, Rockville MD), y los cebadores TSP142 que se enumeran en la Tabla 3. Las secuencias
15 de GH85 se determinaron directamente usando los cebadores GH85cF y GH85cR.

Análisis bioinformáticos. La base de datos de Integrated Microbial Genomes (IMG) (Markowitz *et al.* (2006) Nuc. Acid Res. 34: 344-388) se usó para encontrar las secuencias de proteínas de GH18 y GH85 en genomas de *Bifidobacterium* y para determinar los paisajes genéticos para los genes de tipo GH18 y de tipo GH85 encontrados
20 en los genomas de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis*, 157F de *B. infantis* y DJO10A de *B. longum*. Se realizaron múltiples alineamientos de secuencias usando MUSCLE, usando el algoritmo de Probabilidad Máxima en MEGA v 5.0.

Clonación y expresión genética. El ADN genómico de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis*, SC142 de *B. infantis* y DJO10A de *B. longum* se amplificó con los cebadores de clonación indicados en la Tabla 3, teniendo como objetivo las secuencias de GH18 o GH85. Los péptido señal y los dominios transmembrana se omitieron en esta
25 amplificación para facilitar la expresión de proteína en, y la purificación de, reacciones de PCR de *E. coli* que contenían 0,5 µM de cada cebador, 1 ng de ADN, dNTPs 0,2 mM (Fermentas, Glen Burnie, MD), y 2 U de ADN polimerasa Phusion (Finnzymes, Vantaa, Finlandia) en un volumen final de 150 µl. La PCR se realizó en un aparato PTC200 Thermo Cycler, usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98 °C durante 2 min, 35 ciclos de
30 desnaturalización a 98 °C durante 30 s, hibridación a 58 °C durante 90 s, extensión a 72 °C 2 min, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR se purificaron en gel (Kit de Extracción en Gel Qiaquick). La inducción se realizó con IPTG 0,5 mM a 28 °C (EndoBI-1, EndoBI-2 y EndoBI-1mut), o con IPTG 1 mM a 37 °C (EndoBB). Las proteínas se concentraron usando columnas de 4 ml Ultra 30 kDa de Amicon, y el campo se
35 intercambió por citrato de sodio salino IX usando Bio-Gel P-30 en columnas de Tampón de SSC.

Digestión de glicoproteína por endoglicosidasas bifidobacterianas. Las condiciones óptimas de reacción para las endoglicosidasas EndoBI-1, EndoBI-2 y EndoBB se determinaron por incubación con ARNsaB. Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 µl e incluían 4 µg de ARNsa B, 1 µg de cada enzima y 4 µl de Na₂HPO₄ 0,2 M con valores de pH entre 5,0 y 7,0 a 37 °C. Las reacciones se desarrollaron durante 1 h, se detuvieron con Na₂CO₃ 1 M, se trataron con el tampón desnaturalizante como se ha mencionado anteriormente y se cargaron en geles de SDS de poliacrilamida fundidos previamente al 4-15 %. La temperatura de reacción óptima se determina a cada pH
40 óptimo respectivo, y las reacciones se realizaron a 4°, 30°, 37°, 45°, 55° y 65 °C durante 1 h. La resistencia al calor se evaluó mediante incubación de cada glicosidasa a 95 °C durante 1, 5 y 30 min, y a continuación se llevaron a cabo reacciones enzimáticas en condiciones óptimas. Las digestiones de la lactoferrina humana y bovina (Sigma) se realizaron en condiciones óptimas usando 4 µg de cada glicoproteína y se incubaron durante 18 h con 1 µg de cada endoglicosidasa, o 1 µl de péptido sin glicerol:N-glicosidasa F (500 U/µl de PNGasaF; New England Biolabs, Ipswich, MA). Por último se incubaron 20 µl de una muestra de leche de mama recién obtenida en Na₂HPO₄ 20 mM a pH 5,0 durante 18 h con 10 µg de EndoBI-1, 10 µg de EndoBI-1 mut o 1 µl de PNGasaF en condiciones óptimas. Las
50 digestiones de lactoferrina y leche humana se evaluaron geles de SDS-PAGE fundidos previamente al 7,5 % en condiciones desnaturalizan... todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

Espectrometría de masas

55 **Mutagénesis dirigida al sitio.** Un plásmido que contenía Blon_2468 (con secuencia señal y dominios transmembrana con delección) se volvieron a sintetizar con los cebadores mutagénicos AmpR y 2468mutF (Tabla S2) usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de mutación múltiple Change-IT (USB Corporation, Santa Clara CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos mutados se clonaron en células competentes Top10 (Invitrogen), y después de verificar la mutación apropiada, se transformaron en células competentes BL21. EndoBI-
60 lmut se purificó como se ha descrito en la sección previa, con inducción llevada a cabo con IPTG 0,5 mM a 28 °C durante 6 h.

Análisis de matriz de glicano. La cepa D184N de EndoBI-1 purificada (100 µg/ml, 200 µl), se analizó a la unión de glicanos por el Consortium for Functional Glycomics usando la Matriz Impresa de Mamífero v5.0. los protocolos están disponibles en la página web de functionalglycomics.org. La detección se realizó usando un anticuerpo Anti-His-FITC (Invitrogen).

Expresión genética de *B. infantis*. Las células de *B. infantis* crecieron en medio ZMB-1 con lactosa al 2 % cómo se ha descrito anteriormente. Seis ml de un cultivo exponencial (DO_{405} 0,8-1) se centrifugaron durante 1 min a 12000 x g, y se volvieron a suspender inmediatamente en 5 ml de ZMB-1 calentado previamente suplementado con cualquiera de lactoferrina humana o lactoferrina bobina (5 mg/ml). los cultivos se devolvieron rápidamente a las condiciones anaerobias, y 1 ml de cada cultivo se tomó por vía anaerobia cada hora. Un ml del cultivo original cultivado sobre lactosa ($t = 0$), y en puntos temporales cada hora incubaciones con bLF o hLF ($t = 1-3$ h), se centrifugaron a 12000 x g durante 1 min, y el sedimento se volvió suspender en 1 ml de ARNlater (Ambion, Austin, TX). El experimento se realizó por duplicado. Las suspensiones celulares se almacenaron durante la noche a 4 °C y a continuación a -80 °C hasta su uso. La extracción del ADN, comprobación de calidad y conversión en ADNc se realizaron tal como en Garrido *et al.* (2011) PLoS One e17315. La cuantificación relativa para los genes enumerados en la Tabla 3 se realizó Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) y usando la Mezcla Maestra Verde Fast Sybr (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción fueron las que recomendó el fabricante usando 0,5 μ M de cada cebador. Los cebadores para qPCR se diseñaron usando la herramienta de diseño de cebadores de NCBI, comprobando la especificidad a lo largo del genoma de la cepa ATCC 15697 de *B. infantis* (Tabla 3).

Ensayos de fluorescencia. La unión de D184N de EndoBI-1 y EndoBI-1 a glicoproteínas se determinó después de revestimiento durante la noche en placas de microtitulación de 96 pocillos de 20 μ moles de ARNsAb, bLF, hLF o BSA en tampón PBS a temperatura ambiente. el experimento se realizó por triplicado. Los pocillos se lavaron con PBS tres veces, y se bloquearon después de incubación con BSA al 3 % a TA durante 1 h. Diez μ moles de D184N de EndoBI-1, EndoBI-1 y BSA se añadieron a los pocillos y se incubó durante 2 h a 37 °C en tampón PBS ajustado a pH 5,0. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05 %, y se incubó durante 1 h con una dilución a 1:500 de anticuerpo FITC-Anti-His(C-term) (Invitrogen). Después de 4 lavados con PBS-Tween, la fluorescencia se monitorizó en un lector de Microplacas Synergy2 (Biotek), a 485/530 nm de emisión/excitación. En otro conjunto de experimentos, las muestras de leche recién obtenida se incubaron durante la noche con de EndoBI-1, D184N EndoBI-1 o PNGasaF como se ha descrito anteriormente y se revistieron durante la noche en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de lavar tres veces con tampón PBS, los oficios se incubaron con una dilución a 1:500 de 5mg/ml de Concavalina A etiquetada con fluoresceína (Vector labs, Burlingame CA) durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-Tween 20 al 0,05 %, y se hizo la lectura de la fluorescencia como se ha descrito anteriormente. El experimento se repitió dos veces.

Tabla 1: Alineamiento de subsecuencias de dominio extracelular para enzimas GH18 (SEQ IDNOs: 7-20)

<i>B. infantis</i> ATCC 15697	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS (EndoBl-1)	199
<i>B. infantis</i> ATCC 15702	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> ATCC 17930	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> JCM 11346	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> JCM7007	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> JCM7009	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> JCM7011	150	TESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHFNDADVKIS	199
<i>B. infantis</i> 157F	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS	169
<i>B. infantis</i> SC142	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS (EndoBl-2)	169
<i>B. infantis</i> SC143	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS	169
<i>B. longum</i> SC116	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS	169
<i>B. longum</i> SC630	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS	169
<i>B. longum</i> SC706	120	NVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDMETFPDAAQVAIS	169
EndoE	152	AGTTTPEAEFDAYAKELLTKFYDDLGLDGLDIDMETRPSEKDIVLSN	201

Tabla 2: Alineamiento de subsecuencias de dominio extracelular para enzimas GH85 (SEQ IDNOs: 21-31)

<i>B. breve</i> SC95	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> JCM1273	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> JCM7019	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> JCM7020	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> KA179	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> SC139	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> SC506	150	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	199
<i>B. breve</i> SC568	120	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	169
<i>B. longum</i> DJO10A	120	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK (EndoBB)	169
<i>B. breve</i> UCC2003	120	SDGSFPVADKLVVATTYGFDFGWFINQETEGENETSLGADYATKMGAFIAYLKK	169
EndoD	287	ADGSFPIARKLYDMAKYYGVDGFEINQETIGDLVKPLQE---KMRQFMLYSKE	336

Tabla 3: Cebadores

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
a) Cebadores degenerados (SEQ ID NOs :32-35)	
GH85degF	TAYTGGCARTAYGTNGAY
GH85degr	CCAYTTYTCRTCRTCCTC
GH18degF	CTNGAYATHGAYATGGAR
GH18degR	NGANCCRTAYTYGTGRTA
b) ADN en avance (SEQ ID NOs: 36-41)	
TSP142-5F1	CAACCGAGGTCATGTACGTT
TSP142-5F2	CGTAATCGCTCTTGAGCTTGTC
TSP142-5F3	ACTGGGAACGTAGCTGAACA
TSP142-5R1	AACGTACATGACCTCGGTTG
TSP142-5R2	CACGATGTTCTTTACGACACC
TSP142-5R3	GACACCAATGGCAGCTACACTG
c) Clonación de endoglicosidasas bifidobacterianas (SEQ ID NOs: 42-47)	
2468F11	CACCATGAATGCGGACGCCGTTTCTCCGAC
2468R11	GCCGGTCGCACTCAGTTGCTTCGG
142cF	CACCATGGTTGCGAACGCCAGGAGGGGGA
142cR	CGCCGCGTTTCTGGCCGTGGTCA
GH85cF	CACCATGACCAAGTACACGATCACACCGGAG
GH85cR	GGTACGTGGCGCAGACGGCGCGATCCTC
d) Mutagénesis dirigida al sitio (SEQ ID NO: 48)	
2468mutP	(PO4)-GATATCGACATGCAGGCGCACCCGAAT
e) qPCR (SEQ ID NOs: 49-82)	
Blon0393qF	TTCACCGAGGCGTACAACA
Blon0393qR	CGCATCCGTGACCACATAG
Blon2468qF	ACAGAGCCACCCCTGCGATG
Blon2468qR	GCCGGTTCCGACGCCAGATT
Blon2470qF	CACGATGCTGGTGAGTGC
Blon2470qR	CCGGAACCGGTAAGATCC

(continuación)

e) qPCR (SEQ ID NOS: 49-82)	
Blon2471qF	ACAACCGTTTCAGCAAGACC
Blon2471qR	GAGCAGACGGTTGAAGAAGG
Blon2472qF	ATGATCGCCGTCACGATATT
Blon2472qR	GAACATCAGCAGGGAGAAGC
Blon0177qF	TCCGGTCGGCATTACGCAC
Blon0177qR	GGCAACGGTCTCGGCGTTGT
Blon0178qF	TGGTCTGCGCACGCTGAAGG
Blon0178qR	GGCACCTCGGCCATCACACC
Blon0881qF	GGCCACGTCGGCTTCAACGA
Blon0881qR	GAACGCCAGCAGCAGAGGT
Blon0882qF	TCGTTTCCC GCGTGACCACG
Blon0882qR	CCACGTAGCCGGGGGTCAGA
Blon0883qF	ATCGAAGCCGTGTGGATT
Blon0883qR	CCTCGTTGTAGGCGTCGTA
Blon0868qF	ACAGCTCGCGGTGGAGTCCT
Blon0868qR	TCCAGCGGCTTGCCTTTCGG
Blon0869qF	GCAGCAGCGTGTCAAACCGC
Blon0869qR	GCCGGGAACGCGGAAAGGTT
Blon2335qF	CCTGTTCAACCAGGATGAGTC
Blon2335qR	CCGTCCACGACGAAGTAG
Blon2336qF	ATCACGCTCACCTCCC
Blon2336qR	ACATCGTCGAAGCGGAGT
Blon2177qF	GGTTCCTGAGGTCTTCACCA
Blon2177qR	GCCGAGCTTCTCAAATTCA
Blon2344qF	TCAAGAAGCTCGACCCGTTG
Blon2344qR	TTGGCGTAGAAGCCGTATGT
Blon2347qF	AAGCCGATAGTTCTCCCT
Blon2347qR	TCGCCTTGGTGTACTTGTCT

Tabla 4: Cepas bacterianas

Código	Identificación	Información adicional de la cepa	Fuente	presente gen GH	Actividad de Endoglicosidasa [§]
ATCC15697	<i>B. longum subsp. infantis</i>	JCM1222; DSM20088	Intestino de bebé	GH18a	Si
ATCC25962	<i>B. longum subsp. infantis</i>	JCM1210; DSM20223	Intestino de bebé	-	No
ATCC17930	<i>B. longum subsp. infantis</i>	JCM1260; DSM20218	Heces de bebé	GH18a	Si
ATCC15702	<i>B. longum subsp. infantis</i>	JCM1272; DSM20090	Intestino de bebé	GH18a	Si
JCM7007	<i>B. longum subsp. infantis</i>	LMG18901	Heces de bebé	GH18a	Si

ES 2 728 453 T3

(continuación)

Código	Identificación	Información adicional de la cepa	Fuente	presente gen GH	Actividad de Endoglicosidasa [§]
JCM7009	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	LMG18902	Heces de bebé	GH18a	No
JCM7011	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>		Heces de bebé	GH18a	No
JCM11346	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18a	No
157F	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>		Heces de bebé	GH18b	ND
SC30	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC97	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC117	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC142	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18b	Si
SC143	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18b	Si
SC145	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC268	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC417	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC523	<i>B. longum</i> <i>subsp.</i> <i>infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC569	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC600	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC605	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC638	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC638	<i>B. longum</i> <i>subsp. infantis</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
DJOIOA	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si
SC91	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC116	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18b	Si /
SC156	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC215	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND

ES 2 728 453 T3

(continuación)

Código	Identificación	Información adicional de la cepa	Fuente	presente gen GH	Actividad de Endoglicosidasa [§]
SC249	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC280	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC513	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC536	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC558	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC592	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC596	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC618	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC630	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18b	Si
SC633	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC657	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC662	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC700	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC706	<i>B. longum</i> <i>subsp. longum</i>	Aislados	Heces de bebé	GH18b	Si
UCC2003	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de lactante	GH85	ND
ATCC15698	<i>B. breve</i>	JCM1273; DSM20091	Intestino de bebé	GH85	Si
ATCC15700	<i>B. breve</i>	JCM1192; DSM20213	Intestino de bebé	-	No
ATCC15701	<i>B. breve</i>	JCM7016	Intestino de bebé	-	No
JCM7017	<i>B. breve</i>		Heces humanas	-	No
JCM7019	<i>B. breve</i>		Heces de bebé	GH85	Si
JCM7020	<i>B. breve</i>		Heces de bebé	GH85	Si
S-17c	<i>B. breve</i>	Roy <i>et al.</i> , 1996 (Int. J. Food Microbiol., 29, 11-29)	Heces de bebé	-	No
S-46	<i>B. breve</i>	Roy <i>et al.</i> , 1996 (Int. J. Food Microbiol., 29, 11-29)	Heces de bebé	-	No
SC81	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC95	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si

(continuación)

Código	Identificación	Información adicional de la cepa	Fuente	presente gen GH	Actividad de Endoglicosidasa [§]
SC139	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si
SC154	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC500	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	ND
SC506	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si
SC522	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC559	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé		Si
SC567	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC568	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si
SC573	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC580	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
KA179	<i>B. breve</i>	Aislados	Heces de bebé	GH85	Si
JCM1254	<i>B. bifidum</i>	DSM20082	Intestino de adulto	-	No
ATCC 29521	<i>B. bifidum</i>	JCM1255; DSM20456	Heces de bebé	-	No
ATCC 11863	<i>B. bifidum</i>	JCM1209; DSM20082		-	No
JCM7002	<i>B. bifidum</i>		Heces humanas	-	No
JCM7003	<i>B. bifidum</i>		Heces humanas	-	No
JCM7004	<i>B. bifidum</i>		Intestino de bebé	-	No
ATCC 29521	<i>B. bifidum</i>	JCM1255	Heces de bebé	-	No
KA75	<i>B. bifidum</i>	Cultivo iniciador	Probioplus	-	No
SC112	<i>B. bifidum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC126	<i>B. bifidum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC555	<i>B. bifidum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC572	<i>B. bifidum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No
SC583	<i>B. bifidum</i>	Aislados	Heces de bebé	-	No

VIII. Listado de Secuencias Informal

- 5 SEQ ID NO: 1 - Sitio activo para enzimas GH18
GLDIDME
- SEQ ID NO: 2 - Sitio activo para enzimas GH85
FINQET
- 10 SEQ ID NO: 3 - EndoBI-1 de longitud completa (Blon_2468 de *B. infantis* de la ATCC 15697)
Secuencias señal subrayadas y dominios transmembrana en cursiva

MTFIKQMMPRYVASMTAGIVAAAMAATCAFAPVANADAVSPTQETIQSTGRHFMVYYRAWRDVTMKGVNNTDLPDDNW
ISMYDIPYGVDDVNI FSYVPSGQEEQAQPFYDKLKS DYAPYLHSRGIKLVRGIDYTGVA VNGFRTFMKEQNKTESEA
TEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHPNADAVKISDNVIRALS KHIGPKSAKPD TTMFLYDTNGSYLNPFK
NVAECFDYVAYQQYGSSSDRTARAAADYQPYIGNEFVPG LTFPEEGDMNNRWYDATEPYEESHFYQVASYVREHNLG
GMFVYALDRDGRNYDEDLRRIVPSNLLWTKTAIAESEGMA LD TAKTAANHYLDRMSLRQVIDDNAASADKARDMVGK
AANLYETNKAVLGGDYEGFSNTYDPTLEAGLLGIDISVLQQQIDKSSEIIGADTAESDAKTALRMARDA AIDGLTG
KIYTADQVSAWSQALKAALDATVPVPTPDSTDQNGNRDKVTNHKVQGP KQLSAT GISTDIIVAVGVTLAIAGVALS
LSRKLS

SEQ ID NO: 4 - Dominio extracelular de EndoBI-1

NADAVSPTQETIQSTGRHFMVYYRAWRDVTMKGVNNTDLPDDNWISMYDIPYGVDDVNI FSYVPSGQEEQAQPFYDKL
KSDYAPYLHSRGIKLVRGIDYTGVA VNGFRTFMKEQNKTESEATEADYDAYAKQVIDKYMISVGLDGLDIDMEAHPN
DADV KISDNVIRALS KHIGPKSAKPD TTMFLYDTNGSYLNPFKNVAECFDYVAYQQYGSSSDRTARAAADYQPYIGN
EFVPG LTFPEEGDMNNRWYDATEPYEESHFYQVASYVREHNLGGMFVYALDRDGRNYDEDLRRIVPSNLLWTKTAIA
ESEGMA LD TAKTAANHYLDRMSLRQVIDDNAASADKARDMVGKAANLYETNKAVLGGDYEGFSNTYDPTLEAGLLG
IDISVLQQQIDKSSEIIGADTAESDAKTALRMARDA AIDGLTGKIYTADQVSAWSQALKAALDATVPVPTPDSTDQNG
NRDKVTNHKVQGP KQLSAT

5

SEQ ID NO: 5 - Dominio extracelular de EndoBI-2 (BLIF_1310 de SC142 de *B. infantis*)

VANAQEGDSPVAASQEGNGNKHFMVYYRAWRDVTMKGVNNTDLPDDNWISMYDIPYGIDVVNVFSYVPSGQEA AQAQPF
YDKLKS DYAPYLHARGVKLV RGLDYS GVMVDGFKTWIAQQGKNVDSATESDYDAYADHVIETYMTSVGLDGLDIDME
TFPDAAQVAISDQVITALAKRIGPKSDNPEGTMFLYDTNGSYTAPFKNVSDCFDYVAYQQYGSDSNRTAKAAATYEQ
FIDSTKFVPG LTFPEEGDMNNRWDATEPYLD SHFYDVASYSYDHNLGGMFVYALDRDGR TYSDDDL AHIKPSNLIW
TKTAIAQS QGMSLENAKQAANHF LDRMSYTKDVPAETRQTVA AATNLYEVNKAVLGADWNDGYSNTYDPTLELSLAS
IDTTALTGAIAKADALLADGATD TDVRTTLTARNAA

10 SEQ ID NO: 6 - Dominio extracelular de EndoBB (BLD_0197 de DJO10A de *B. longum*)

CSGGTSATKYTITPENENEELV LGNRPEASYWFPEDLLKWNADKDPNLA YNVSTVPLAKRVKADLKPVNDTQNTDT
KVMASIMNSSTSGNAPHGLNTANANTFSYQYVDELVYWGGS SGEIIVPPSPDV TDMGHTNGVPVLGT VFFPQNV
SGGKVEWLDQTLAQKSDGSFPVADK LIEVATYGF DGFINQETEGENETSLGADYATKMQAFIAYLKKQAPDLRVV
YYDSMTKDGSIDWQNALTDENS MYMTDGDHPIADEMFLNFWWTE DKL AGDDLLAASATKAKELGIDPYSLYAGIDVQ
ADGYDTPVKWNLFAGKDGKHTSLGLYCP SWAYWSAGNPTTFRKNESRLWVND EGNPSVSTPYEDDEKWTGVS NYVA
EQSAVTS LFPVTNFNNGSGYSFFREGKQISKMDWNNRSVSDIQPT YRWI VADEGGNKTKADYS DADAWYGGSS LKFS
GKVAKDGMTVKLYSASVKTGAKPTLSIAAKANVD TDLKAVLTFADGSVETVNGKKKVGNDWGV IDYDI AKLSNKT L
TGIDFTYQSS EDKTYELLGNITLKD GSEETELGKVTEVKVDDSE FDDDALYAGARISWKT DGKAPAYE IYQIN ED
KRSRFLGVS NVENFYANALTRVGETNNTT FEI VPD RYGTQGTSAKADMWPDNSKPKAGATASRTLLNVGDEV T FT
SASSKN TAEVAWSLPGSSKEHATGKSVTVTYDKEGVYDVEITAKNKSGEATATLKGQIVVSADVMDLVLLS QGAQVS
ADGFTNGNEKPEFAVDGDVKT KWCVTGPAPHEL VVDL GAPKTVS QVDI SHAQAGGEDAS MNTQEY AIEVSE DGT EYT
QVALVKGNT EGATSNAFAPVNARYVKLVVNKPTQGS DTAARIYEMQVRGADGAIL

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable para administración oral, en la que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y carece de un dominio transmembrana.
2. Un producto alimentario que comprende un polipéptido recombinante, en el que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y carece de un dominio transmembrana.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para uso en un método terapéutico para (i) favorecer la resistencia a infecciones bacterianas o por levaduras, (ii) reducir una respuesta alérgica a glicoproteínas, o (iii) tratar al menos uno de síndrome intestinal inflamatorio, estreñimiento, diarrea, colitis, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, trastorno intestinal funcional (FBD), síndrome del colon irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), y colitis ulcerosa en un individuo que comprende administrar la composición farmacéutica al individuo, opcionalmente en la que el individuo es un bebé.
4. Uso del producto alimentario de la reivindicación 2 en un método no terapéutico para inducir saciedad en un individuo que comprende administrar el producto alimentario al individuo.
5. Un método para desglicosilar una glicoproteína que comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido, el método comprendiendo poner en contacto la glicoproteína con un polipéptido recombinante, desglicosilando de ese modo la glicoproteína y generando proteína desglicosilada y glicanos libres, en el que el polipéptido recombinante comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y carece de un dominio transmembrana.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido recombinante se produce cultivando una célula que comprende un polinucleótido recombinante que codifica el polipéptido en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido, produciendo de ese modo el polipéptido de forma recombinante.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido comprende una secuencia idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 4.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido comprende una secuencia idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 5.
9. Una composición que comprende (i) un polipéptido recombinante que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, puede escindir N-glicanos con un contenido elevado de manosa, complejos, e híbridos de una glicoproteína, y carece de un dominio transmembrana; y (ii) una glicoproteína que comprende un N-glicano con un contenido elevado de manosa, complejo, e híbrido.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que el polipéptido comprende una secuencia idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 4.
11. La composición de la reivindicación 9, en la que el polipéptido comprende una secuencia idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 5.
12. La composición de la reivindicación 9, en la que el N-glicano comprende fucosilación de núcleo, fucosilación terminal, o sialilación terminal.

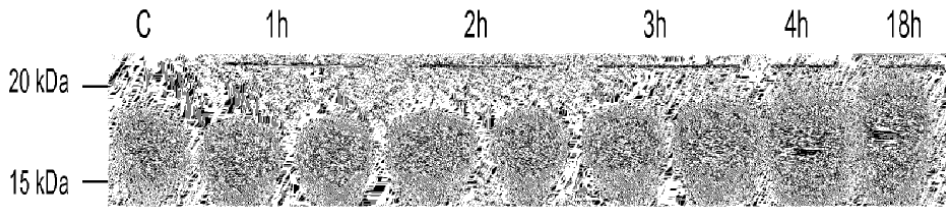


FIG. 1A

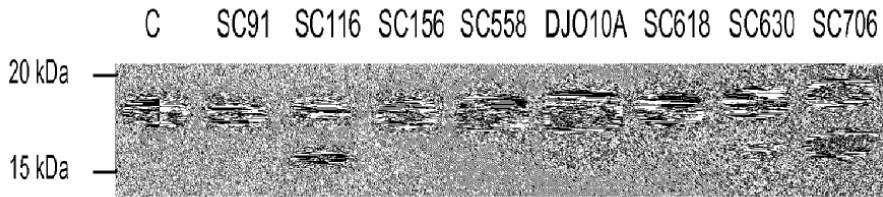


FIG. 1B

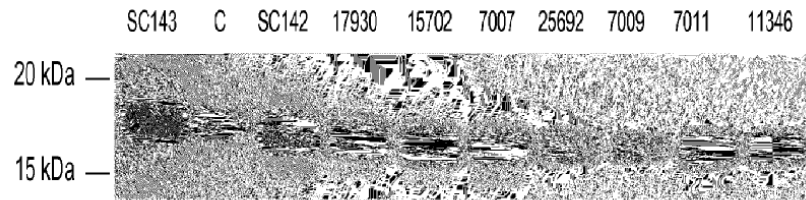


FIG. 1C

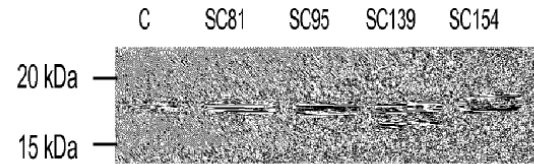


FIG. 1D

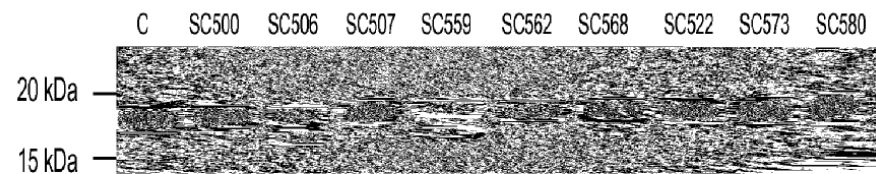


FIG. 1E

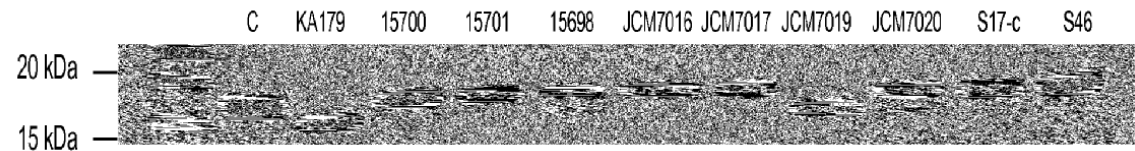


FIG. 1F

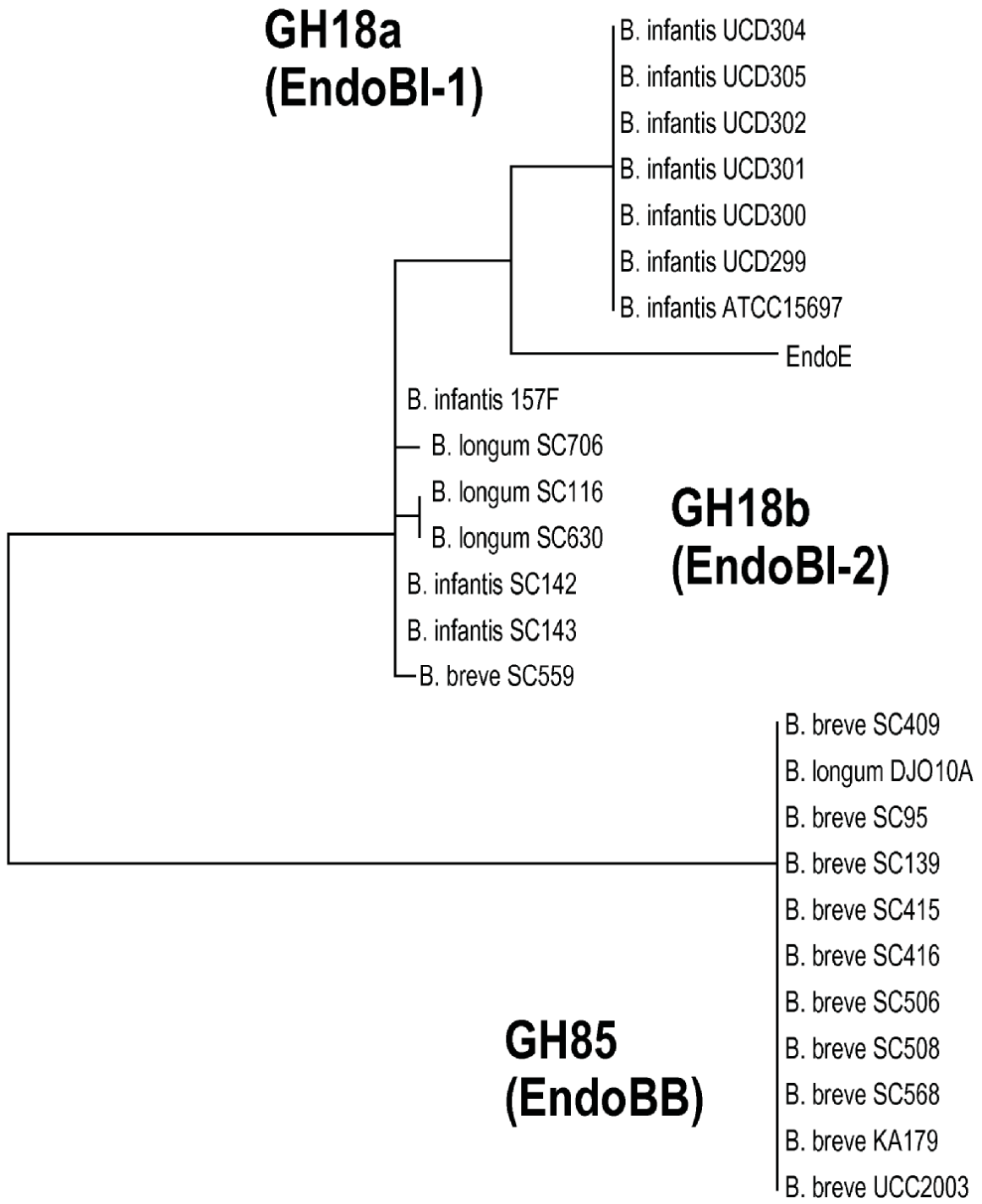
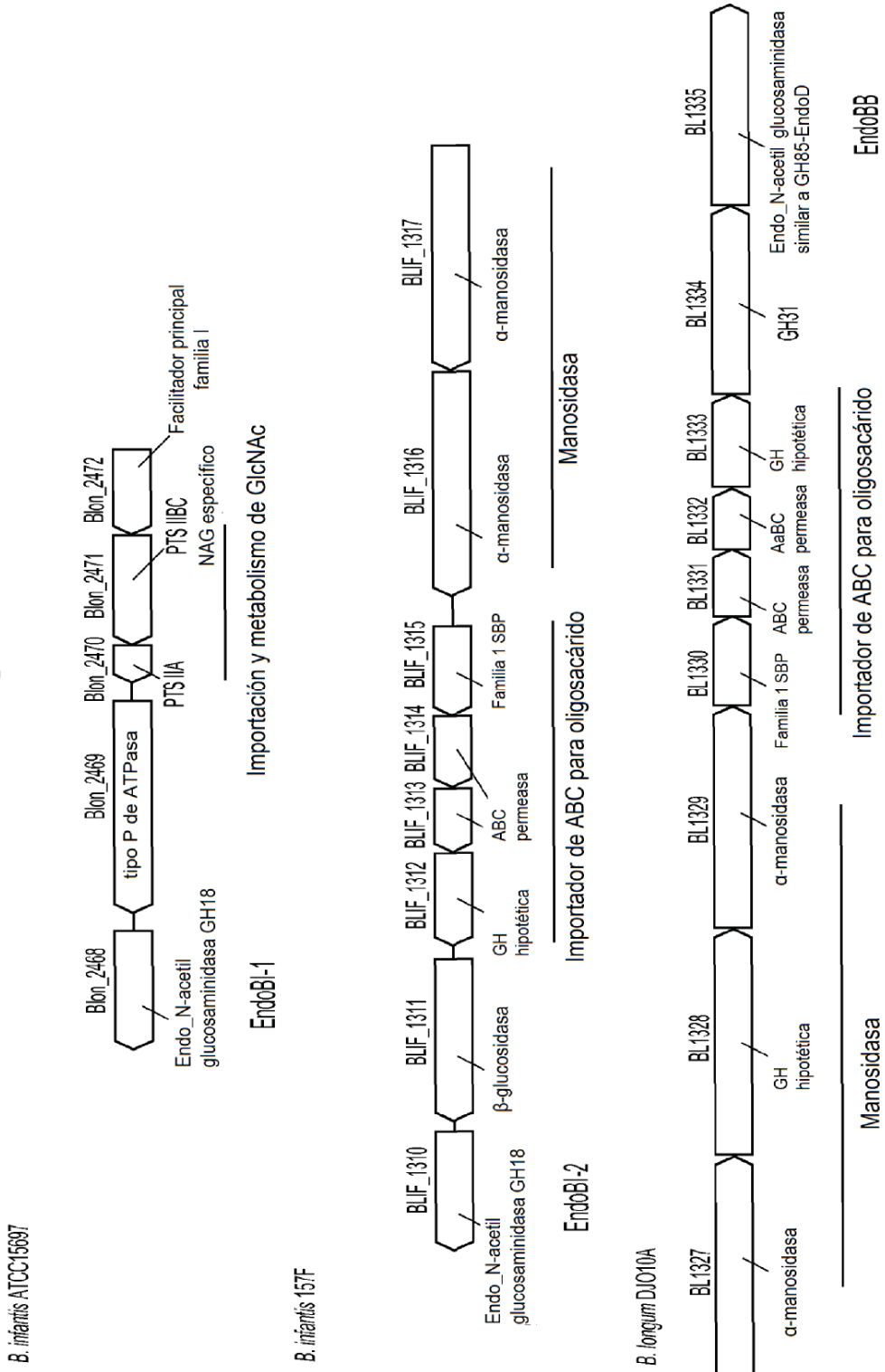


FIG. 1E

FIG. 2



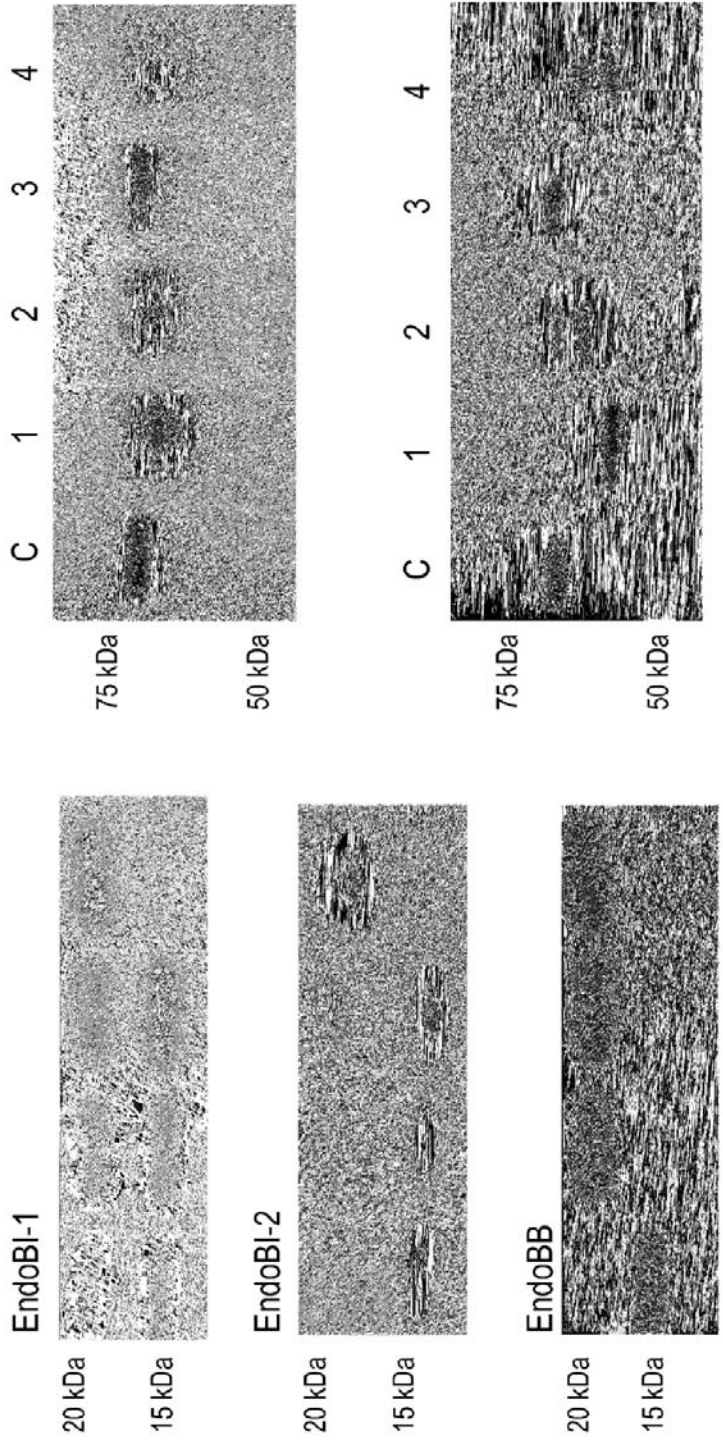


FIG. 2B

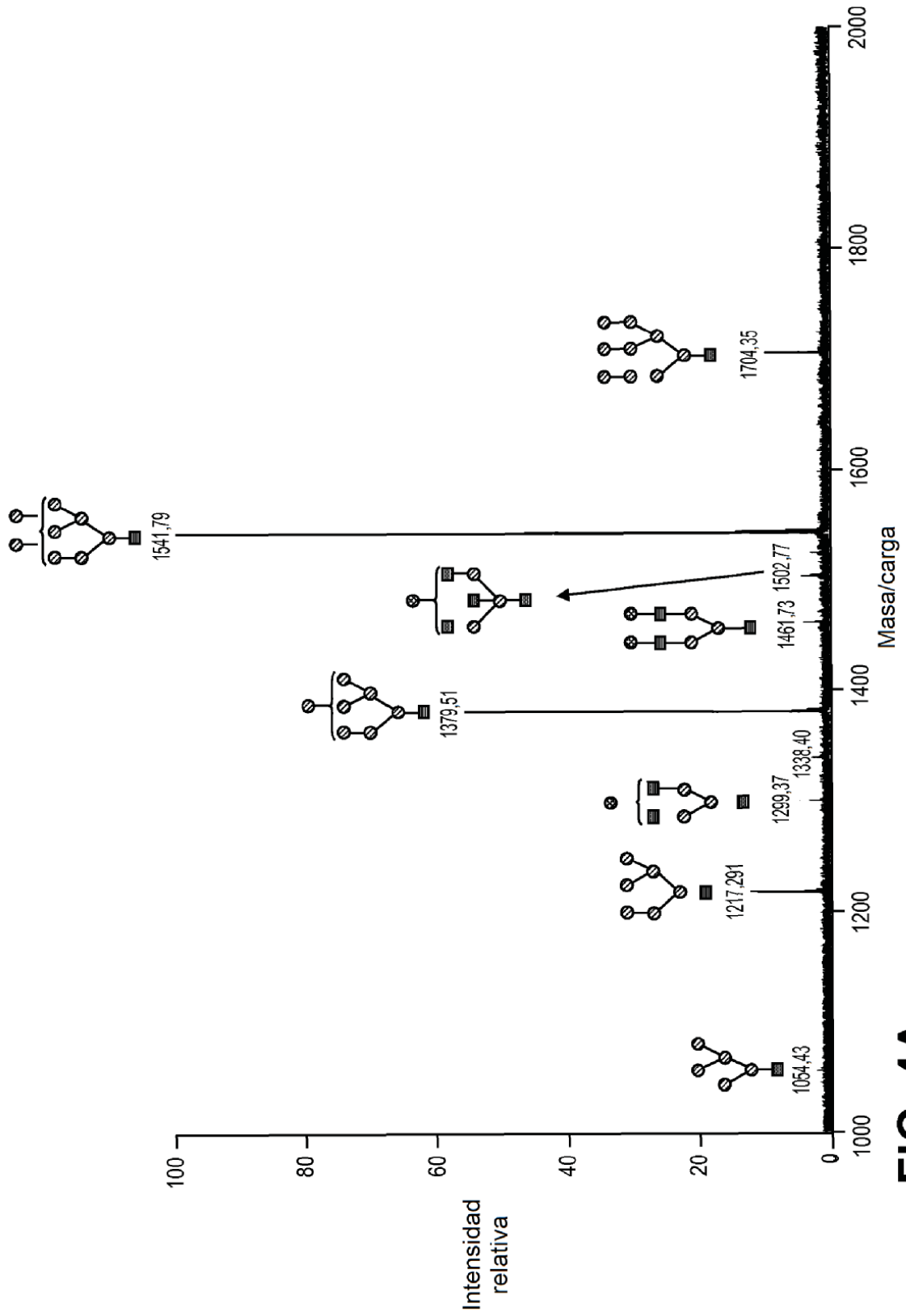


FIG. 4A

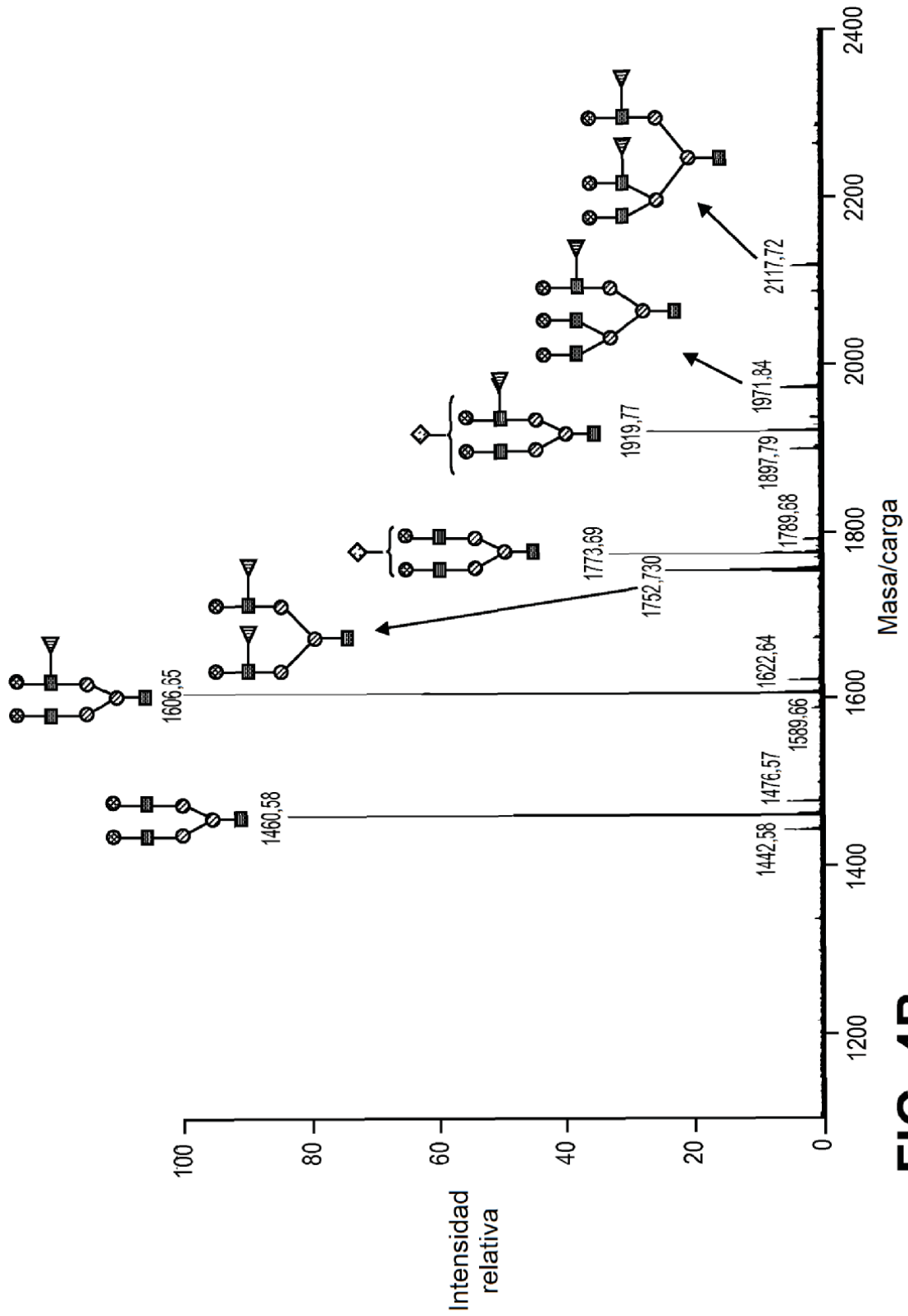


FIG. 4B

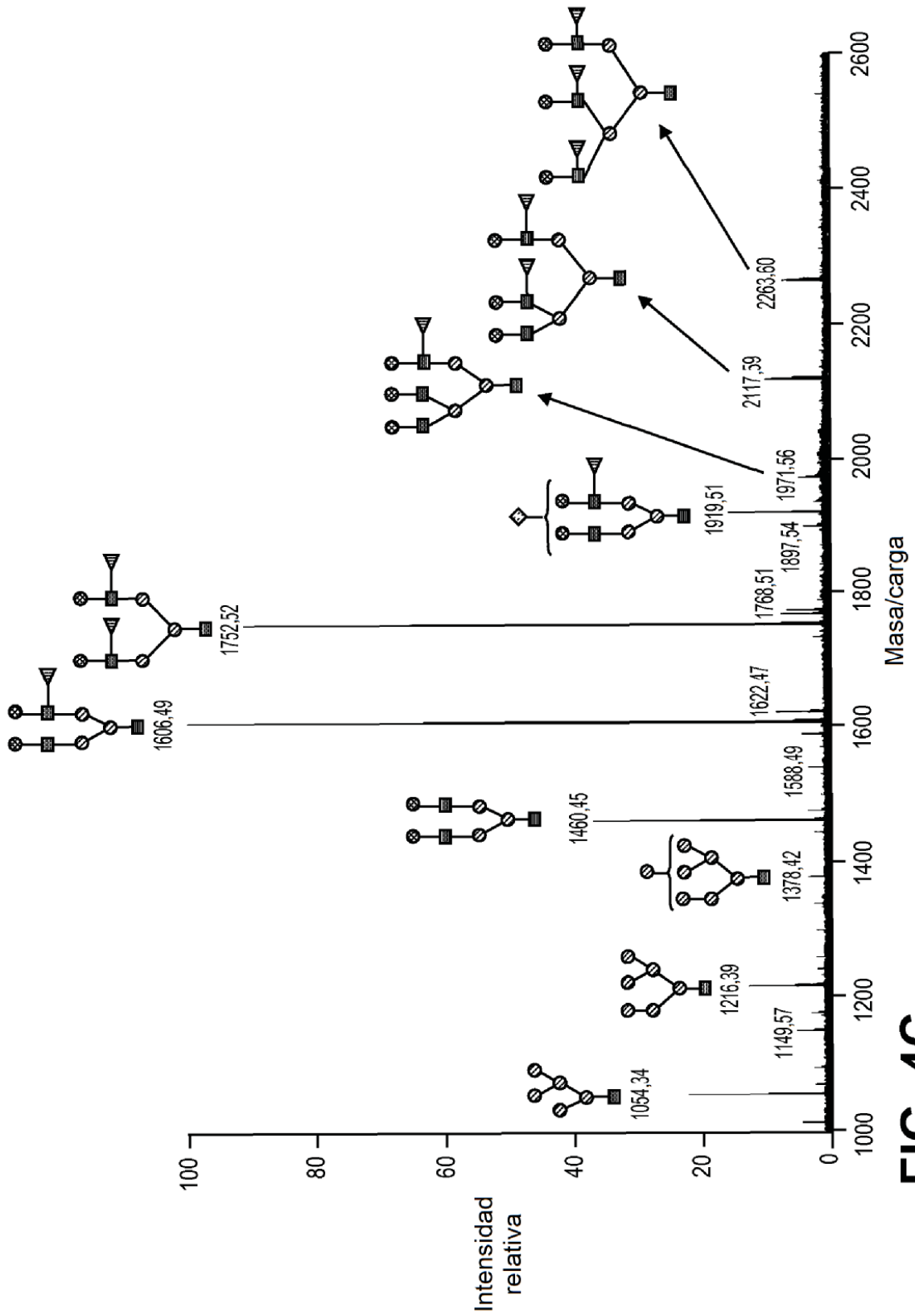


FIG. 4C

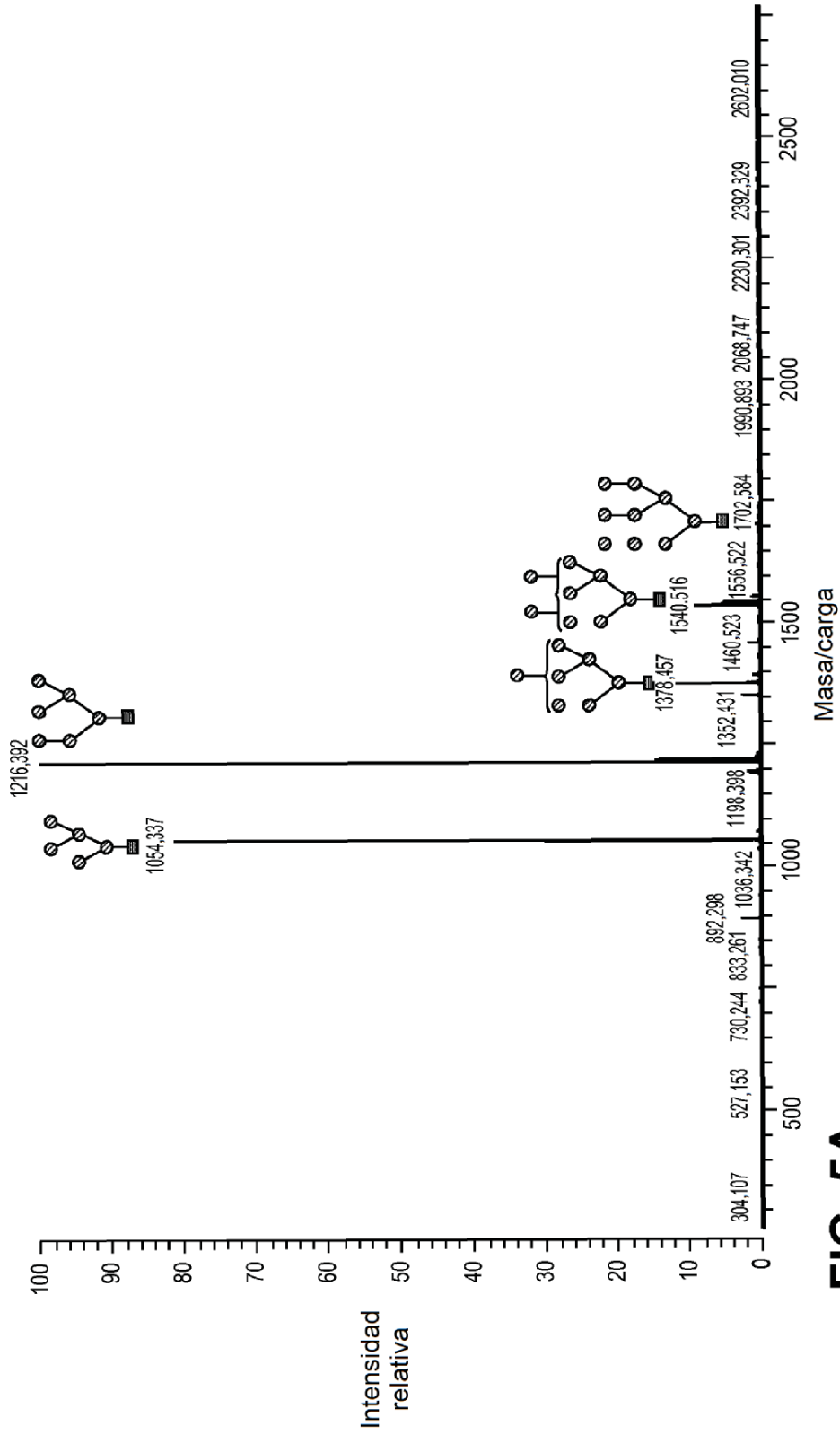


FIG. 5A

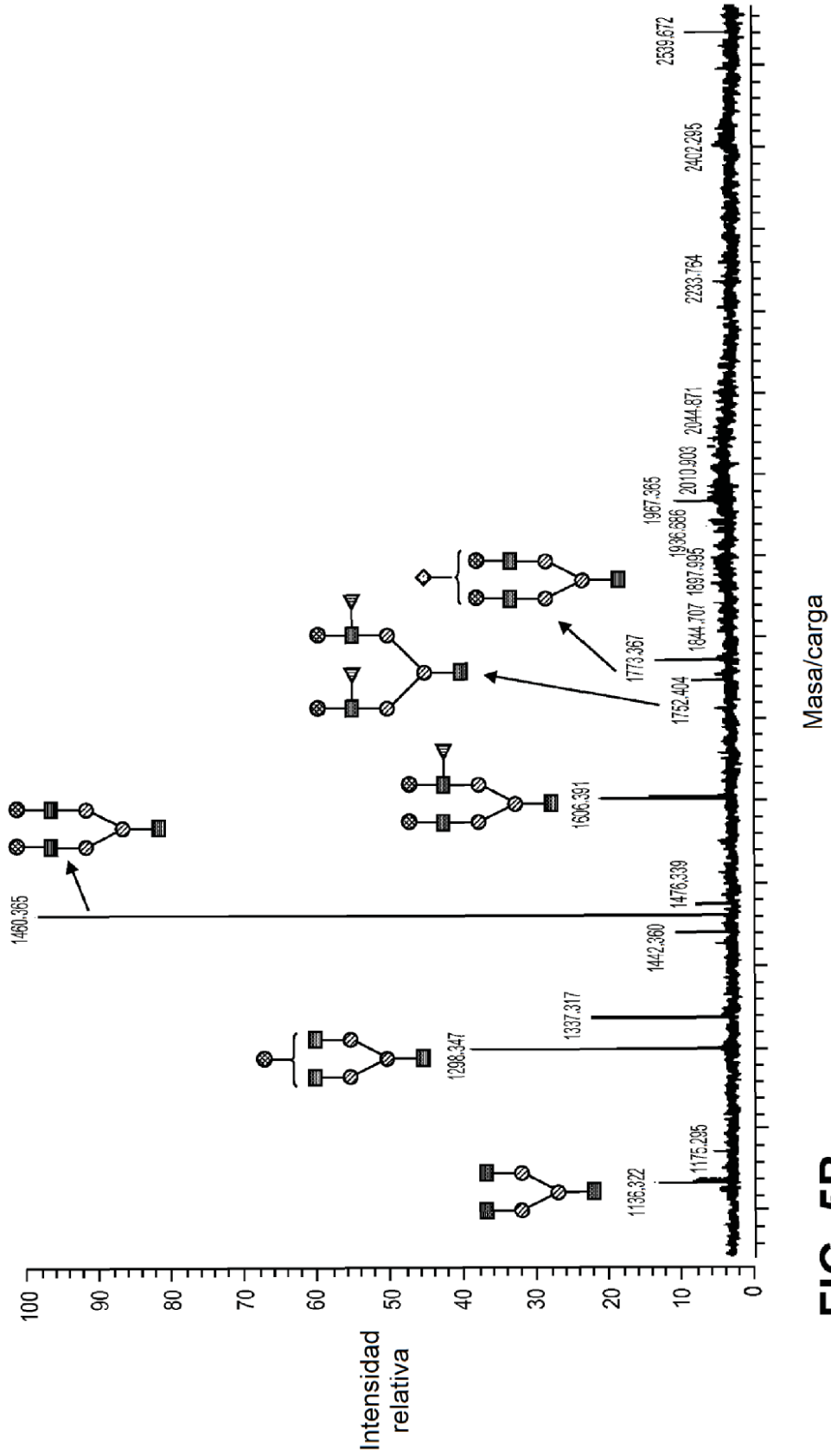


FIG. 5B

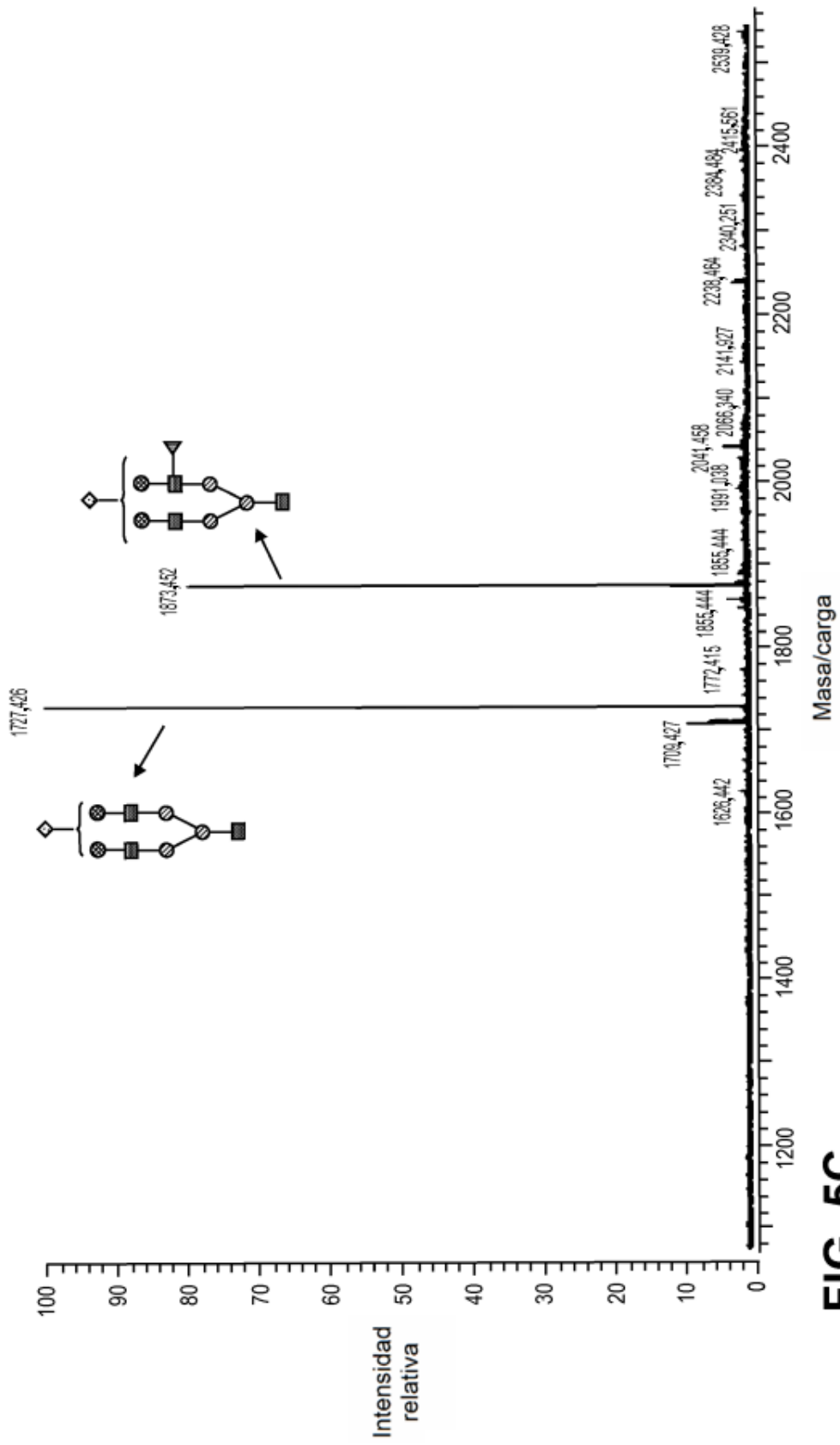


FIG. 5C

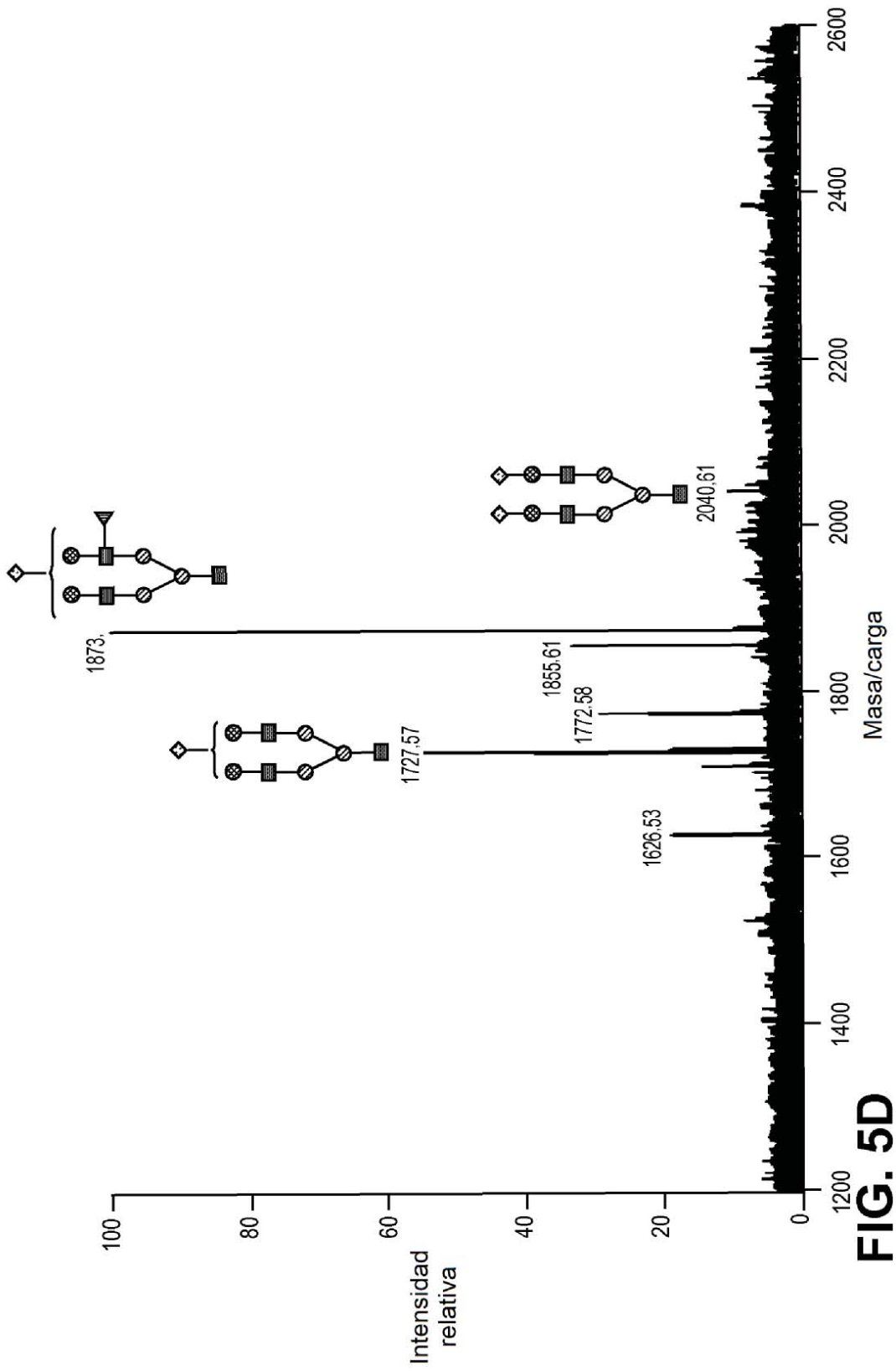


FIG. 5D

EndoBI-1 D184N

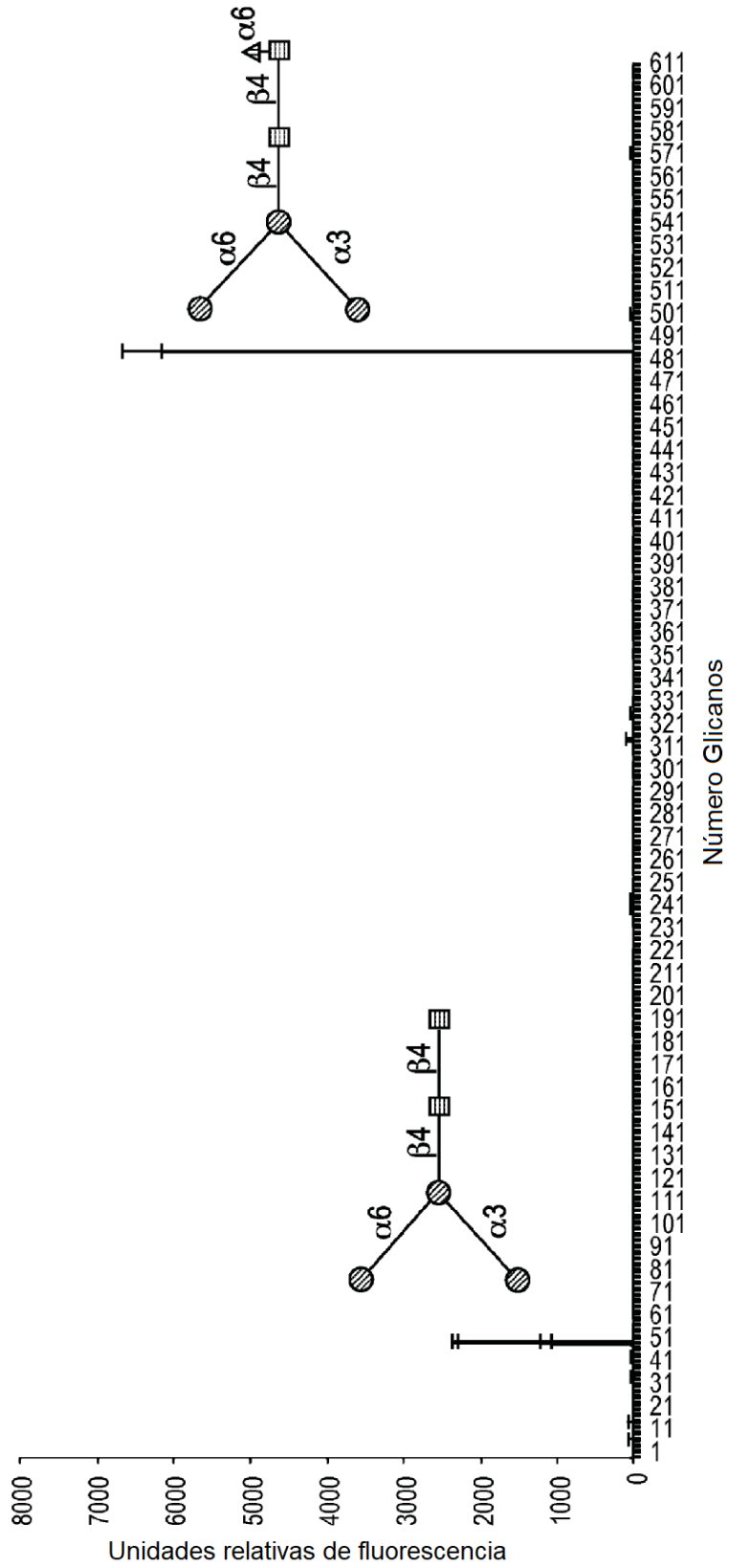


FIG. 6A

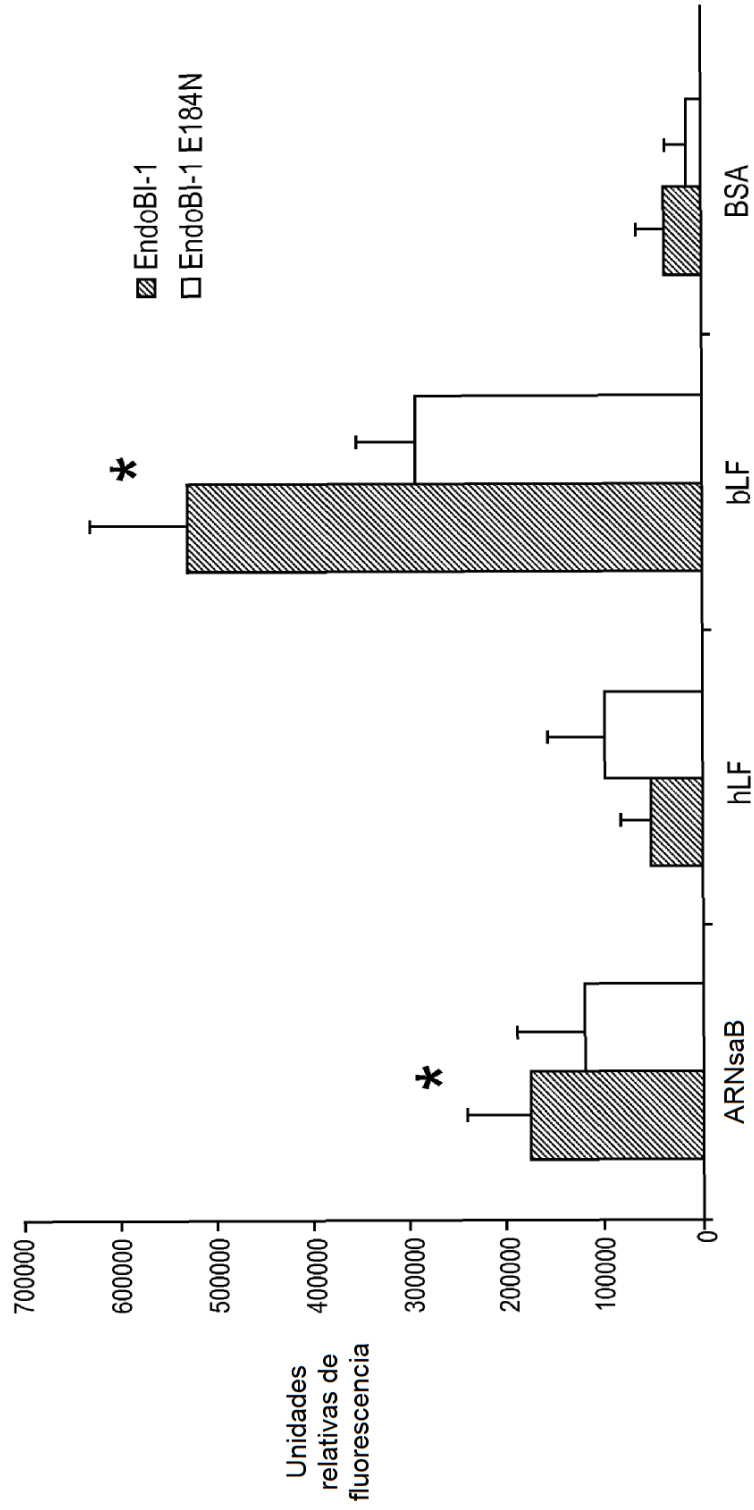


FIG. 6B

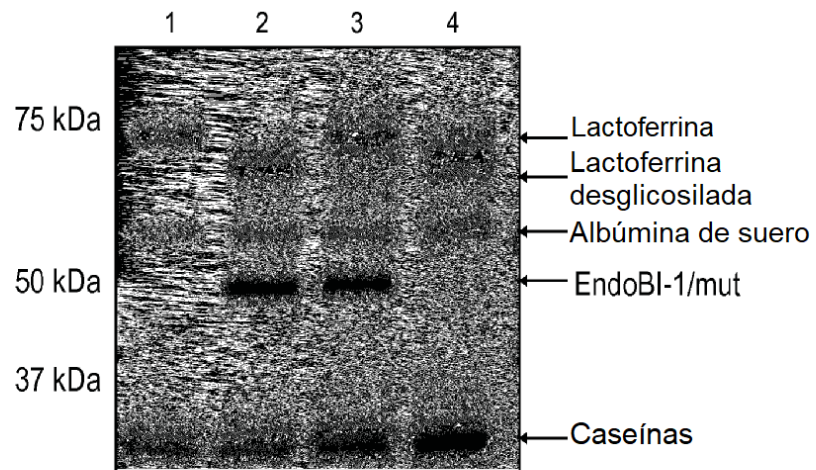


FIG. 7A

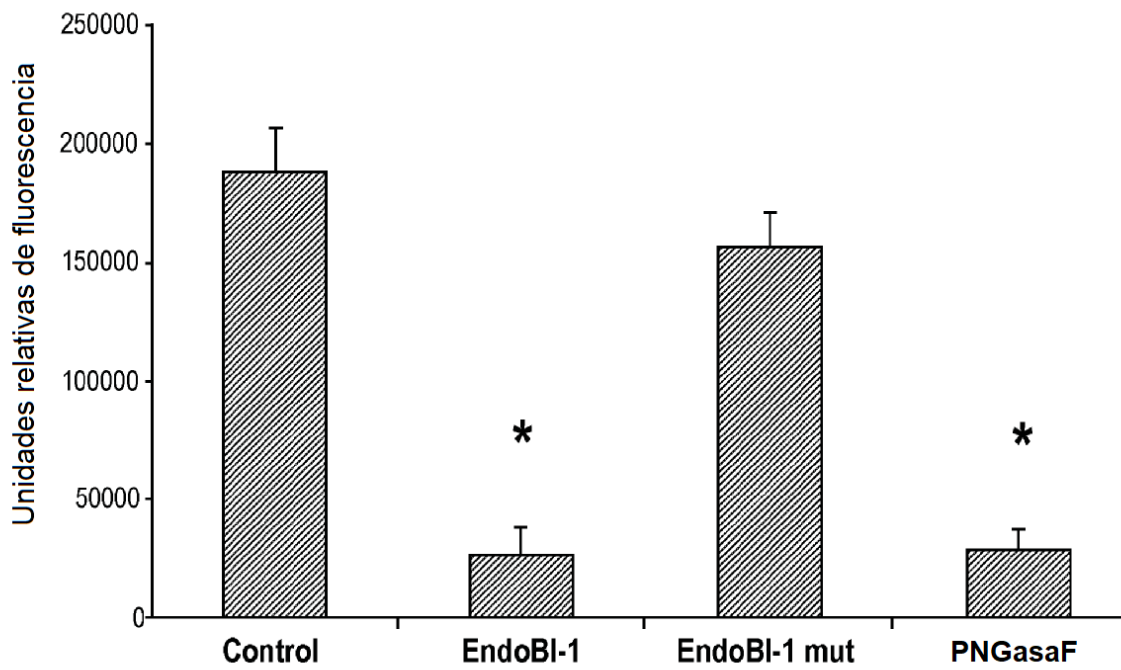


FIG. 7B

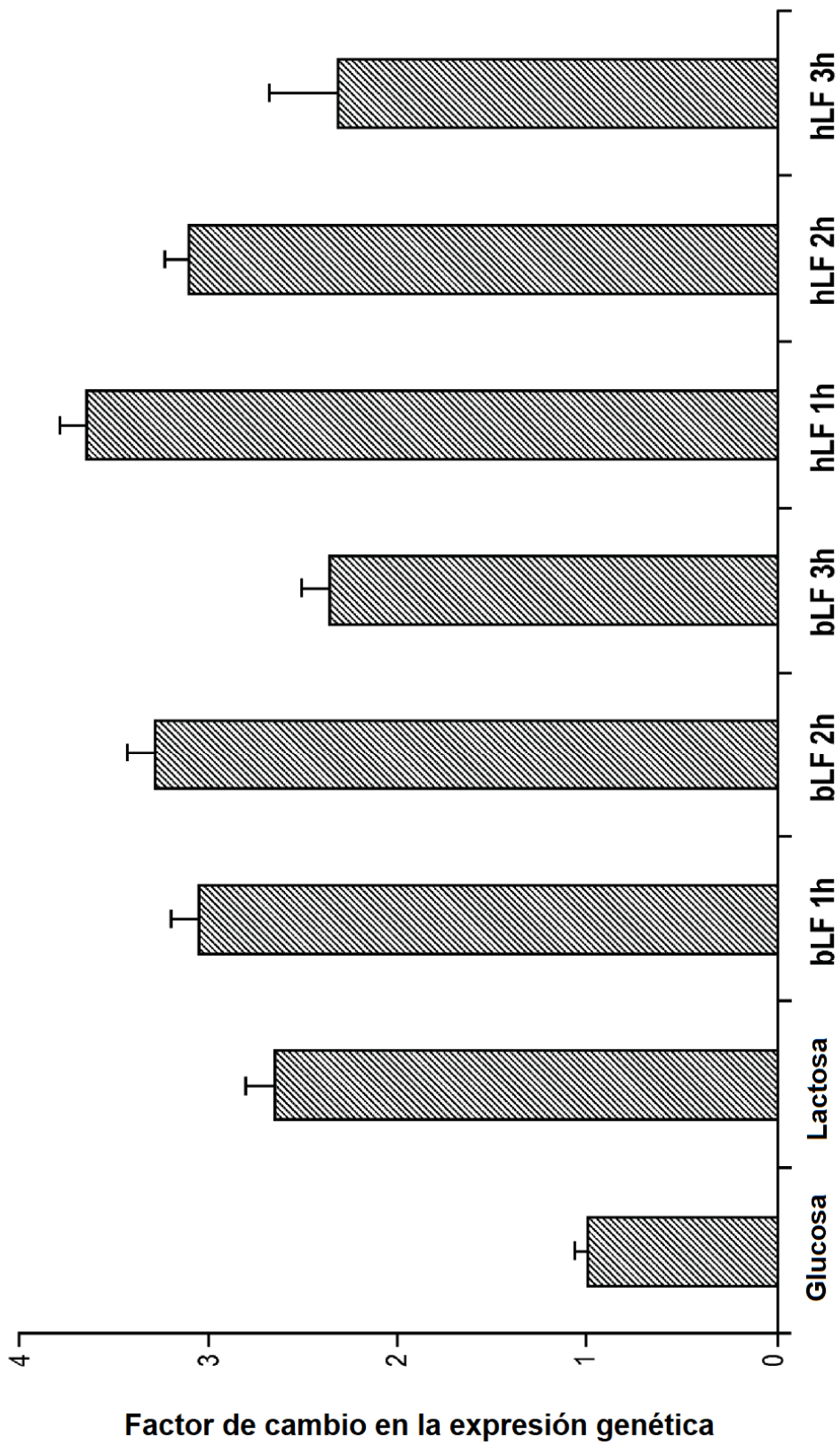


FIG. 8

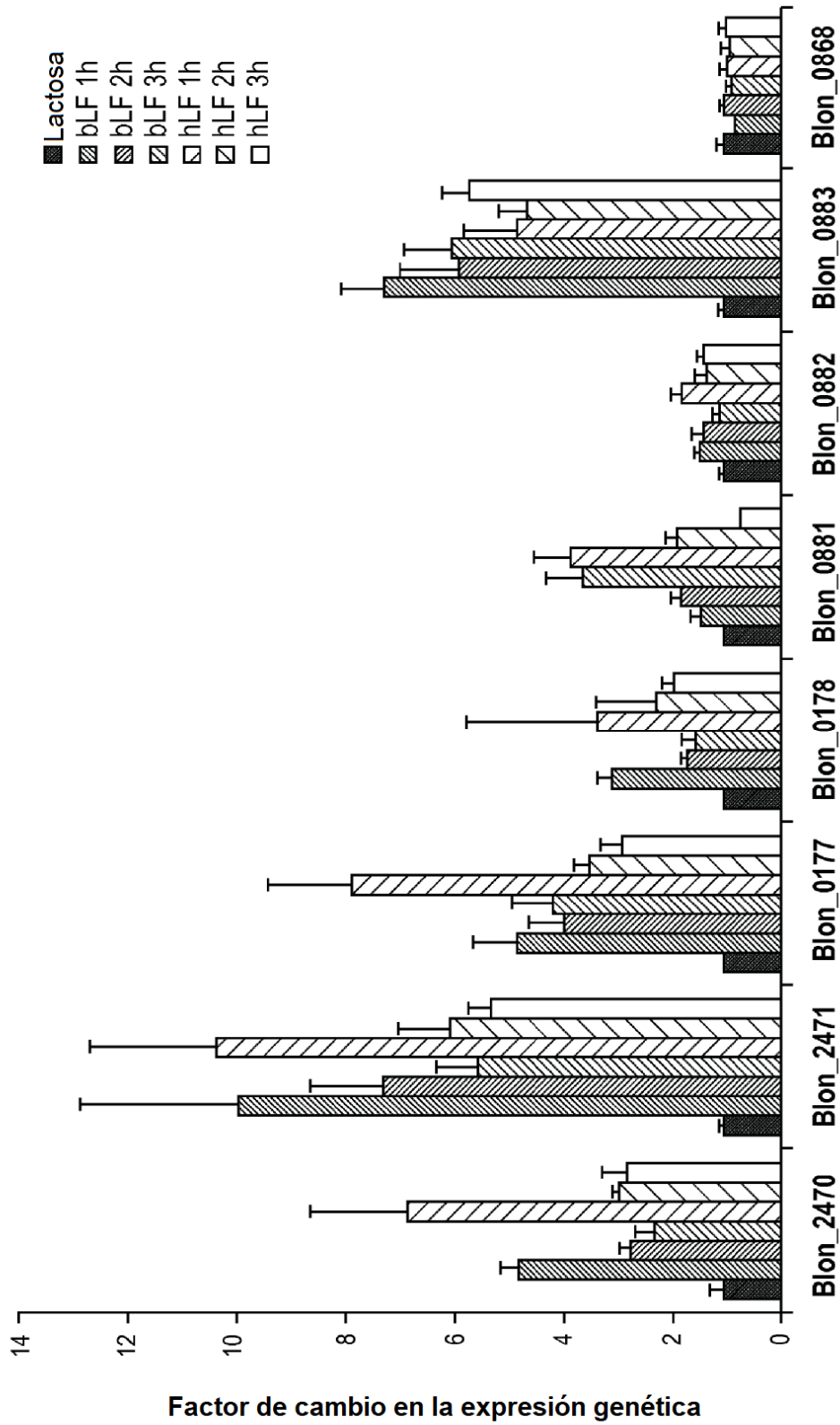


FIG. 9A

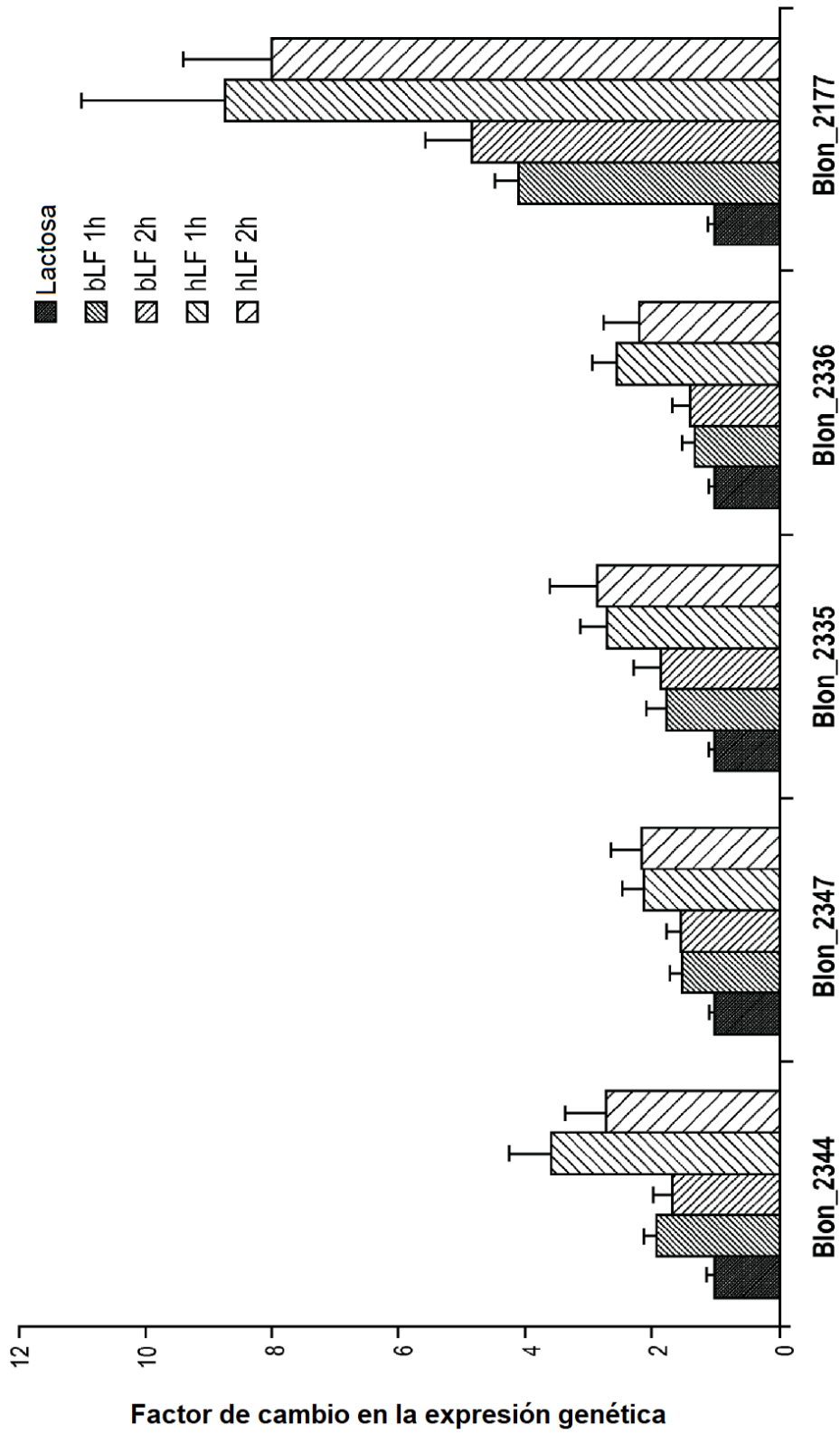


FIG. 9B

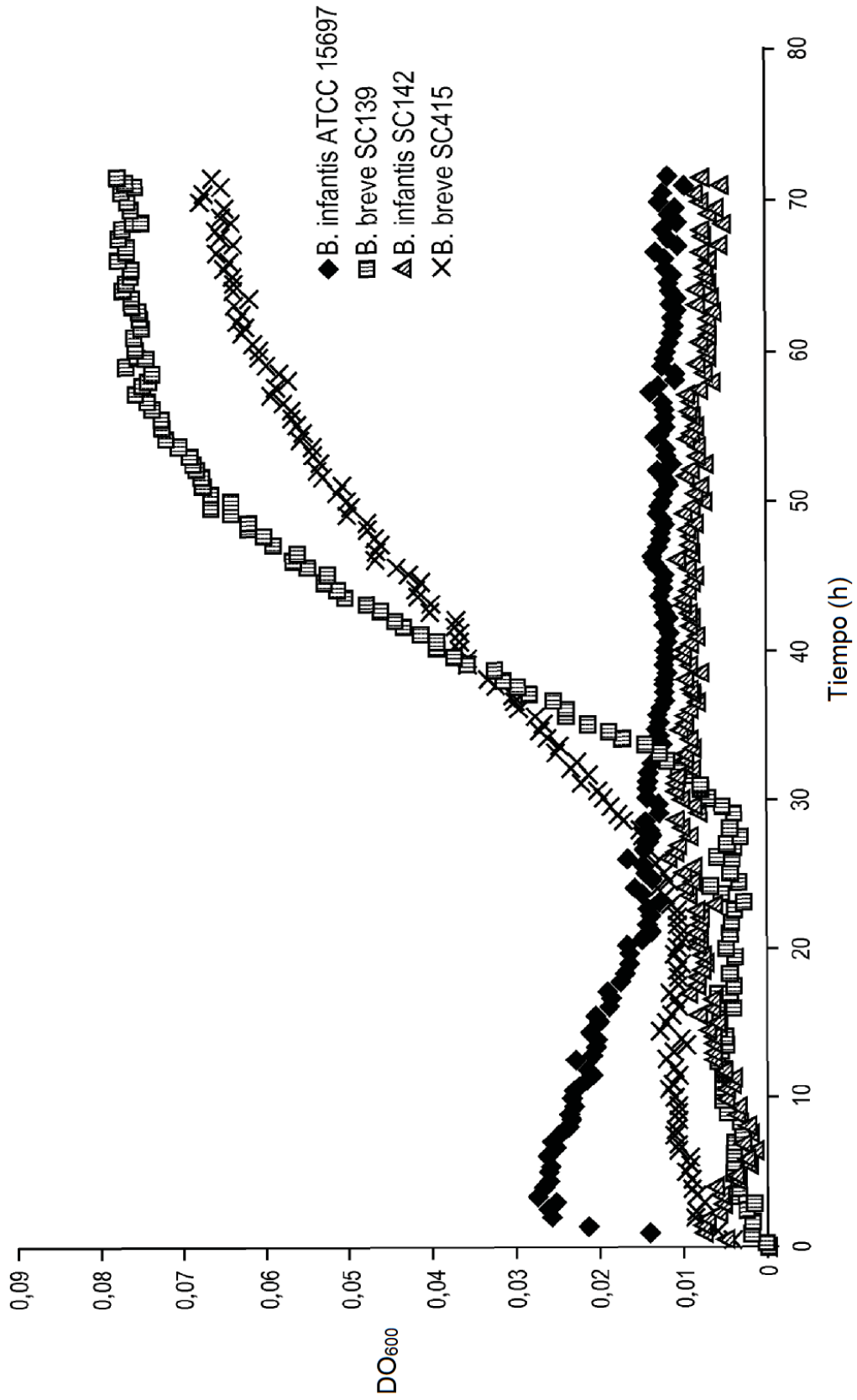


FIG. 10