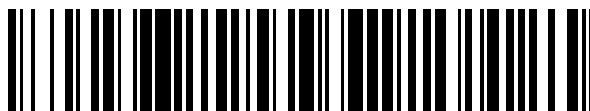


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 978**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/US2015/023855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15717728 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3125962**

54 Título: **Enzimas microbianas para la reducción de alfa-galactosa del tejido basado en colágeno**

30 Prioridad:

01.04.2014 US 201461973470 P

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

24.04.2020

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
5 Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US**

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK, T. y
GEORGE, NIRAJ, P.E.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 755 978 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 microbianas para la reducción de alfa-galactosa del tejido basado en colágeno

Antecedentes de la invención

5 Se utilizan diversos productos derivados de tejidos para regenerar, reparar o tratar de otro modo tejidos y órganos enfermos o dañados. Tales productos pueden incluir injertos de tejidos intactos y/o tejidos acelulares o acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices acelulares de tejido de piel, intestino u otros tejidos, con o sin siembra celular), que se pueden derivar de un donante de una especie diferente del receptor (xenoinjerto) o de un donante de la misma especie que el receptor (aloinjerto). Por ejemplo, un material que contiene colágeno puede estar hecho de tejido porcino e implantado en un paciente humano.

10 En animales receptores (por ejemplo, seres humanos) que no expresan la enzima β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosil-transferasa (α -1,3-galactosiltransferasa; " α GT"), que cataliza la unión de α -1,3-galactosa (Gal) en N-acetilactosamina (Gal β 1,4GlcNAc) para producir Gal α -1 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R terminal ("galactosa-alfa-1,3-galactosa", "epítipo α -gal"o" α -gal") en un sustrato aceptor, un problema importante del tejido xenotransplantado es el rechazo hiperagudo de xenoinjertos en tales receptores que se debe en gran medida, si no
15 exclusivamente, a la acción de anticuerpos específicos para el epítipo α -gal en la superficie de las células en el xenoinjerto.

El epítipo α -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de América del Sur), así como en macromoléculas tales como los proteoglicanos de los componentes, extracelulares pero está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y seres humanos (U. Galili et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 17755). Los anticuerpos anti-gal se producen en seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a las estructuras de carbohidratos del epítipo α -gal en bacterias gastrointestinales. U. Galili et al. (1988) Infect. Immun. 56:1730; R. M. Hamadeh et al.(1992) J. Clin. Invest. 89:1223.

Debido a que los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítipos de α -gal, el xenotrasplante de material de tejido de estos mamíferos en primates a menudo produce el rechazo debido a la unión del anticuerpo anti-Gal de primates a estos epítipos. La unión produce la destrucción del material tisular mediante la fijación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili et al. (1993) Immunology Today 14:480; M. Sandrin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11391; H. Good et al.(1992) Transplant. Proc. 24:559; B. H. Collins et al. (1995) J. Immunol. 154: 5500. En consecuencia, cuando los animales que producen epítipos de α -gal se usan como fuente de tejido para el tratamiento de tejidos u órganos enfermos o dañados, la eliminación de epítipos de α -gal de las células y de los componentes extracelulares del material del tejido puede disminuir respuesta inmune asociada con la unión de anticuerpos anti-gal a epítipos α -gal.

Las enzimas como las alfa-galactosidasas de los granos de café verde y Bacteroides, que eliminan sustancialmente los epítipos α -gal de las células y de los componentes extracelulares de un material que contiene colágeno, se han identificado y utilizado para preparar productos tisulares (ver, por ejemplo, Luo, et al. al. (1999) Xenotransplantation 6(4):238-48; Patente U.S. Núm.: 7.951.552). Sin embargo, los problemas de suministro han disminuido la disponibilidad de estas enzimas, de este modo aumenta el costo y la disponibilidad de productos tisulares para tratar a los sujetos que lo necesitan. Por consiguiente, existe una necesidad de enzimas y procedimientos adicionales para tratar productos tisulares para reducir o controlar la respuesta inmune de los productos tisulares tras la implantación.

El documento WO99/12555A divulga un tejido tratado enzimáticamente con α -galactosidasa para eliminar el epítipo Gal. El documento US 7.951.552 B divulga un procedimiento para preparar un tejido no humano para xenotrasplante, que comprende la etapa de incubar el tejido no humano con una enzima que tiene actividad de α -galactosidasa.

La presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico). En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para la preparación de una matriz de tejido no humano para xenotrasplante. Los procedimientos pueden incluir poner en contacto una matriz de tejido que contiene colágeno con una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* o *Clostridium cellulyticum* aislada en una cantidad y durante un tiempo suficiente para eliminar un epítipo de α -gal de la matriz de tejido, de este modo se prepara la matriz de tejido no humano para xenotrasplante

50 En una realización, la alfa-galactosidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, y 8. En otra realización, la alfa-galactosidasa está codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de nucleótidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, y 7.

55 En otra realización, la alfa-galactosidasa está codificada por una molécula de ácido nucleico, dicha molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad

con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, y 8.

En una realización, la matriz de tejido es una matriz acelular de tejido. En otra realización, la matriz de tejido comprende a matriz de tejido dérmico.

- 5 En una realización, la matriz de tejido se obtiene de un tejido seleccionado de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido valvular cardíaco, tejido de ligamentos, tejido tendinoso, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido vesical urinario, tejido de uréter y tejido intestinal

10 En una realización, los procedimientos de la invención además comprenden tratar la matriz de tejido para eliminar al menos algunas de las células y componentes celulares, por ejemplo, sustancialmente todas las células y componentes celulares, de la matriz de tejido.

En una realización, los procedimientos de la invención además comprenden tratar la matriz de tejido para eliminar sustancialmente todas las células y componentes celulares antes del contacto con la matriz de tejido con la alfa-galactosidasa.

En una realización, la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno incluye dos o más matrices de tejido.

- 15 En una realización, los procedimientos de la invención además comprenden el envasado de la matriz de tejido. En una realización, los procedimientos de la invención además comprenden esterilizar la matriz de tejido.

En otro aspecto de la divulgación, la presente divulgación proporciona una matriz de tejido preparada de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Las Figuras 1A-1J muestran matrices acelulares de tejido teñidas para el epítipo α -gal. Las Figuras 1C-1E y 1H-1J muestran matrices acelulares de tejido teñidas para el epítipo α -gal después del tratamiento con las enzimas indicadas usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Las Figuras 1A y 1F muestran matrices acelulares de tejido de control no tratadas que consisten en dermis porcina que no se expuso a la enzima y se tiñó para el epítipo α -gal, y las Figuras 1B y 1G son controles positivos que consisten en dermis porcina tratada con alfa-galactosidasa de grano de café verde. La presencia del epítipo α -gal está indicada por un color gris oscuro.
- 25

Descripción de de las realizaciones ejemplares

- La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de alfa-galactosidasas microbianas que eliminan los residuos de galactosa unidos a alfa-1,3 terminales del tejido animal y los procedimientos de uso de tales alfa-galactosidasas para preparar una matriz de tejido no humano que se puede usar, por ejemplo, como un producto tisular. Como se describe en los ejemplos adjuntos a continuación, se ha descubierto que de la multitud de alfa-galactosidasas microbianas que se han identificado, solo las alfa-galactosidasas de *Trichoderma reesei* y *Clostridium cellulolyticum* escinden efectivamente los epítipos α -galde tejido no humano y, por lo tanto, por ejemplo, reducir la inmunogenicidad de las matrices de tejidos preparadas para xenotrasplante.
- 30

- 35 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar tejido no humano o matrices de tejido para implantación en pacientes humanos.

I. Definiciones

- Las definiciones de ciertos términos se definen primero a continuación. Además, se debe observar que siempre que se mencione un valor o intervalo de valores de un parámetro, se considera que los valores e intervalos intermedios a los valores mencionados también sean parte de esta invención.
- 40

Los artículos "un" y "un/una" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

- 45 El término "que incluye" se usa en la presente que significa, y se usa indistintamente con la frase "que incluye, pero sin limitación".

El término "o" se usa en la presente que significa, y se usa indistintamente con el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 50 Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a animales humanos y no humanos, por ejemplo, sujetos veterinarios. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ratones, conejos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios y reptiles. En una realización, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en la presente, "producto tisular" se refiere a cualquier tejido que contiene proteínas de matriz extracelular. Se pueden usar diversos tejidos para producir productos tisulares, por ejemplo, para tratar a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, se han producido varios productos tisulares para la regeneración, reparación, aumento, refuerzo y/o tratamiento de tejidos humanos que se han dañado o perdido debido a diversas enfermedades y/o daños estructurales (por ejemplo, por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste y degeneración a largo plazo). Tales productos pueden incluir, por ejemplo, matrices acelulares de tejido o parcialmente descelularizadas matrices descelularizadas de tejido que se han repoblado con células exógenas y/o tejidos celulares.

Los tejidos se pueden seleccionar de una variedad de fuentes de tejido que incluyen piel (dermis o piel entera), fascia, tejido pericárdico, dura, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido de ligamentos, tejido adiposo, tejido tendinoso, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter y tejido intestinal. Los procedimientos descritos en la presente se pueden usar para procesar cualquier tipo de tejido colágeno y para cualquier producto de matriz de tejido. Por ejemplo, se describen numerosos materiales de andamios biológicos en Badylak et al. (Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013), y los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para tratar esos u otros productos tisulares conocidos en la técnica.

En algunos casos, los productos tisulares se pueden proporcionar como matrices descelularizadas de tejido. Las matrices acelulares de tejido adecuadas se describen más adelante. En algunos casos, los procedimientos pueden incluir el procesamiento de tejido intacto para eliminar células u otros materiales. Los tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir matrices acelulares de tejido o materiales de tejido extracelular. Por ejemplo, varios tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartílago, tejido adiposo, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos u otros tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir productos tisulares útiles para pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados se pueden usar sin la adición de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados se pueden sembrar con células de fuentes autólogas u otras fuentes para facilitar el tratamiento. A continuación se describen procedimientos adecuados para producir matrices acelulares de tejido.

Procedimientos de preparación de productos tisulares

La presente divulgación proporciona procedimientos para la preparación de una matriz de tejido no humano para xenotrasplante. Los procedimientos pueden incluir el contacto de una matriz de tejido que contiene colágeno con una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* o *Clostridium cellulyticum* en una cantidad y durante un tiempo suficiente para eliminar un epítipo de α -gal de la matriz de tejido, de este modo se prepara la matriz de tejido no humano para xenotrasplante. Una "cantidad y tiempo suficientes para eliminar un epítipo de α -gal de la matriz de tejido" es la cantidad de la enzima y el tiempo que la matriz de tejido se pone en contacto con la enzima para reducir la inmunogenicidad de la matriz de tejido preparada para el xenotrasplante. Se puede medir una respuesta inmune usando numerosos inmunoensayos, que incluyen ensayos de activación de monocitos, ensayos de fagocitosis y/o ensayos de estallido oxidativo, que son fácilmente conocidos por un experto en la técnica.

El término "reducir" con respecto a la inmunogenicidad de una matriz de tejido se refiere a una disminución estadísticamente significativa en tal nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o más.

Se puede usar cualquier concentración de enzima, tampón, pH, temperatura y tiempo de tratamiento adecuados siempre que sea suficiente para eliminar un epítipo de α -gal de la matriz de tejido. En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas para tratar una muestra de tejido como se describe en la presente pueden incluir aproximadamente 50 U/l a aproximadamente 400 U/l de una α -galactosidasa en un tampón a un pH fisiológicamente aceptable (por ejemplo, aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 8,0) y la temperatura (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C), por ejemplo, aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, o aproximadamente 400 U/l de una α -galactosidasa en, por ejemplo, un tampón fosfato, que tiene un pH de aproximadamente 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, o aproximadamente 8,0, a aproximadamente 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, o 40 °C. Los intervalos y valores intermedios a los intervalos y valores mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la invención. En una realización ejemplar, la muestra de tejido se trata con una α -galactosidasa a una concentración de 300 U/l preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. En otras realizaciones, la concentración de α -galactosidasa se incrementa a 400 U/l para la eliminación adecuada de los epítipos de α -gal del tejido recolectado.

Las especies que pueden servir como receptores de una matriz de tejido y donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como primates humanos y no humanos (por ejemplo, monos, babuinos o chimpancés).

En una realización, los procedimientos incluyen además al menos descelularización parcial del tejido. La etapa de descelularización se puede realizar antes del contacto del tejido con la galactosidasa o concomitantemente con el contacto del tejido con la galactosidasa. El tejido puede ser un tejido dérmico.

5 La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con una matriz de tejido de la presente invención. Los procedimientos pueden incluir preparar una matriz de tejido como se describe en la presente, identificar un sujeto mamífero que tiene un órgano o tejido que necesita reparación o mejora; y colocar la matriz de tejido en o sobre el órgano o tejido. En una realización, el sujeto es humano. Los procedimientos también pueden comprender la administración al sujeto de uno o más agentes, por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citoquina, una hormona o una quimioquina. El uno o más agentes pueden estar en la matriz de tejido colocada en el sujeto o se pueden inyectar o infundir en el sujeto por separado de la matriz de tejido. El órgano o tejido del sujeto puede ser, sin limitación, piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, periostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uretra, uréter, gingival o fascia (p. ej., fascia de la pared abdominal).

10 Como se usa en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un resultado beneficioso o deseado que incluye, pero sin limitación, alivio o mejora de uno o más síntomas. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento.

Como se usa en la presente, el término "colocar" una matriz de tejido incluye, sin limitación, ajuste, inyección, infusión, vertido, envasado, estratificación, pulverización y envoltura de la composición. Además, colocar "sobre" un tejido u órgano receptor significa poner en contacto con el tejido u órgano receptor.

20 Las alfa-galactosidasas de *T. reesei* y *C. cellulolyticum* adecuadas para usar en los procedimientos de la presente invención pueden ser de origen natural (nativas) o genéticamente modificadas. Por ejemplo, se pueden obtener enzimas adecuadas mediante, por ejemplo, fermentación de los organismos y el uso de un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas estándares. Por ejemplo, los sobrenadantes celulares se pueden recolectar y concentrar (por ejemplo, por ultrafiltración) y aplicar, por ejemplo, a una matriz de isoelectroenfoque para identificar fracciones que tienen actividad de alfa-galactosidasa. Las fracciones activas también se pueden purificar adicionalmente usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y/o filtración en gel. Alternativamente, se pueden usar técnicas de ADN recombinante para producir una alfa-galactosidasa de *T. reesei* y *C. cellulolyticum* que comprende la totalidad o un segmento de la proteína (un fragmento funcional de la proteína). Por ejemplo, se pueden usar técnicas de ADN recombinante para clonar una secuencia de nucleótidos que codifica un segmento o la proteína completa en un vector (tal como un vector de expresión) y transformar una célula para la producción de la proteína. Una alfa-galactosidasa de *T. reesei* y *C. cellulolyticum* que comprende la totalidad o un segmento de la proteína también se puede sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos estándares.

35 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de alfa-galactosidasas de *T. reesei* y *C. cellulolyticum* se pueden hallar en, por ejemplo, GenBank (ver, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov) o UniProt (ver, por ejemplo, www.uniprot.org/uniprot). En particular, *T. reesei* tiene tres genes (*aglII*, *aglIII* y *aglIII*) que codifican proteínas que tienen actividad alfa-galactosidasa para usar en los procedimientos de la invención, cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos se pueden hallar, por ejemplo, en Números de acceso de GenBank GI: 1580815 (SEQ ID NO:1); GI:74630547 (SEQ ID NO:2); GI: 1580817 (SEQ ID NO:3); GI:74630548 (SEQ ID NO:4); GI:1580811 (SEQ ID NO:5); 40 y GI:74630544 (SEQ ID NO:6). Se debe entender que cualquiera, dos o tres de las moléculas de ácido nucleico o proteínas de *T. reesei* se pueden usar en los procedimientos de la invención. *C. cellulolyticum* tiene un gen de alfa-galactosidasa único que codifica una proteína que tiene actividad de alfa-galactosidasa para usar en los procedimientos de la invención, cuya secuencia de nucleótidos y aminoácidos se puede hallar, por ejemplo, en los números de acceso de GenBank GI: 110588919 (nucleótidos 3121-4935 de SEQ ID NO: 7); y GI: 219998992 (SEQ 45 ID NO: 8).

Como se usa en la presente, los términos "molécula aislada", tal como "molécula de ácido nucleico aislada", "un polipéptido aislado", "una proteína aislada", es una que está separada de otras moléculas que están presentes en la fuente natural de la molécula. En una realización, una "molécula de ácido nucleico aislada" está libre de secuencias (tales como secuencias que codifican proteínas) que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias 50 ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, una molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kB, 4 kB, 3 kB, 2 kB, 1 kB, 0,5 kB o 0,1 kB de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. En otra realización, una molécula "aislada" puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros 55 productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una molécula que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, o aproximadamente 5% de moléculas heterólogas y que retiene la actividad de alfa-galactosidasa.

El ARN o el ADN que codifica las alfa-galactosidasas se pueden aislar, amplificar y/o secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes relevantes, como se describe en, por ejemplo, Innis et al. en PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), and Sanger et al., Proc Natl Acad Sci USA 74:5463 (1977)).

5 Una molécula de ácido nucleico así amplificada se puede clonar en un vector apropiado y caracterizar por análisis de secuencia de ADN. Además, los nucleótidos correspondientes a la totalidad o una porción de una molécula de ácido nucleico aislada para usar en los procedimientos de la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándares, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

10 En una realización, una molécula de ácido nucleico aislada para usar en los procedimientos de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos dada es una que es suficientemente complementaria con la secuencia de nucleótidos dada que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos dada, de este modo se forma un dúplex estable.

15 Además, una molécula de ácido nucleico para usar en los procedimientos de la invención puede comprender solo una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o una *C. cellulolyticum*. Dichas moléculas de ácido nucleico se pueden usar, por ejemplo, como una sonda o cebador. La sonda/cebador típicamente se usa como uno o más oligonucleótidos sustancialmente purificados. El oligonucleótido típicamente comprende una región de la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos
20 aproximadamente 7, preferiblemente aproximadamente 15, más preferiblemente aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o 400 o más nucleótidos consecutivos de una molécula de ácido nucleico para usar en los procedimientos de la invención.

25 La invención abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren, debido a la degeneración del código genético, de la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum* y, por lo tanto, codifican la misma proteína. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir polimorfismos de la secuencia de ADN que llevan a cambios en la secuencia de aminoácidos dentro de una población. Tales polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica de origen natural. Un alelo es uno de un grupo de genes que se producen alternativamente en un locus genético dado. Además, se apreciará que también pueden existir polimorfismos de ADN que afectan los niveles
30 de expresión de ARN que pueden afectar el nivel de expresión general de ese gen (por ejemplo, al afectar la regulación o degradación).

35 Por consiguiente, en una realización una molécula de ácido nucleico adecuada para usar en los procedimientos de la invención es al menos aproximadamente 40% idéntica, aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*.

40 Además de las variantes alélicas de origen natural de una molécula de ácido nucleico de la invención que puede existir en la población, el profesional experto también apreciará que se pueden introducir cambios de secuencia por mutación, lo que lleva a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, sin alterar la actividad biológica de la proteína codificada de este modo. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que llevan a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales". Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado de la secuencia de tipo salvaje sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que no están conservados o solo semiconservados entre homólogos de varias especies pueden no ser esenciales para la actividad y, por lo tanto, pueden ser probables objetivos de alteración. Alternativamente, los residuos de
45 aminoácidos que se conservan entre los homólogos de diversas especies pueden ser esenciales para la actividad y, por lo tanto, no serían objetivos de alteración.

50 Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican una variante de proteína que contiene cambios en los residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad. Dichas variantes de proteína difieren en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de origen natural, pero retienen la actividad biológica. En una realización, dicha proteína variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 40% idéntica, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*.

55 La identidad o similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos original se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácidos del mismo grupo basado en las propiedades de la cadena lateral común, *supra*) con los residuos de la molécula original, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir brechas en la secuencia de una primera secuencia de aminoácido o ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Posteriormente se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Las determinaciones del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático (ver, por ejemplo, Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Myers and Miller, (1988) CABIOS 4:11-17; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448).

Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifique una variante de proteína mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos, de modo que se introducen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de residuos de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándares, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como por mutagénesis de saturación, y las mutantes resultantes se pueden analizar para determinar la actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de forma recombinante y se puede determinar la actividad de la proteína.

Porciones biológicamente activas de una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum* también se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. Dichas porciones biológicamente activas incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y exhiben al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína para usar en los procedimientos de la invención puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Más aún, se pueden preparar otras porciones biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína, mediante técnicas recombinantes y se evalúa para determinar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de la proteína (por ejemplo, eliminación de epítopos de α -gal).

Otro aspecto de la divulgación proporciona proteínas quiméricas o de fusión que comprenden una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum* o un segmento de la misma. Como se usa en la presente, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende la totalidad o parte (preferiblemente una parte biológicamente activa) de una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum* unida operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido diferente de la proteína de alfa-galactosidasa). Dentro de la proteína de fusión, el término "operativamente unido" se considera que indica que la proteína de alfa-galactosidasa o un segmento de la misma y el polipéptido heterólogo se fusionan en el marco entre sí. El polipéptido heterólogo se puede fusionar con el extremo amino terminal o el extremo carboxilo terminal de la proteína de alfa-galactosidasa o segmento.

Las proteínas quiméricas y de fusión de la divulgación se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante estándares. En otro aspecto de la divulgación, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que origina proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente se pueden aparear y amplificar para generar una secuencia de genes quiméricos (ver, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*). Más aún, están disponibles en el comercio muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la divulgación se puede clonar en un vector de expresión de modo que el resto de fusión esté unido en el marco al polipéptido para usar en los procedimientos de la invención.

Se puede usar una secuencia señal para facilitar la secreción y el aislamiento de una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente se escinden de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la invención se refiere a una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*, proteínas de fusión o segmentos de las mismas que tienen una secuencia señal, así como a dichas proteínas a partir de las cuales se ha escindido proteolíticamente la secuencia señal (es decir, los productos de escisión). En una realización, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal se puede unir operativamente en un vector de expresión a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, tal como una proteína de alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*, o un segmento de la misma. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como, de un huésped eucariota en el que se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se escinde posterior o concurrentemente. La proteína posteriormente se puede purificar fácilmente del medio extracelular mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal se puede unir a la proteína de interés usando una secuencia que facilita la purificación, tal como con una etiqueta de polihistidina, una etiqueta de estreptococo, una etiqueta de FLAG, un dominio GST, etc.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, o fragmentos funcionales de los mismos, para usar en los procedimientos de la invención se pueden incorporar en vectores recombinantes adecuados. Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores, a saber, los vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención está destinada a incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que cumplen funciones equivalentes.

Los vectores recombinantes pueden comprender un ácido nucleico que codifica un polipéptido en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. En algunas realizaciones, esto significa que los vectores recombinantes pueden incluir una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se utilizarán para la expresión, que está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico para expresar (es decir, un vector de expresión recombinante). Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" significa que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia reguladora de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/ traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped. El término "secuencia reguladora" se considera que incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Methods in Enzymology: Gene Expression Technology* vol,185, Academic Press, San Diego, CA (1991). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada y similares. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, que incluyen proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente..

Los vectores de expresión recombinantes se pueden diseñar para la expresión de un polipéptido, o fragmento funcional del mismo, en células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células de insecto {usando vectores de expresión de baculovirus}, células de levadura o células de mamífero). Las células huésped adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, *supra*, e incluyen, por ejemplo, células de *E. coli*, células de *Bacillus*, células de *Saccharomyces*, células de *Pichia*, células NS0, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma. El ARN o ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de bases para optimizar el uso de codones en un huésped particular o mediante la unión covalente a la secuencia codificadora de un polipéptido heterólogo. Tal enfoque puede ser la base para desarrollar una vacuna subunitaria. Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a células huésped en las que se ha introducido un vector recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en la presente. Se entiende que dichos términos se refieren no solo a la célula presente particular sino a la progenie o la progenie potencial de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas

debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie, en efecto, puede no ser idéntica a la célula original, pero aún se incluye dentro del alcance del término como como se usa en la presente.

5 El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en la presente, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en la materia para introducir ácido nucleico extraño en una célula huésped, que incluye la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Se pueden encontrar procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook, et al. (*supra*) y otros manuales de laboratorio.

III. Matrices acelulares de tejidos

10 El término "matriz acelular de tejido", como se usa en la presente, se refiere generalmente a cualquier matriz de tejido que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, tejido adiposo, hueso y tejido conectivo nervioso se pueden usar para crear matrices acelulares dentro del ámbito de la presente divulgación. Las matrices acelulares de tejidos se pueden analizar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados se pueden inspeccionar con microscopía óptica para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, se pueden usar ciertos ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices de tejidos. En general, la ausencia de ADN restante u otros ácidos nucleicos será indicativo de una descelularización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros procedimientos que identifican componentes específicos de la célula (por ejemplo, antígenos de superficie) para determinar si las matrices de tejido son acelulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conectivo nervioso se pueden usar para crear matrices acelulares dentro del ámbito de la presente divulgación.

25 En general, las etapas involucradas en la producción de una matriz acelular de tejido incluyen la recolección del tejido de un donante (por ejemplo, una fuente animal) y la eliminación de células en condiciones que conserven la función biológica y estructural. En ciertas realizaciones, el procedimiento incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con o antes de la eliminación de células. En diversas realizaciones, la solución estabilizante detiene y evita la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de la proteasa y/o uno o más relajantes del músculo liso.

35 El tejido posteriormente se coloca en una solución de descelularización para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno sorbitano (20)), uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende TRITON X-100™ 1% en medio RPMI con Gentamicina y EDTA 25 mM (ácido etilendiaminotetraacético). En algunas realizaciones, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas realizaciones, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se añade desoxicolato de sodio 2% a la solución de descelularización

45 Después del procedimiento de descelularización, la muestra de tejido se lava completamente con solución salina. En algunas realizaciones ejemplares, el tejido descelularizado posteriormente se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con una solución de ADNasa preparada en tampón de ADNasa (HEPES 20 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico), CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, se puede añadir una solución de antibiótico (por ejemplo, gentamicina) a la solución de ADNasa. Se puede usar cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione una actividad ADNasa adecuada.

Después de lavar completamente el tejido con solución salina para eliminar la solución de ADNasa, la muestra de tejido se pone en contacto con una alfa-galactosidasa de *T. reesei* o *C. cellulolyticum*.

55 Después del tratamiento con una alfa-galactosidasa, se puede realizar un ensayo para determinar si la matriz de tejido que contiene colágeno se ha alterado de manera de reducir la respuesta inmune humana. Se pueden realizar varios ensayos adecuados. Por ejemplo, los ensayos adecuados pueden incluir ensayos de activación de monocitos, ensayos de fagocitosis y ensayos de estallido oxidativo.

En algunas realizaciones, el ensayo se puede realizar en un segmento o porción del tejido procesado, y otras porciones del tejido se pueden usar en procedimientos médicos o quirúrgicos posteriores. En otras realizaciones, el ensayo se

puede realizar en una o más muestras de un lote de muestras múltiples, y las muestras no sometidas al ensayo se pueden seleccionar posteriormente para usar en el tratamiento de un paciente.

5 En algunas realizaciones, después de que se forma la matriz acelular de tejido, se siembran células viables histocompatibles en la matriz acelular de tejido para producir un injerto que se puede remodelar adicionalmente en el huésped. En algunas realizaciones, las células viables histocompatibles se pueden añadir a las matrices mediante técnicas de cocultivo de células *in vitro* estándar antes del trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después del trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser mediante las propias células del receptor que migran hacia la matriz acelular de tejido o por infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz acelular de tejido *in situ*. Se pueden usar varios tipos de células, que incluyen las células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales) y/o células neuronales. En diversas realizaciones, las células se pueden aplicar directamente a la porción interna de la matriz acelular de tejido justo antes o después de la implantación. En ciertas realizaciones, las células se pueden colocar dentro de la matriz acelular de tejido para implantar y cultivar antes de la implantación.

10 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes adicionales.

Ejemplo 1: Identificación de alfa-galactosidasas microbianas para la eliminación de los residuos de galactosa alfa-1,3-unidos terminales del tejido

Las bases de datos disponibles públicamente se examinaron para identificar alfa-galactosidasas y organismos microbianos que producen alfa-galactosidasas disponibles comercialmente.

20 Se compraron enzimas o se purificaron parcialmente y se analizaron para determinar la actividad de alfa-galactosidasa en sustrato de p-nitrofenil alfa-galactosidasa (pNGP). Brevemente, las muestras se diluyeron en tampón fosfato pH 6,0 o HEPES 20 mM, NaCl 1,2 M, CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 20 mM, pH 7,4. Posteriormente se añadió pNGP a una concentración final de 1 mM y las muestras se incubaron a 37 °C. La actividad de la enzima se evaluó mediante la medición de la absorbancia resultante a 405 nm.

25 Las enzimas microbianas que tienen actividad en pNGP se analizaron posteriormente para determinar su capacidad para reducir y/o eliminar epítopos de α-gal en el tejido. Las enzimas y la fuente de alfa-galactosidasa analizadas se listan a continuación.

30 *Aspergillus niger* (los materiales parcialmente purificados se compraron de MarCor y Specialty Enzyme; se analizaron muestras de tejido con concentraciones de hasta 20.000 U /l)

Ag/A

Ag/B

35 Ag/C (Ag/C recombinante purificado se adquirió en Megazyme; se analizó en el tejido a concentraciones de hasta 100.000 U /l)

Ag/ Desconocido

Trichoderma reesei (material purificado de MPBio que tiene actividad en el tejido a 400 U /l, y bruto y parcialmente purificado (Q-HiTrap) de sobrenadantes de cultivo bruto)

40 Ag/I

Ag/II

Ag/III

45 *Guar* (forma recombinante purificada (*E. coli*) adquirida en Megazyme; analizada en tejido en concentraciones de hasta 100.000 U /l)

Phaseus

Cellvibrio mixtus (forma recombinante *E. coli*) adquirida en Prozomix; analizada en tejido en concentraciones de hasta 20.000 U /l)

5 *Clostridium cellulyticum* (forma recombinante (*E. coli*) adquirida en Prozomix; activa en el tejido a 4.000 U /l)

Saccharomyces cerevisiae (forma recombinante adquirida en CUSABIO y una fuente patentada; analizada en tejido en concentraciones de hasta 20.000 U /l, o 50 mg/ml)

Bacillus subtilis forma recombinante (*E. coli*) adquirida en Genway Biologics)

10 *Xanthomonas manihotis* (forma recombinante (*E. coli*) adquirida en New England BioLabs; analizada en tejido en concentraciones de hasta 50.000 U /l)

Escherichia coli (forma recombinante adquirida en U.S. biological; analizada en tejido en concentraciones de hasta 13 mg/ml)

15 La piel porcina se recogió de un matadero y se dividió en 1,3 mm mediante la extracción física de la epidermis y la grasa subcutánea. El tejido dérmico restante se descontaminó con ácido peracético. Tras la descontaminación, el tejido se procesó en condiciones asépticas. El tejido dérmico se descelularizó durante 24 horas con detergentes para eliminar las células viables. Los desechos celulares y los productos químicos residuales se eliminan mediante lavado en PBS. La matriz dérmica acelular porcina resultante (pADM) se almacenó a 4 °C hasta su uso.

20 Las preparaciones enzimáticas de los microbios identificados como portadores de actividad en pNGP se analizaron en dermis porcina en un tampón fosfato, pH 6,0 o tampón ADNasa TTM, pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 1,2 M, CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 20 mM) durante hasta 24 horas. Se prepararon secciones histológicas y se tiñeron con la lectina IB4 que reconoce específicamente el epítipo de α-gal. De la multitud de enzimas microbianas anotadas y/o analizadas que tienen actividad alfa-galactosidasa en pNGP, solo dos alfa-galactosidasas de *T. reesei* o un *C. cellulolyticum* fueron efectivas para eliminar los epítipos de α-gal de los tejidos. Específicamente, las secciones de tejido tratadas con alfa-galactosidasa parcialmente purificada y disponible comercialmente de *T. reesei* fueron tan efectivas como la alfa-galactosidasa de grano de café para reducir la tinción específica para los epítipos de α-gal en el tejido (ver, por ejemplo, Figuras 1B -1E). Además, la alfa-galactosidasa de *C. cellulolyticum* recombinante también fue tan efectiva como la alfa-galactosidasa de grano de café para reducir la tinción específica para los epítipos de α-gal en el tejido, pero demostró una mayor actividad en tampones de pH reducido (ver, por ejemplo, Figuras 1G-1J)

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> LIFECCELL CORPORATION

<120> ENZIMAS MICROBIANAS PARA LA REDUCCIÓN DE ALFA-GALACTOSA DEL TEJIDO BASADO EN COLÁGENO

35 <130> LIF,1164PCT

<140>

<141>

55

<150> 61/973,470

40 <151> 2014-04-01

ES 2 755 978 T3

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1

<211> 1677

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

10 <400> 1

```

gacaagcgaa ggccttactg caagaacgag tggcagtcta catcttctac agcggacgga      60
gagattatcg aactgcttgt atcatagctg gaacacacaa tgaccctca ctcgattgac      120
cgggccgcga ggccttccgt ctggagtggc cttgctcttc tcctctctac agcacacgca      180
atcgtgatgc ctgatggagt gactggaaaa gttccaagtc tggggtggaa ctcgtggaat      240
gcctaccact gogatatcga tgaaagcaag tttctctcgg ccgccgaagt cattgtgagc      300
tctgggcttc togacgcagg ctacaattat gtcaatattg atgactgctg gtcgatgaaa      360
gacggtcgtg tggacggcca tattgcagtc aacacaactc gcttccctga cggcattgat      420
gggctggcga agaaggtcca cgacttgggc ttgaagttgg gcatttacag cactgctggg      480
actgcaactt gtgctggcta ccctgccagt cttggctacg aggacgtcga tgccgctgat      540
ttgcccgact ggggcgtgga ctatctgaaa tatgacaatt gcaacgtccc ttcagactgg      600
caagatgaat acgtcgctg cgccccgac gccgtccaaa ccggcccca cggcacctgc      660
tcaaccgccc ttgagccaaa cctcgcccct ccgggctacg actggagcac ttccaagtca      720
gccgagcgct tcaacgccat gaggaacgcc ctggcgaagc agagccgcga gatcgtgctc      780
agcctgtgca tctggggagt ggccgacgtc ttctcctggg gcaacgagac aggcacagc      840
tggcgcatga gggcgatat ttgccccgaa tggggctccg tgacgcacat catcaacatg      900
aattcgttca agatgaattc cgtcggcttc tggggccaca acgacgcgga tatactcgag      960
gtcggcaacg gcaacctgac ggctgctgag acgcgagcgc actttgcgct gtgggcccgc     1020
atgaagtgcg cgctgctgat cgggacggat cttgctcagt tgtcgcagga gaacattgag     1080
ttgctgaaga ataagcatct gctggcgttt aaccaggaca gcgtctacgg tcagcctgcc     1140

```

ES 2 755 978 T3

```
acgccctata aatggggcgt caaccctgac tggaccttta actatacgaa cctgcccag 1200
tactgggccg gtccatcgtc aaaggggcat ctggtgctga tgatgaacac gctggatcac 1260
acggtgagaa aggaggcaa gtggtctgag attccggggc tgtctgcggg acggtatgag 1320
gtccgggatg tgtggacgga caagagcctt ggggtgcctca gctcgtacaa gacggctggt 1380
gcagctcatg acaccgctgt tattctggtt ggcaagaagt gccgaaactg gtgatggggt 1440
cggaagagga tggatatcga ctggacctct ggttgaatgc ttgtcatcgt ctgcatcctg 1500
acgggagccg gaaggactgt ggctgctgtc tgcttcagat ccagatggaa gcacccttat 1560
ccagactatc cagaaatcac aagccaattg caggattcca gtcttctcag ttactaggag 1620
gtgaataagt aaggtagaga tggctgactt gtctgctaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1677
```

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 2

ES 2 755 978 T3

Cys Asn Val Pro Ser Asp Trp Gln Asp Glu Tyr Val Ala Cys Ala Pro
 165 170 175

Asp Ala Val Gln Thr Gly Pro Asn Gly Thr Cys Ser Thr Ala Leu Glu
 180 185 190

Pro Asn Leu Ala Pro Pro Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Ser Lys Ser Ala
 195 200 205

Glu Arg Phe Asn Ala Met Arg Asn Ala Leu Ala Lys Gln Ser Arg Glu
 210 215 220

Ile Val Leu Ser Leu Cys Ile Trp Gly Val Ala Asp Val Phe Ser Trp
 225 230 235 240

Gly Asn Glu Thr Gly Ile Ser Trp Arg Met Ser Gly Asp Ile Ser Pro
 245 250 255

Glu Trp Gly Ser Val Thr His Ile Ile Asn Met Asn Ser Phe Lys Met
 260 265 270

Asn Ser Val Gly Phe Trp Gly His Asn Asp Ala Asp Ile Leu Glu Val
 275 280 285

Gly Asn Gly Asn Leu Thr Ala Ala Glu Thr Arg Thr His Phe Ala Leu
 290 295 300

Trp Ala Ala Met Lys Ser Pro Leu Leu Ile Gly Thr Asp Leu Ala Gln
 305 310 315 320

Leu Ser Gln Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Asn Lys His Leu Leu Ala
 325 330 335

Phe Asn Gln Asp Ser Val Tyr Gly Gln Pro Ala Thr Pro Tyr Lys Trp
 340 345 350

Gly Val Asn Pro Asp Trp Thr Phe Asn Tyr Thr Asn Pro Ala Glu Tyr
 355 360 365

Trp Ala Gly Pro Ser Ser Lys Gly His Leu Val Leu Met Met Asn Thr
 370 375 380

Leu Asp His Thr Val Arg Lys Glu Ala Lys Trp Ser Glu Ile Pro Gly
 385 390 395 400

Leu Ser Ala Gly Arg Tyr Glu Val Arg Asp Val Trp Thr Asp Lys Ser

ES 2 755 978 T3

405

410

415

Leu Gly Cys Leu Ser Ser Tyr Lys Thr Ala Val Ala Ala His Asp Thr
420 425 430

Ala Val Ile Leu Val Gly Lys Lys Cys Arg Asn Trp
435 440

<210> 3

5 <211> 2438

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 3

10

ES 2 755 978 T3

cacagttggc cccggactct gtggtggcca atcttcacga tgctcggcgc tccctctcct	60
agaaggctgg cggacgtcct cgccgtgacc gcgggactgg tggcctctgt tagggcagca	120
agtcccatct ccgtgtctgg caagtcgttt gccctcaacg gcgacaacgt ctcgtaccgc	180
ttccacgtcg acgacgactc taaggacctc atcggcgacc actttggcgg ccttgccacg	240
gaagatggcg tcttcccccc catcatcggc cccatccagg gctgggtcga cctcatcggc	300
cggcagcggc gcgagttccc cgacctgggc cgcggcgact ttcgcacgcc cgcggtgcac	360
atccggcagg cggcgggcta cacggtcagc gacttccagt acaagtgcga ccgctcgtc	420
gagggcaagc cggcgtcgc cggcctgccg tcgacgtttg gcgacgccgg cgatgtgtcg	480
actctggtcg tgcacatgta tgataactac agctccgtgg ccgccgacct gacctactcc	540
atcttcccc aatacgacgc cattgtgcgc agcgtcaaca tcaccaacat gggcaagggt	600
aacatcacca ttgagaagct cgccagcttg agcgtcgatc tgccgtatga ggactttgac	660
atgctggagc tcaagggatga ctgggtcgc gagggaaagc ggctgcgtcg caagttgac	720
tacggctctc agggtttcgg gagcacgact ggctattctt cccatctcca caacccttc	780
ttctcgtcga tcacgcctac gacgaccgag tcccaaggag aggcatgggg cttctccctt	840
gtgtacactg gtccttctc cgtcgaggtc gaaaagggtt cgcagggtct cacgcgagcc	900
gccattggcg tcaaccctta tcaactgtcg tggccgttgg gccctggcga gacctcagc	960
agccccgagg cggttgccgt cttctctacc actggcgttg gcggaatgtc gcgaaagttc	1020
cacaacctgt accgcaagca tctgatcaag agcaaattcg cgacgcagat gcaccccgtc	1080
ttgctcaaca gctgggaggg cctcggcttc gactacaacg acaccacat tctgcatctg	1140
gcgcaggagt ctgccgatct cggcatcaag ctgtttgtgc tggatgatgg ctggtttggc	1200
gtcaagcatc ctogagttag tgacaatgct ggcctggcgg actgggaggc gaacccaag	1260
aggttcccgc agggcctgcc agacttcatt agcgacgtga caaagctcaa ggtggccaac	1320
tcctctgatc atctgcagtt tggcctctgg ttcgagcctg aaatggtcaa cccaactca	1380

ES 2 755 978 T3

accctataca tggaacacccc ggactgggcg attcacgccg ggtcgtaccc tcgtaccttg 1440
 acgaggaacc agctggtgct caacgtcgct ctcccagagg tgcaggattt catcattgag 1500
 tcgctgtcca acattctgag caacgccagc atttcgtacg tcaagtggga caacaaccgc 1560
 ggcatccacg aggcccctta ccccgggctc gactacgcct acatgctggg cctgtaccgc 1620
 gtctttgaca cgctgtcgtc aaagtcccc aatgttcgct gggaggggtg cgcgtctggc 1680
 ggcggccgct tcgatcccgg cgtgctgcag tactttcctc acatctggac gtctgacgac 1740
 acggatgccg tggagcgcac tgcgatccag tttggcacgt cgctcgtgta tccgccgtcg 1800
 gccatgggag cccacgtctc tgccgtaccg aacggccaga cgcagcgcac gacgtcgatt 1860
 gccttccgcg cccacgttgc catgatggga ggttcgttt gcttcgagct caccctgcg 1920
 gagatgccgg aggacgacaa ggcgcagatc cggggcatca ttgcgctggc ggaaaagggtg 1980
 aacccattg ttgtcaaggg cgacatgtgg cggctgagcc tgccggagga gtccaactgg 2040
 ccggcggcgc tcttcatctc gcaggacggc agccaggcgg tgctgttcta cttccagatc 2100
 cgggccaaca tcaacaacgc gtggccggtg ctgcccgtgc agggcctgga tgcgtcggcc 2160
 aagtacaaga ttgacggcaa ccagacgttc tcgggggcca cgctgatgaa catcgggctg 2220
 cagtatcagt tcaatgggga ctatgacagc aaggtggtgt ttttggagaa gcagacatga 2280
 gctgattttg tgaaccatc accatgacct agatgacct caggctttgt ttgatgcatc 2340
 gtttcttcag tagcattat gtatgtagc ttagcattca gtagttaata cacagcaggc 2400
 gttttctgac tgaaaaaaga aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2438

<210> 4
 <211> 746
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

<400> 4

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

ES 2 755 978 T3

Gly Trp Val Asp Leu Ile Gly Arg Gln Arg Arg Glu Phe Pro Asp Leu
85 90 95

Gly Arg Gly Asp Phe Arg Thr Pro Ala Val His Ile Arg Gln Ala Ala
100 105 110

Gly Tyr Thr Val Ser Asp Phe Gln Tyr Lys Ser His Arg Val Val Glu
115 120 125

Gly Lys Pro Ala Leu Arg Gly Leu Pro Ser Thr Phe Gly Asp Ala Gly
130 135 140

Asp Val Ser Thr Leu Val Val His Met Tyr Asp Asn Tyr Ser Ser Val
145 150 155 160

Ala Ala Asp Leu Thr Tyr Ser Ile Phe Pro Lys Tyr Asp Ala Ile Val
165 170 175

Arg Ser Val Asn Ile Thr Asn Met Gly Lys Gly Asn Ile Thr Ile Glu
180 185 190

Lys Leu Ala Ser Leu Ser Val Asp Leu Pro Tyr Glu Asp Phe Asp Met
195 200 205

Leu Glu Leu Lys Gly Asp Trp Ala Arg Glu Gly Lys Arg Leu Arg Arg
210 215 220

Lys Val Asp Tyr Gly Ser Gln Gly Phe Gly Ser Thr Thr Gly Tyr Ser
225 230 235 240

Ser His Leu His Asn Pro Phe Phe Ser Leu Ile Thr Pro Thr Thr Thr
245 250 255

Glu Ser Gln Gly Glu Ala Trp Gly Phe Ser Leu Val Tyr Thr Gly Ser
260 265 270

Phe Ser Val Glu Val Glu Lys Gly Ser Gln Gly Leu Thr Arg Ala Ala
275 280 285

Ile Gly Val Asn Pro Tyr Gln Leu Ser Trp Pro Leu Gly Pro Gly Glu
290 295 300

Thr Phe Ser Ser Pro Glu Ala Val Ala Val Phe Ser Thr Thr Gly Val
305 310 315 320

Gly Gly Met Ser Arg Lys Phe His Asn Leu Tyr Arg Lys His Leu Ile
325 330 335

ES 2 755 978 T3

Lys Ser Lys Phe Ala Thr Gln Met His Pro Val Leu Leu Asn Ser Trp
 340 345 350

Glu Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Asn Asp Thr Thr Ile Leu His Leu Ala
 355 360 365

Gln Glu Ser Ala Asp Leu Gly Ile Lys Leu Phe Val Leu Asp Asp Gly
 370 375 380

Trp Phe Gly Val Lys His Pro Arg Val Ser Asp Asn Ala Gly Leu Gly
 385 390 395 400

Asp Trp Glu Ala Asn Pro Lys Arg Phe Pro Gln Gly Leu Pro Asp Phe
 405 410 415

Ile Ser Asp Val Thr Lys Leu Lys Val Ala Asn Ser Ser Asp His Leu
 420 425 430

Gln Phe Gly Leu Trp Phe Glu Pro Glu Met Val Asn Pro Asn Ser Thr
 435 440 445

Leu Tyr Met Glu His Pro Asp Trp Ala Ile His Ala Gly Ser Tyr Pro
 450 455 460

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

Val Gln Asp Phe Ile Ile Glu Ser Leu Ser Asn Ile Leu Ser Asn Ala
 485 490 495

Ser Ile Ser Tyr Val Lys Trp Asp Asn Asn Arg Gly Ile His Glu Ala
 500 505 510

Pro Tyr Pro Gly Leu Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Gly Leu Tyr Arg Val
 515 520 525

Phe Asp Thr Leu Ser Ser Lys Phe Pro Asn Val Arg Trp Glu Gly Cys
 530 535 540

Ala Ser Gly Gly Gly Arg Phe Asp Pro Gly Val Leu Gln Tyr Phe Pro
 545 550 555 560

His Ile Trp Thr Ser Asp Asp Thr Asp Ala Val Glu Arg Ile Ala Ile
 565 570 575

Gln Phe Gly Thr Ser Leu Val Tyr Pro Pro Ser Ala Met Gly Ala His
 580 585 590

ES 2 755 978 T3

Val Ser Ala Val Pro Asn Gly Gln Thr Gln Arg Thr Thr Ser Ile Ala
595 600 605

Phe Arg Ala His Val Ala Met Met Gly Gly Ser Phe Gly Phe Glu Leu
610 615 620

Thr Pro Ala Glu Met Pro Glu Asp Asp Lys Ala Gln Ile Pro Gly Ile
625 630 635 640

Ile Ala Leu Ala Glu Lys Val Asn Pro Ile Val Val Lys Gly Asp Met
645 650 655

Trp Arg Leu Ser Leu Pro Glu Glu Ser Asn Trp Pro Ala Ala Leu Phe
660 665 670

Ile Ser Gln Asp Gly Ser Gln Ala Val Leu Phe Tyr Phe Gln Ile Arg
675 680 685

Ala Asn Ile Asn Asn Ala Trp Pro Val Leu Arg Leu Gln Gly Leu Asp
690 695 700

Ala Ser Ala Lys Tyr Lys Ile Asp Gly Asn Gln Thr Phe Ser Gly Ala
705 710 715 720

Thr Leu Met Asn Ile Gly Leu Gln Tyr Gln Phe Asn Gly Asp Tyr Asp
725 730 735

Ser Lys Val Val Phe Leu Glu Lys Gln Thr
740 745

210> 5

<211> 2004

5 <212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 5

10

ES 2 755 978 T3

gacaagccaa aggcgcaaag cgttcagtta catcgcagca caatgtcgcc cagtgtgca	60
gttctcattc ccctcgcagc ggcagttctg ctctgtcctg tggtcggtca aacgcaatgc	120
ggcggcaatc tgtactcc ggggacgctc aacttcactc tggagtgcta caatgcgttt	180
caggactgcg tcgctcagtt tgaggccaac gcaagccaag tcgactgcaa cgacggcaag	240
ggaaacctgt tcatgcaaca acaggccaac ttgggggcct cgccaggaag ccagaacaac	300
gacgccatca ttgcctttca ggacattcgc gatctctgtc tgctcagcgg ttcaacaact	360
gcaacgtggg gatatagcga caaccagtgg tattgggcgg ctgccgaaga tgcctgctac	420
acaaacgatc ccacgaggac cgacgttgtc aagactcacc cggcgcogtt ttgcatccag	480

ES 2 755 978 T3

```

aaccgcgact cttcactgcc tgagtgtac ccacagccgg atgccacccc tcccggcggc      540
ccactcaagg tcatcaagac ggccaagacg cgaaacgggt tcaagtctc agcccgaggc      600
tggaatacct acggcgtcca agctctggtc aacggttccc aggtcgtgcc gtcctttgct      660
ggacagtccg gtctgttcta caccagaag ttogtgcgaga ctcagtgtgg agttcttgcc      720
cgacccgagt tcaagaaggc tgggtacgat ctctgcagcc ttgattcggg ttggcaggct      780
actaccgccg ttgatcagca tggtcgaatc atctacaaca ccacgcgatt caacctcccc      840
gagcttgctt catggctaca caagagggat ttgaagctcg gcgtatacat taccctggc      900
gtgccatgtc tggctcacia ccaaaccatc ctcgccacca acatcaagat caaggatgtc      960
ttgaatggga acaacgatca gatcaactgt gactttgact tccgcaaaga tgggtgtccag     1020
cagtggcacg attccgtcgt cgacaatgg gcttcctggg gcgtggacat gctcaaactg     1080
gactttctga cgctggctc cccttccaat ggcgcaaacc tcgctgtgga cagttcagat     1140
gctgttcgag cataccagaa ggcaatcaag aagtcaggac gaaaaattcg cctcgacatc     1200
tcgtggaagc tttgccgcaa cgaaacctgg ctacctatct ggagcgacct tgctgagtca     1260
atgcgactg atcaggatct cgacaactac ggcaccaaca ctttgatggc atggcaggtc     1320
ggccagcgcg cgattgagaa ctacaggcag tacatcggtt tgcaagcgca gagaaatgtc     1380
cccctcacga tctatcctga tatggatgct cttttcacgg tcaaccccga gcatctcgcc     1440
ggtgtaaacg aactattcgc ctatacggtt cagaaccact ggcttgagc tggcgccaac     1500
ctcatcattg gtggcgatat ggagcaggtc gatgctctgg ggctcaagct gactaccagc     1560
aagcaatcga ttgatgcggc agactttttt gcaaagtatc ccatgcagcc tcgtaacccc     1620
ggaaccgga gcaacgccgc caagcagctc caggcctgga tcggtggccc ttcggatgac     1680
cacgaggctt atgtgctcat tgtcaactac gggccagact tggggaatgg tggcttttca     1740
accaagctgt atggaaagca gaaagtgaca gtgtcgttga aggatcttgg tatctctggc     1800
tccgcctgga cttttaccga catatggtcc ggcaagtcca gcagagtgac tgggtcctac     1860
tctgcctggc tcaccgaggg cgagtcccag cttctgcgcc tgaaaaggac tcactagtga     1920
acacgaagac gtatagaggt ttctagagtt tagcgaagca atacacttta taatccctaa     1980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa                                             2004

```

<210> 6

<211> 624

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 6

```

Met Ser Pro Ser Ala Ala Val Leu Ile Pro Leu Ala Ala Ala Val Leu
1           5           10           15

```

ES 2 755 978 T3

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

ES 2 755 978 T3

His Lys Arg Asp Leu Lys Leu Gly Val Tyr Ile Thr Pro Gly Val Pro
 275 280 285

Cys Leu Ala His Asn Gln Thr Ile Leu Gly Thr Asn Ile Lys Ile Lys
 290 295 300

Asp Val Leu Asn Gly Asn Asn Asp Gln Ile Asn Cys Asp Phe Asp Phe
 305 310 315 320

Arg Lys Asp Gly Val Gln Gln Trp His Asp Ser Val Val Ala Gln Trp
 325 330 335

Ala Ser Trp Gly Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Phe Leu Thr Pro Gly
 340 345 350

Ser Pro Ser Asn Gly Ala Asn Leu Ala Cys Asp Ser Ser Asp Ala Val
 355 360 365

Arg Ala Tyr Gln Lys Ala Ile Lys Lys Ser Gly Arg Lys Ile Arg Leu
 370 375 380

Asp Ile Ser Trp Lys Leu Cys Arg Asn Glu Thr Trp Leu Pro Ile Trp
 385 390 395 400

Ser Asp Leu Ala Glu Ser Met Arg Thr Asp Gln Asp Leu Asp Asn Tyr
 405 410 415

Gly Thr Asn Thr Leu Met Ala Trp Gln Val Gly Gln Arg Ala Ile Glu
 420 425 430

Asn Tyr Arg Gln Tyr Ile Gly Leu Gln Ala Gln Arg Asn Val Pro Leu
 435 440 445

Thr Ile Tyr Pro Asp Met Asp Ala Leu Phe Thr Val Asn Pro Glu His
 450 455 460

Leu Ala Gly Val Asn Asp Thr Ile Arg Tyr Thr Val Gln Asn His Trp
 465 470 475 480

Leu Gly Ala Gly Ala Asn Leu Ile Ile Gly Gly Asp Met Glu Gln Val
 485 490 495

Asp Ala Leu Gly Leu Lys Leu Thr Thr Ser Lys Gln Ser Ile Asp Ala
 500 505 510

Ala Asp Phe Phe Ala Lys Tyr Pro Met Gln Pro Arg Asn Pro Gly Thr

ES 2 755 978 T3

ctattgatgc actagattgt gccgttttca agaaacttct gttaggtatt atttaaaaat	60
taccogggta gaactatggt attttagtcc atatatgggt taaattgta tatctgaatt	120
tgtaaattgg ttaaggaggc aaacatgta aaaactatga gtatacttct accatgctta	180
ttgatatttt cacttatatt cagtgtacaa atacctttat cagcttcagc agcaaagtgt	240
gaactcctaa agcagttoga catggaacag gtaaaaataa cagatacata ttatgtaa	300
gcacttaata aagaggttgc ctacttgca gcaattgatc caaaccttt gttgggtgggt	360
tttaagaaaa cagctggctt atcaacaact tatagctatt atggagggtg ggaaaacaat	420
accctgattc aaggccatac catgggacat tacatgtcgg cacttgctca ggcttataaa	480
aaactaagt ccgacccgac agtaaatgca gatttgaaaa gccgtatcga tttgattata	540
tccgaattgc aggcttgtca gaataaaaac ggcaatggat atttgtttgc aactccggct	600
accaatttg atgttggtga aggaaaggcg tccggttcaa gctgggtacc gtggtatacc	660
atgcacaaaa tcatgtccgg tcttcttgac atttataaat ttggaggcaa ccaaaccgca	720
ttgacaatag caaccaactt gggaaattgg atttacaata gagtaaacgc ttgggattct	780
gcaacacagt caagggtatt ggggtgtgag tatggaggaa tgaatgactg tctctatgaa	840
ttgtataagc tgactggtaa tggcaacat ttaacagcag cacataaatt tgacgaaaat	900

ES 2 755 978 T3

tcactattta acaccatcgc tgcaggcaca aacgttttac cgggaaaaca tgccaataca	960
actatcccga aattcatcgg tgctttgaat cgctacagca ctctaggaac atcagaatca	1020
tcataacttaa aagcggcaca gcagttctgg gccatagttt tgaaagacca tacatatgta	1080
acagggggca acagcgaaga tgagcgtttc agggacgctg gcaaactgga tgcatacagg	1140
gataatgtaa ataataaac ttgtaatgta aataatatgc tgaagctgac taaagagctg	1200
ttcaaggcaa cgggcgacgt taaatatgca gattactatg agaatgcatt gataaacgaa	1260
atcatggcct cacagaatcc ggaaaccggg atggctacgt acttcaaggc tatgggaact	1320
ggatatttca aggtattcag ttcccaatc aatcatttct ggtgctgtac gggaacggga	1380
atggagaatt tcacaaagct gaatgacagc ctgtattata ataatggttc cgacctgtat	1440
gtaaacaatg atctgagttc taccctgaac tggagcggaa aggttctttc actgacacag	1500
caggccaatc tgccattatc agataaagta acctttacta tcaacagtgc ttcttcatca	1560
gaagtgaaaa ttaaattcag gtcaccagca tggattgctg caggacaaaa tattacggtc	1620
aaagttaacg gtactccaat taatgttgac aaggcgaatg gctatcttga cgtcagcaga	1680
gtgtggcaga caggagatac ggttgagttg accctgccca ccgaagtaag ggtatccaga	1740
ctgactgaca gcccataac ggtagccttt acatatggtc ccgtagtatt gagtgcaggt	1800
cttggaaactg aaagcatgac aactcaatca cacggggctc aggtttttaa agcaacgaaa	1860
aatgtgacta tcaaagagac tattaatatt aataccgccc ccagtcccag cattgacaat	1920
tggtctgcca atataaagaa caatttggtt caaacgcctg ggaagctgga atttacattg	1980
aaaaataaccg acgaggataa ccatttggtt ttcacacctc attatcaaag atacaaggac	2040
aggtatggta tctacttcaa gctgggaacg tatgagggta aacaaccac ggataatttg	2100
cttgacaatc cggatattga gtcagggaac accacaggat ggactgtgaa tgggtcgggt	2160
acaattgcct cttcaacagt acaaaagcac tcgggaagct atagtctgct gcatacaggc	2220
aggacaggag cctggaacgg gcctattcag aacattaca caaaagttca gaatggtaac	2280
acgtatactt gttccggctg ggtaaactg gacaacactg ccagtgcccc gataacaatg	2340
actatcagaa aaacggatga caacggaact tcctatgtca atattgccac tgctaccgga	2400
agcaatagtt cctgggttca attgtcaggt aactatacct taaatgttac aggtgcattg	2460
actgacctga gtatatattt tgaaggaccg gacagcggca ccaattttta tgtggatgat	2520
gccttagtta aggtttatgg caaaactacc ttctatcaga atacttcttt tggcgggtact	2580
gcggtgtcgc tgaatccagg cagctatact actgctcagc tcaactgctgc aggtatttct	2640
gataactggg catcatcaat caaaatacct gaaggctata cggttgagat ttatgatgat	2700
gacaatttca ctggtacaaa gtggtctttt agtgcagata attcgaactt tatagaagcc	2760
ggatgcaatg acaaaatgtc ttccgtgaaa attttcccc ctctgagtca agtgaagtat	2820

ES 2 755 978 T3

ggggatatta acagggacgg tactgtagat actattgact ttgcactttt aaagcagttt 2880
 ttgttgggtg ctcaggtcac aattgattcg gtagcggctg atttggacgg cgatgaatct 2940
 gtgacggcaa tggattttgc ggtatttaag aagtatctgc tgggacaaat aacagagttg 3000
 cctgcttttt gatgttccga tgggaattatt tgattccaaa tttattgata tagcaaatca 3060
 gccgattcgt tctggtttta gaacagtcta aataacgaaa atttaggggg gataaataga 3120
 atgaaaaaag ttcgtacagt cagtacaatt atcttttttag gacttatgat taccgtaatt 3180
 atggttttga atactgggtc atgggataac ggtcttgcaa aaacaccacc gatgggatgg 3240
 aacagttgga acatattcca tggagacatt aatgaaacta aaatcaaaca gattgctgat 3300
 accatggtaa gctcgggtat gaaggaagct ggctatgtat acctgaatct ggatgataac 3360
 tggatggcaa atcctgcaag agattccaat gggaaacttg gggccgatcc tacacgattc 3420
 ccaagtggga ttagggcttt agctgattat gtacatgcaa aaggtctcaa actagggata 3480
 tacggatgtc gtggaacaat gacctgtatg aatattcctc aaagcgggaag caagggttat 3540
 gaggacaagg atgcaaagac atttgcttca tggggaattg attacctaa atatgataac 3600
 tgcaatatac ctaacggaag tgacatgaaa accgattacc agaaaatgca gaccgctctt 3660
 gcaaattgcg gaagaccaat agtattcagt atatgtgcat ggggatatca gagctggatg 3720
 cctgcaacag gtaattttatg gcgtactacc ggggatttcg ctgataaagtg ggataacgga 3780
 aacgaatggt tcaaaggtat tataaatgca attgatggta atgcacaata cacaagttca 3840
 gccgcacccg gtgcatggaa tgatcctgat atgcttgaaa tcggaaacgg tggatgtaca 3900
 acagaggaat accgtacaca gatgagtatg tggagtatga tggcttctcc ccttattgca 3960
 ggaaatgata taaggacat gtcacagaca acaaaggata ttctattgaa taaggaagta 4020
 atagcaatag accaggatcc tgcaggagtt cagggaaaaa gagttaaag tgcaaatggt 4080
 cttgagattt gggtaaaacc actgggtacg aatggtacaa ctaaggcagt tgctttattg 4140
 aacaggaatt cggcaacatc caatattaca gttaattggt cagatatagg tgtaagtgga 4200
 agtgttacgg tcagggattt gtgggctaaa tctgacaaaag gcagttttac gggctcatac 4260
 acagcgtctg ttccttcaca tggaaactgtt ttgattaaga tttccactga gccgccggca 4320
 cctgttgatg caacaaagca aatagaagca gagagttata gcaatcagtc aggaatccag 4380
 acagaaacct gttcgggaag cggagaggat gtaggcttta tcgaaaacgg ggactatact 4440
 gtttacagca ttgtggattt cggcgatgga gtcggaggct tccaggcaag agtagcaagt 4500
 gcgaccagcg gaggcaatat tgagattaga cttgacagcc ctgccgggac ttttaattgga 4560
 acctgtccgg ttgccggaac aggggattgg cagacttata ctgatgtaa atgtactgtc 4620
 agcggggcaa caggaaaaca tgatgtatac cttgtattta aaggagatag cggatattta 4680

ES 2 755 978 T3

ttcaacctta attggttcac atttactcca ggaagtgtca atacgggtac attgggtgat 4740
 ttaaattccg acggacaagt agacgcgata gatttacagt tattgaaaa gtatatatta 4800
 ggactgggag caatcgaaaa tacaaaactg gcagatttgg atgccaacgg agatatcaat 4860
 gcaatagatt tttcaactgct gaaacaattc ttactaggca taaggaccag ctttccgggg 4920
 cagggggcag cataatntag cgatatcctg ataggaggtt gaaaatgaaa agaaagattt 4980
 tatctgttct tttgcttgtc acaatgacta cagcattggt ttcagctaca ccgatgaata 5040
 ccgcttcagc cgcaagtacg gactttgtac tagacggaaa caatatcaaa gcgggcaaca 5100
 tcaacggctc cacatttaag gggttcggcg tcctcagtgg aaacagctca agtgcactgt 5160
 tgatggatta caagtccgag catcctgaga aatatacaga attactgcaa attctgttcg 5220
 gtggaaaaaa tccgattatg acacatgtca aaattgagat gggtaatgac cgtaacaact 5280
 ccaccggacc agatccctca acaatgcggt gggaaaatga gacggctaata gtcaaaagac 5340
 accccggatt tcaacttgcg gctgatgcca agaagggtgaa cccaatctt aaagtcagca 5400
 tattacgctg gaatgcccc ggttgggcaa atagcaatga taagatttat acatggtata 5460
 agaacaccat attagcagca taccgtcaat atggttatat gattgattac gtaaaccggg 5520
 ggtcaacga acaaacaccg aatttaacct ggactaagca atacgccag cgtatcaaaa 5580
 cagacagtac aggttttaac aatgctgaag aacgggcact ttacaacaat attaaggtgg 5640
 tgatttccga cgaagtttcc gtcggttcct tcggggatga tatggtcagt gattccaccc 5700
 ttcgtgatgc cgtatctgtc gctgcatatc actataatac tgatgacaat agcttgggaa 5760
 gtttcaaaca gcttgccgaa tcctttgaca aagagggtgtg gaatagtgaa gcacaggcca 5820
 cttttagtaa ttcgtccttt cgtcccaata acaatatgaa agatccaaca gtagcaggaa 5880
 ccggcatagg aggcacaaat gggccactgg aaatgggaaa tactgttata aaggggttg 5940
 taaattcaag gaggacacat tttatctatc agccagtcac tgggtccttc tatgagggtg 6000
 ggcagtactc ttttaaggaa ttggtatccg cacgtgatcc ttggtccggg tggattcact 6060
 atgatgccgg tcttgtcata cttcggcatt tcagttgggt ttcaaaggct ggctgggaaa 6120
 atgagagtaa taccgcaggg gtttgagggg ctgtacctca ggcgagtttc acaggtgcga 6180
 cgggtacgaa tcctgttaat gggcgtaatg gactcccag ttatatgaca cttagcttctc 6240
 cggacaagca tgatttttca actatcttca ttaacgatag tgaatattcc aaaacctaca 6300
 cgtttaagac catcaatatg gcttattcgg gaaaccctc gctggaagta tgggaaacta 6360
 gagcagctga taagggagca tcttttaata gtaattacat gaagtacact ggaacggttt 6420
 ccacaaatag cagcggagtt tatacagtaa acgtaaaacc ttattcgatt gtacagtta 6480
 caacattaag taacagtgga aaagcagagt tcaatacgcc tcttccgggtg gagggggacc 6540
 gcccggttct ggatacagac aagacaggtt caatgcagga taccagggat aatatattat 6600

ES 2 755 978 T3

atgctgacaa ctttgattat tccagcaaaa ctgccoctgt catagcggag gggggacaaa 6660
 tcacaggaac ccaaagttat atagattccc gaggaggctc aaaaagtgct ataccacgtt 6720
 atgccagcga cagaaacggt gcatttgaag tgtatcttcc tgacgggtcc agcaactata 6780
 tccttcgcca acaggtgaat cagtcaagta tggggcttgg gggcacatgg aataatggta 6840
 atccaatcac cggcattgga gataaccggt ggatgaacta taaggcaagt gtggatgttt 6900
 catttgaaca caacagtaca gagggcggta acaattatgc tgcaatcggg gccagacagc 6960
 aggggtggta aaattcacac tacttaaatg gtactcctta tatactgaaa ttctggtttg 7020
 acggcgggtg gtcgctacta gtaaattgaa gttccgtggc aaatggtaat gtagcaagcg 7080
 gctcgggtgg agtgaaaatc agtggtttta atacagctta taatgcatgg cataacatct 7140
 ctatcatggt tgcagacaat aagggtgactg cgtatctgga caataccatc ctttatacct 7200
 atacagatac taccoaaaga ttgtccgggc gtattgatct ggcaagcggc tattacaata 7260
 cttgttttga caatttgaag gttgaaacaa tagacgggta tgcaccttac tactctgaaa 7320
 tgctggacaa tctggaaatg tacgatttgt cttctgtttc tgctacaaag cttgtttacg 7380
 gcggttcttg ggcacatgaa aacggcaaat ccatgtacaa ttaccaacga tcactttcca 7440
 cgagccaggg aataggtgct actattcagt attcattcac tggcaccggg ctggacattc 7500
 ttggagccaa caacggttct gctaagttag aggtaactgt tgatggaaga gttgttaatt 7560
 cctcagtggg aacctagggt tcaggaatt tacaccaaaa ctttacgctt cacggtcttg 7620
 agtacggtaa gcatacgggt tgtttgaagg tgttaagtgg tactatggtt gtcgatgctg 7680
 ttgggggttg tgcaaacata gccgggtgctt cggagatacc cgttgaacaa tctgcgtatt 7740
 caaggataga agcagagagc tacagcaacc agtcaggaat ccagacagaa acctgttcgg 7800
 aaggcggaga ggatgtgggc tttgttgaaa acggcgacta tactgtttac aacaatgtgg 7860
 atttcggcga tgggtgctgga ggcttccaag caagagtagc aagtgcaacc agtggaggca 7920
 atattgagat caggcttgac agctctaccg ggactttgat aggaacttgt cctgttgccg 7980
 gaacagggga ttggcagact tatactgatg caaaatgtac tgtcagcggg gtaacaggaa 8040
 aacatgatgt ataccttga tttaaaggag atagcggata tttatttaat cttactgggt 8100
 ttacatttag tgagaaaact gtcataggga atttggggtga tataaactcg gacggacaag 8160
 tagatgcaat agatttacag gtattgaaaa agtatctttt gcaactaggg gaaattggag 8220
 atacgaagct ggcagatttg gatgccaacg gagaaattaa cgcaatogat ttttcattac 8280
 tcaaacaatt tttactgggt actattatta gttttccggg agaagcacta taaggggaca 8340
 tcaccgttcc atatgtgtga agaattacaa atataatata aggaggcttt tttggtatgt 8400
 tgagaaagaa aattttatgt atatttcttg tgactgtatt aatgctaact atattaccaa 8460

ES 2 755 978 T3

tacctcaaca gacggtaatg gctgatacag gggacttaa ggaacttaa ggaactgaca 8520
tctacaacgg attaagggga ctgaatttta acgaggggtg gaaattcaat aaggggatg 8580
taagcaacgg ccagagtacc ggtataatg acagcggctg gtcaggtgtt aactgccac 8640
atgactggag tatttataac actttaata aatcctcagc agcgggtgca ggaggaggtt 8700
atctggatgg aggaatcggg tggtagagga aaacctttac cgtaccttcg gattatacag 8760
gaaagaaggt attcatt 8777

<210> 8

<211> 604

<212> PRT

<213> Clostridium cellulolyticum

<400> 8

ES 2 755 978 T3

Met Lys Lys Val Arg Thr Val Ser Thr Ile Ile Phe Leu Gly Leu Met
 1 5 10 15

Ile Thr Val Ile Met Val Leu Asn Thr Gly Ala Trp Asp Asn Gly Leu
 20 25 30

Ala Lys Thr Pro Pro Met Gly Trp Asn Ser Trp Asn Ile Phe His Gly
 35 40 45

Asp Ile Asn Glu Thr Lys Ile Lys Gln Ile Ala Asp Thr Met Val Ser
 50 55 60

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

Trp Met Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ser Asn Gly Asn Leu Arg Ala Asp
 85 90 95

Pro Thr Arg Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ala Leu Ala Asp Tyr Val His
 100 105 110

Ala Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Gly Cys Arg Gly Thr Met Thr
 115 120 125

Cys Met Asn Ile Pro Gln Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Glu Asp Lys Asp
 130 135 140

Ala Lys Thr Phe Ala Ser Trp Gly Ile Asp Tyr Leu Lys Tyr Asp Asn
 145 150 155 160

Cys Asn Ile Pro Asn Gly Ser Asp Met Lys Thr Asp Tyr Gln Lys Met
 165 170 175

ES 2 755 978 T3

Gln Thr Ala Leu Ala Asn Cys Gly Arg Pro Ile Val Phe Ser Ile Cys
 180 185 190

Ala Trp Gly Tyr Gln Ser Trp Met Pro Ala Thr Gly Asn Leu Trp Arg
 195 200 205

Thr Thr Gly Asp Ile Ala Asp Lys Trp Asp Asn Gly Asn Glu Trp Phe
 210 215 220

Lys Gly Ile Ile Asn Ala Ile Asp Gly Asn Ala Gln Tyr Thr Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Pro Gly Ala Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Glu Ile Gly Asn
 245 250 255

Gly Gly Cys Thr Thr Glu Glu Tyr Arg Thr Gln Met Ser Met Trp Ser
 260 265 270

Met Met Ala Ser Pro Leu Ile Ala Gly Asn Asp Ile Arg Thr Met Ser
 275 280 285

Gln Thr Thr Lys Asp Ile Leu Leu Asn Lys Glu Val Ile Ala Ile Asp
 290 295 300

Gln Asp Pro Ala Gly Val Gln Gly Lys Arg Val Lys Ser Ala Asn Gly
 305 310 315 320

Leu Glu Ile Trp Val Lys Pro Leu Gly Thr Asn Gly Thr Thr Lys Ala
 325 330 335

Val Ala Leu Leu Asn Arg Asn Ser Ala Thr Ser Asn Ile Thr Val Asn
 340 345 350

Trp Ser Asp Ile Gly Val Ser Gly Ser Val Thr Val Arg Asp Leu Trp
 355 360 365

Ala Lys Ser Asp Lys Gly Ser Phe Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Ser Val
 370 375 380

Pro Ser His Gly Thr Val Leu Ile Lys Ile Ser Thr Glu Pro Pro Ala
 385 390 395 400

Pro Val Asp Ala Thr Lys Gln Ile Glu Ala Glu Ser Tyr Ser Asn Gln
 405 410 415

Ser Gly Ile Gln Thr Glu Thr Cys Ser Glu Gly Gly Glu Asp Val Gly
 420 425 430

ES 2 755 978 T3

Phe Ile Glu Asn Gly Asp Tyr Thr Val Tyr Ser Asn Val Asp Phe Gly
 435 440 445

Asp Gly Val Gly Gly Phe Gln Ala Arg Val Ala Ser Ala Thr Ser Gly
 450 455 460

Gly Asn Ile Glu Ile Arg Leu Asp Ser Pro Ala Gly Thr Leu Ile Gly
 465 470 475 480

Thr Cys Pro Val Ala Gly Thr Gly Asp Trp Gln Thr Tyr Thr Asp Val
 485 490 495

Lys Cys Thr Val Ser Gly Ala Thr Gly Lys His Asp Val Tyr Leu Val
 500 505 510

Phe Lys Gly Asp Ser Gly Tyr Leu Phe Asn Leu Asn Trp Phe Thr Phe
 515 520 525

Thr Pro Gly Ser Val Asn Thr Gly Thr Leu Gly Asp Leu Asn Ser Asp
 530 535 540

Gly Gln Val Asp Ala Ile Asp Leu Gln Leu Leu Lys Lys Tyr Ile Leu
 545 550 555 560

Gly Leu Gly Ala Ile Glu Asn Thr Lys Leu Ala Asp Leu Asp Ala Asn
 565 570 575

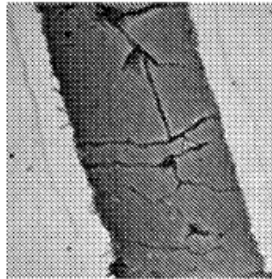
Gly Asp Ile Asn Ala Ile Asp Phe Ser Leu Leu Lys Gln Phe Leu Leu
 580 585 590

Gly Ile Arg Thr Ser Phe Pro Gly Gln Gly Ala Ala
 595 600

REIVINDICACIONES

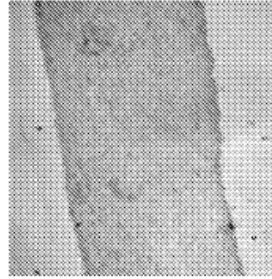
1. Un procedimiento *in vitro* para preparar una matriz de tejido no humano para trasplante que comprende:
 5 poner en contacto una matriz de tejido que contiene colágeno con una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* o *Clostridium cellulyticum* aislada en una cantidad y durante un tiempo suficientes para eliminar un epítipo de α -gal de la matriz de tejido, de este modo se prepara la matriz de tejido para el trasplante en un paciente humano.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* aislada, y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* aislada, y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 y 6.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* aislada, y está codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de nucleótidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1, 3, y 5.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Trichoderma reesei* aislada, y está codificada por una molécula de ácido nucleico, dicha molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, y 6.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Clostridium cellulyticum* aislada, y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en la SEQ ID NO: 8.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Clostridium cellulyticum* aislada, y está codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de nucleótidos entera expuesta en la SEQ ID NO: 7.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-galactosidasa es una alfa-galactosidasa de *Clostridium cellulyticum* aislada, y está codificada por una molécula de ácido nucleico, dicha molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos entera expuesta en la SEQ ID NO: 8.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la matriz de tejido es una matriz acelular de tejido.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la matriz de tejido:
 (a) comprende una matriz de tejido dérmico; o
 (b) se obtiene de un tejido seleccionado de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido valvular cardíaco, tejido de ligamento, tejido tendinoso, tejido arterial, tejido venoso,
 40 tejido conectivo neural, tejido vesical urinario, tejido del uréter y tejido intestinal
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que además comprende tratar la matriz de tejido para eliminar al menos algunas de las células y componentes celulares de la matriz de tejido.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la matriz de tejido se trata para eliminar sustancialmente todas las células y los componentes celulares antes de poner en contacto la matriz de tejido con la alfa-galactosidasa.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que sustancialmente todas las células y los componentes celulares se eliminan de la matriz de tejido.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno incluye dos o más matrices de tejido.
- 50 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que además comprende envasar la matriz de tejido; y/o, que además comprende esterilizar la matriz de tejido.

FIG. 1A



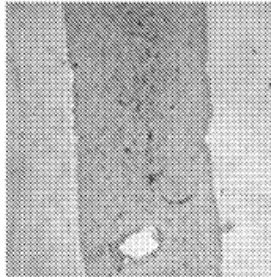
Control

FIG. 1B



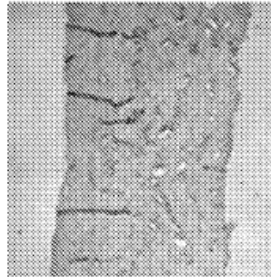
Grano de café
400 U/L

FIG. 1C



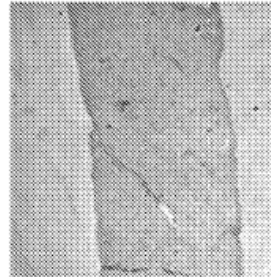
T. Reesei purificado
Tampón LTM 400 U/L

FIG. 1D



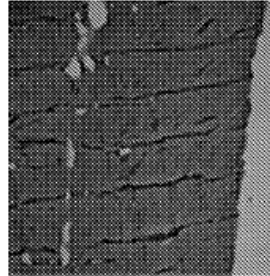
T. Reesei purificado
400 U/L pH 6,0

FIG. 1E



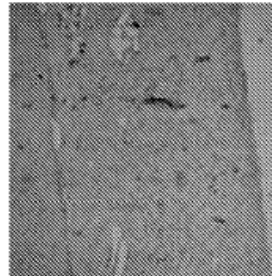
T. Reesei
parcialmente purificado

FIG. 1F



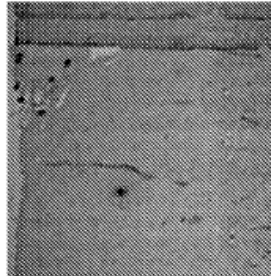
Control

FIG. 1G



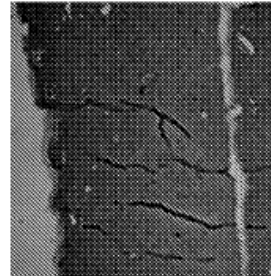
Grano de café
400 U/L

FIG. 1H



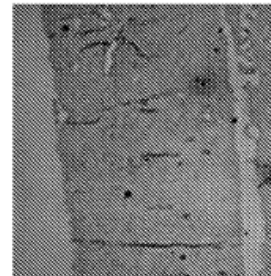
C. cellulyticum
Tampón LTM 20000 U/L

FIG. 1I



C. cellulvticum
Tampón LTM 4000 U/L

FIG. 1J



C. cellulyticum
4000 U/L pH 6,0