

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 373**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/IB2016/053410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16199069**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16806993 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3307882**

54 Título: **Transsialidasas de photobacterium mutadas**

30 Prioridad:

09.06.2015 EP 15171175

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

11.12.2020

73 Titular/es:

**GLYCOM A/S (100.0%)
Kogle Allé 4
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**VOGEL, ANDREAS;
SCHMIEDEL, RAMONA;
CHAMPION, ELISE y
DEKANY, GYULA**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 798 373 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

Transsialidasas de *photobacterium* mutadas

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a transsialidasas de *photobacterium* modificadas con mutaciones particulares que tienen regioselectividad aumentada y/o termoestabilidad aumentada.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las α 2,6-sialil transferasas de tipo salvaje se han aislado de bacterias marinas, como *Photobacterium damsela* JT0160 (US 5827714, US 6255094, Yamamoto et al. J. Biochem. 123, 94 (1998)), y posteriormente de *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 (US 7993875, US 8187838, Tsukamoto et al. J. Biochem. 143, 187 (2008)) y posteriormente de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 (US 8187853, US 8372617, Yamamoto et al. Glycobiology 17, 1167 (2007)) y finalmente de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 (US 2012/184016, Mine et al. Glycobiology 20, 158 (2010)). Se ha descubierto que la α 2,6-sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 y la α 2,6-sialil transferasa truncada de *Photobacterium damsela* JT0160 también tienen actividad de sialidasa (US 2012/0184016, Mine et al. Glycobiology 20, 158 (2010), Cheng et al. Glycobiology 20, 260 (2010)). Sin embargo, estas α 2,6-sialil transferasas de tipo salvaje no se han usado o no son completamente adecuadas para elaborar oligosacáridos sialilados, particularmente oligosacáridos de leche humana sialilados (HMO).

Por lo tanto, se han buscado mutantes de tales enzimas, preferiblemente que tuviesen una regioselectividad aumentada y/o una termoestabilidad aumentada, en particular para la síntesis enzimática de oligosacáridos sialilados, especialmente HMO sialilados.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una α 2,6-transsialidasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, y que comprende por lo menos uno de:

- en la posición 156, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o
- en la posición 161, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
- en la posición 180, un aminoácido seleccionado de Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp; y/o
- en la posición 186, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
- en la posición 218, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- en la posición 222, un aminoácido seleccionado de Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235, un aminoácido seleccionado de Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o
- en la posición 242, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
- en la posición 261, un aminoácido seleccionado de His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- en la posición 315, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 342, un aminoácido seleccionado de Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 349, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
- en la posición 350, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
- en la posición 438, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferiblemente His;

en donde dichas posiciones se definen mediante la alineación de dicha secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1 usando un algoritmo de comparación.

Por consiguiente, esta invención se refiere a una α 2,6-transsialidasa mutada o modificada que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, y tiene las siguientes mutaciones (la posición de la mutación corresponde a alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- en la posición 156 está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o

- en la posición 161 está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
- en la posición 180 está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp; y/o
- en la posición 186 está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
- 5 - en la posición 218 está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- en la posición 222 está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- 10 - en la posición 235 está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o
- en la posición 242 está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
- en la posición 261 está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- 15 - en la posición 315 está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 342 está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 349 está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
- en la posición 350 está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356 está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
- 20 - en la posición 438 está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.

Las proteínas mutadas de acuerdo con la invención muestran actividad de transsialidasa y/o sialil transferasa, preferiblemente una actividad de α 2,6-transsialidasa y/o α 2,6-sialil transferasa.

25 Ventajosamente, la secuencia de aminoácidos que debe mutarse de acuerdo con esta invención para tener una actividad de α 2,6-transsialidasa y/o α 2,6-sialil transferasa con regioselectividad mejorada es la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, particularmente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15.

30 Más ventajosamente, la α 2,6-transsialidasa mutada tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 y que es preferiblemente la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, que se ha mutado en lo siguiente posiciones de aminoácidos (la posición de la mutación corresponde a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 35 - en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o
- en la posición 161 Gln o Pro está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
- 40 - en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp; y/o
- en la posición 186 Ala o Gly está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
- en la posición 218 Ala o Ser está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- 45 - en la posición 222 Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235 Lys o Thr está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o
- en la posición 242 Val o Leu está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
- 50 - en la posición 261 Arg o Ile está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- en la posición 315 Leu está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 342 Thr está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 349 Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
- 55 - en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356 Tyr está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
- en la posición 438 Pro está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.

60 Incluso más ventajosamente, la secuencia de aminoácidos de la α 2,6-transsialidasa mutada es la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15 que está mutada en las siguientes posiciones de aminoácidos (la posición de mutación corresponde a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 65 - en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Cys o Tyr; y/o

- en la posición 161 Gln está sustituido por Phe o Gly; y/o
- en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, y/o
- en la posición 186 Ala está sustituido por Tyr, Cys o Leu; y/o
- en la posición 218 Ala está sustituido por Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- 5 - en la posición 222 Asn está sustituido por Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235 Lys está sustituido por Arg, His, Cys o Val; y/o
- en la posición 242 Val está sustituido por His; y/o
- en la posición 261 Arg está sustituido por Asp, Phe, His o Val; y/o
- en la posición 315 Leu está sustituido por Cys; y/o
- 10 - en la posición 342 Thr está sustituido por Cys; y/o
- en la posición 349 Gly está sustituido por Ser o Cys; y/o
- en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356 Tyr está sustituido por Val o Phe; y/o
- en la posición 438 Pro está sustituido por His.

15 Aún más ventajosamente, la secuencia de aminoácidos de la α 2,6-transsialidasa mutada es la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15 que está mutada en por lo menos dos posiciones de aminoácidos (la posición de la mutación corresponde con la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1) de 156, 218, 222 y 349, particularmente por lo menos en tres posiciones de 156, 218, 222 y 349, más particularmente:

- en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Cys o Tyr; y/o
- en la posición 218 Ala está sustituido por Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- en la posición 222 Asn está sustituido por Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- 25 - en la posición 349 Gly está sustituido por Ser o Cys.

La invención también se refiere a un proceso para sintetizar un carbohidrato sialilado, que comprende el paso de hacer reaccionar un donante de sialilo y un aceptor de carbohidratos en presencia de la α 2,6-transsialidasa mutada (modificada) de la invención para transferir el residuo de sialilo del donante de sialilo al aceptor de carbohidratos.

30 La invención se refiere además al uso de la α 2,6-transsialidasa mutada (modificada) de la invención para la preparación de un carbohidrato sialilado, preferiblemente un oligosacárido de leche humana sialilada que tiene un residuo 6-sialilo.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Se pretende que las figuras siguientes ilustren adicionalmente la invención.

40 **Figura 1:** muestra las secuencias y la alineación de 3 α 2,6-sialil transferasas: sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (SEQ ID No. 1), sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (SEQ ID No. 2) y sialil transferasa de *P. damselae* JT0160 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (SEQ ID No. 3). Las secuencias se alinearon mediante el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) usando CLUSTAL Omega (1.2.1) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

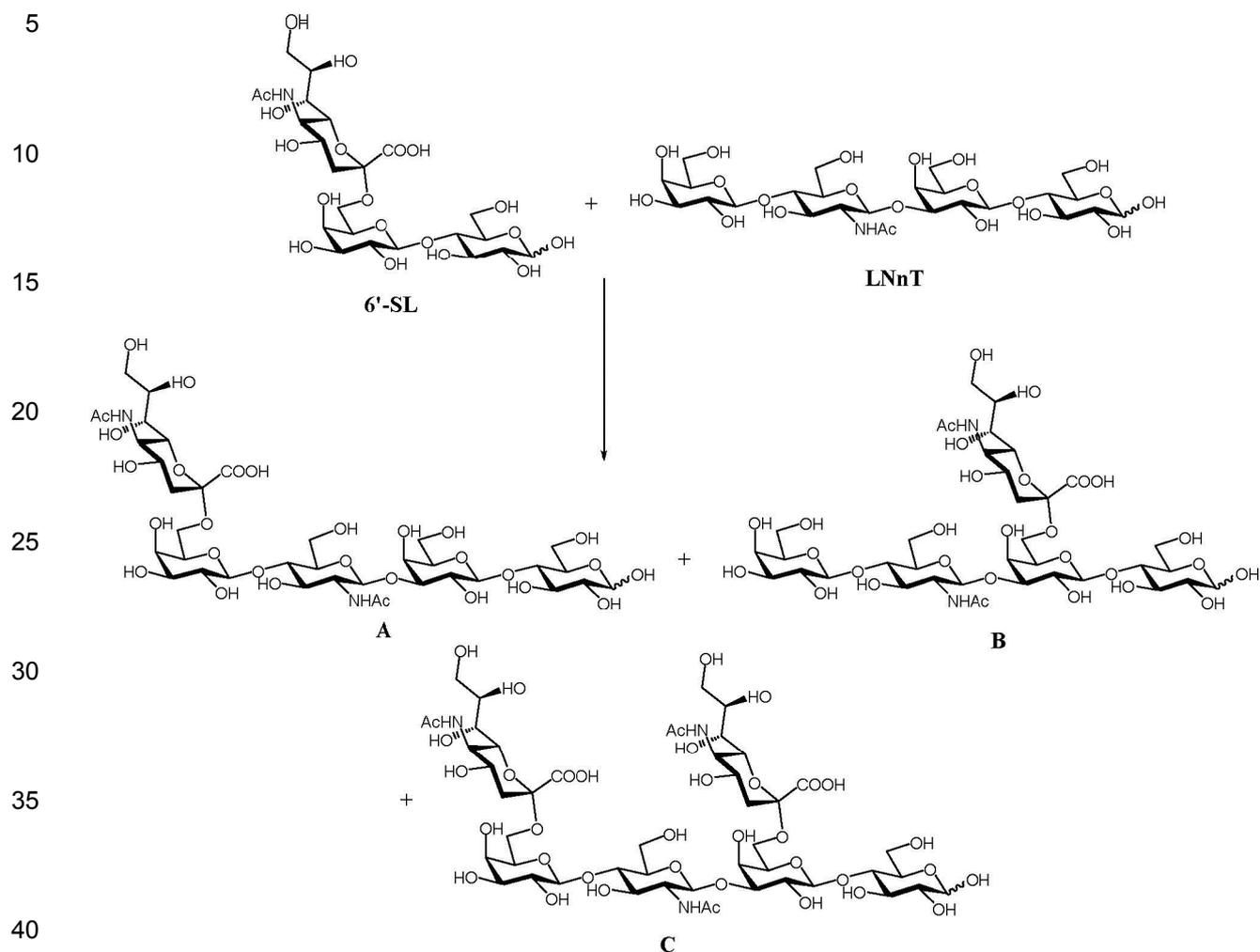
45 **Figura 2:** muestra las secuencias y la alineación de 2 α 2,6-sialil transferasas: sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (siendo la SEQ ID No. 1) y sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (SEQ ID No. 2). Las secuencias se alinearon mediante alineamiento de secuencias por parejas usando EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

50 **Figura 3:** muestra las secuencias y la alineación de 2 α 2,6-sialil transferasas: sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (siendo la SEQ ID No. 1) y sialil transferasa de *P. damselae* JT0160 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (SEQ ID No. 3). Las secuencias se alinearon mediante alineamiento de secuencias por parejas usando EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto ahora que las cuatro sialil transferasas de *photobacterium* mencionadas anteriormente, pero truncadas por sus péptidos señal, concretamente la sialil transferasa Δ 2-15 truncada de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119, la sialil transferasa Δ 2-15 truncada de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145, y la sialil transferasa Δ 2-17 truncada de *Photobacterium* sp. JT-ISH-224, muestran una actividad de transsialidasa además de su actividad de sialil transferasa, es decir, son capaces de transferir el residuo de sialilo de un oligosacárido sialilado a un aceptor por transialización. Esto se ha demostrado en una reacción en la que 6'-SL sirvió como donante de sialilo y LNnT sirvió como aceptor de sialilo para producir LNnT sialilado. Aunque la reacción es estereoselectiva, es decir solo son detectables los productos α 2,6-sialilados, la regioselectividad es pobre, ya que cualquiera de los dos residuos de

galactosilo de LNnT, o ambos, están sialilados (Esquema 1). El compuesto **A** es LST c, un oligosacárido sialilado que se encuentra en la leche humana, mientras que los compuestos **B** y **C** no son oligosacáridos naturales de la leche humana.



Esquema 1.

45 La sialil transferasa $\Delta 2-15$ truncada de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 produjo una relación de producto molar de compuesto **A**: compuesto **B**: compuesto **C** $\approx 46:53:1$ con -17% de conversión total después de 4 horas. De igual manera, la sialil transferasa $\Delta 2-15$ truncada de *P. damselae* JTO160 (no parte del alcance) produjo los tres productos sialilados con una ligera preferencia por el compuesto **A**, y la sialil transferasa $\Delta 2-17$ truncada de *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 y la sialil transferasa $\Delta 2-15$ truncada de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 también produjeron los tres productos sialilados con una preferencia más fuerte por el compuesto **A** en comparación con la enzima de *P. damselae* JTO160. En todas estas reacciones no se detectó hidrólisis significativa.

55 Sorprendentemente, ahora también se ha descubierto que ciertas $\alpha 2,6$ -transsialidasas mutadas artificialmente muestran, en reacciones de transsialidación, una regioselectividad mejorada hacia la fracción de galactosilo terminal frente a una fracción de galactosilo interna del aceptor en comparación con la enzima original de tipo salvaje (no mutado) que tiene actividad de $\alpha 2,6$ -transsialidasa y/o $\alpha 2,6$ -sialil transferasa de la que provienen los mutantes. Específicamente, tales mutantes de $\alpha 2,6$ -transsialidasa muestran mejor regioselectividad hacia el compuesto **A** y, en consecuencia, proporcionan una proporción significativamente más alta de compuesto **A** con respecto al compuesto **B** y/o el compuesto **C**.

60 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una $\alpha 2,6$ -transsialidasa mutada que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la SEQ ID No. 1, y que ha mutado (es decir, un aminoácido ha sido reemplazado por otro aminoácido) en una o más posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1) de la siguiente manera:

65

- 156 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gin o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- 161 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly;
- 180 que está sustituido por Asp, Asn, Gin, preferiblemente Asp;
- 5 - 186 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu;
- 218 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
- 222 que está sustituido por Gin, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe;
- 235 que está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val;
- 10 - 242 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His;
- 261 que está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val;
- 315 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys;
- 342 que está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys;
- 349 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys;
- 15 - 350 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys;
- 356 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; o
- 438 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.

20 La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JTSHIZ-119 truncada por su péptido señal (Δ 2-15).

25 Las α 2,6-transsialidasas mutadas definidas anteriormente muestran una regiospecificidad mejorada en comparación con la enzima original de tipo salvaje (no mutada) que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la SEQ ID No. 1 u otras enzimas correspondientes del tipo salvaje (no mutadas) que tienen una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la SEQ ID No. 1, y de la cual provienen las enzimas de tipo salvaje de los mutantes.

30 Además, las α 2,6-transsialidasas mutadas de acuerdo con la invención muestran no solo actividad de una transsialidasa, preferiblemente de una α 2,6-transsialidasa, sino también actividad de una sialil transferasa, preferiblemente de una α 2,6-sialil transferasa.

35 De acuerdo con esta invención, los términos "identidad sustancial" y "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos significan preferiblemente que las dos o más secuencias son iguales o tienen por lo menos aproximadamente un 90% de residuos de aminoácidos en común cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o secuencias designadas de aminoácidos (es decir, las secuencias tienen por lo menos un 90 por ciento (%) de identidad). El porcentaje de identidad puede medirse usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST 2.0 con parámetros predeterminados, o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A este respecto, la posición de una mutación en la secuencia de en la

40 secuencia de aminoácidos de las transsialidasas modificadas (mutadas) de la invención con referencia a la SEQ ID No. 1 significa que la posición se define mediante la alineación de la secuencia de transsialidasa de prueba con la SEQ ID No. 1 usando un algoritmo de comparación de secuencias de proteínas o mediante la alineación manual y la inspección visual mencionadas anteriormente. Ejemplos de tales secuencias alineadas se muestran en las Fig. 1-3. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad, la similitud de secuencia y la alineación es el algoritmo BLAST 2.2.20+, que se describe en Altschul et al. Nucl. Acids Res. 25, 3389 (1997). El BLAST 2.2.20+ se usa para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para las proteínas de la invención. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ejemplos de algoritmos de alineación de secuencias son CLUSTAL Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) o MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

55 Las α 2,6-sialil transferasas preferidas de tipo salvaje con una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica con la SEQ ID No. 1, que tiene por lo menos aproximadamente un 90 por ciento de identidad de secuencia (determinado por BLAST) con la SEQ ID No. 1, se enumeran en la Tabla 1.

60

65

Tabla 1

Descripción	Identidad	Número de entrada
α 2,6-sialil transferasa [<i>Photobacterium leiognathi</i>]	100 %	BAI49484.1
α 2,6-sialil transferasa [<i>Photobacterium leiognathi</i>]	96 %	BAF91416.1

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Preferiblemente, las α 2,6-sialil transferasas con una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la SEQ ID No. 1 que van a mutarse de acuerdo con esta invención para tener una actividad de α 2,6-transsialidasa y/o α 2,6-sialil transferasa con regioselectividad mejorada, son la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, más preferiblemente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15.
- En la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es preferiblemente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, que tiene las siguientes mutaciones (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):
- en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o
 - en la posición 161 Gln o Pro está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
 - en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp, y/o
 - en la posición 186 Ala o Gly está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
 - en la posición 218 Ala o Ser está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - en la posición 222 Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 235 Lys o Thr está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o
 - en la posición 242 Val o Leu está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
 - en la posición 261 Arg o Ile está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
 - en la posición 315 Leu está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
 - en la posición 342 Thr está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
 - en la posición 349 Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
 - en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
 - en la posición 356 Tyr está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
 - en la posición 438 Pro está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.
- En la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, o la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, particularmente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, y tiene mutación(es) en las siguientes posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):
- en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o
 - en la posición 161 Gln está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
 - en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp, y/o
 - en la posición 186 Ala o Gly está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys, o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
 - en la posición 218 Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - en la posición 222 Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 235 Lys está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o

- en la posición 242 Val está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
- en la posición 261 Arg o Ile está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- 5 - en la posición 315 Leu está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 342 Thr está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 349 Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
- en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- 10 - en la posición 356 Tyr está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
- en la posición 438 Pro está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His

Más preferiblemente, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, y está mutada en las siguientes posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr; y/o
- 20 - en la posición 161 Gln está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly; y/o
- en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp, y/o
- en la posición 186 Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu; y/o
- 25 - en la posición 218 Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- en la posición 222 Asn está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235 Lys está sustituido por Arg, His, Ser, Thr, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val; y/o
- 30 - en la posición 242 Val está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His; y/o
- en la posición 261 Arg está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- en la posición 315 Leu está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- 35 - en la posición 342 Thr está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys; y/o
- en la posición 349 Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; y/o
- en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356 Tyr está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y/o
- 40 - en la posición 438 Pro está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.

También preferiblemente, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la SEQ ID No.1 tiene por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, mutaciones en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las posiciones de aminoácidos siguientes (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 156 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- 161 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly;
- 50 - 180 que está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp;
- 186 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu;
- 218 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
- 222 que está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe;
- 55 - 235 que está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val;
- 242 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His;
- 261 que está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val;
- 315 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys;
- 342 que está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys;
- 60 - 349 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys;
- 350 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys;
- 356 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y
- 438 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His.

65 Estas α 2,6-transsialidasas mutadas se caracterizan por una regioselectividad incluso más mejorada hacia la fracción

de galactosilo terminal frente a una fracción de galactosilo interna del aceptor en comparación con las enzimas mutadas de un punto divulgadas anteriormente en reacciones de transsialidasa y/o sialil transferasa.

5 De acuerdo con una realización preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la SEQ ID No.1 tiene por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, mutaciones en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las posiciones de aminoácidos siguientes (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 10 - sustitución del aminoácido en la posición 156 por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- sustitución del aminoácido en la posición 218 por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
- 15 - sustitución del aminoácido en la posición 222 por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y
- la sustitución del aminoácido en la posición 349 por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys.

20 De acuerdo con una realización más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1, es preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, y tiene por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, mutaciones en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones como sigue (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 25 - en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- en la posición 218, Ala o Ser se sustituye por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
- 30 - en la posición 222 Asn o Ser se sustituye por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y
- en la posición 349, Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys.

35 De acuerdo con una realización aún más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es preferiblemente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, o la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, y tiene por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, mutaciones en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 40 - en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- en la posición 218, Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Val, Phe o Tyr;
- en la posición 222 Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y
- 45 - en la posición 349, Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys.

50 De acuerdo con una realización incluso más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es preferiblemente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, pero tiene por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, mutaciones en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones como sigue (numeración correspondiente a alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 55 - en la posición 156, Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
- en la posición 218, Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Phe o Tyr;
- en la posición 222 Asn está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y
- 60 - en la posición 349, Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys.

65 De acuerdo con una realización especialmente preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1 es la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, y contiene las siguientes mutaciones: A218Y, N222R y G349S (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos

con la SEQ ID No. 1).

También de acuerdo con el primer aspecto de esta invención, la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención tiene:

- 5 a) una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15.
- 10 b), por lo menos una mutación en una posición de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las posiciones de aminoácidos siguientes (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):
- posición 156 donde Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
 - 15 - posición 161 donde Gln o Pro está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferiblemente Phe o Gly;
 - posición 180 donde Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferiblemente Asp;
 - posición 186 donde Ala o Gly está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferiblemente Tyr, Cys o Leu;
 - 20 - posición 218 donde Ala o Ser está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
 - posición 222 donde Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe;
 - posición 235 donde Lys o Thr está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferiblemente Arg, His, Cys o Val;
 - 25 - posición 242 donde Val o Leu está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His;
 - posición 261 donde Arg o Ile está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferiblemente Asp, Phe, His o Val;
 - posición 315 donde Leu está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Cys;
 - 30 - posición 342 donde Thr está sustituido por Ser o Cys, preferiblemente Cys;
 - posición 349 donde Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys;
 - posición 350 donde Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferiblemente Ser, Tyr, Phe o Cys;
 - 35 - posición 356 donde Tyr está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferiblemente Val o Phe; y
 - posición 438 donde Pro está sustituido por Arg, His o Lys, preferiblemente His;
- c) y una mutación adicional en las posiciones 353, 400, 412 o 450 a 458.

40 Sorprendentemente, también se ha descubierto que todas las α 2,6-transsialidasas mutadas (como se ha tratado anteriormente), a la vez que proporcionan una regioselectividad mejorada como se ha mencionado anteriormente, muestran una estabilidad mejorada, preferiblemente termoestabilidad mejorada, que permite que la síntesis de un producto sialilado se lleve a cabo de manera eficaz en condiciones más estrictas, particularmente temperaturas más altas, lo que lleva frecuentemente a tiempos de reacción más rápidos. Las posiciones preferidas para las mutaciones con respecto a la termoestabilidad aumentada pueden seleccionarse de las posiciones de aminoácidos 353, 400, 45 412, 451, 452 y 458 (la posición de la mutación corresponde a la alineada con la SEQ ID No. 1), y las mutaciones particularmente preferidas pueden seleccionarse del grupo siguiente: K353I, S400Y, S412P, D451K, D451L, D451M, T452V, D458R y/o D458F.

Por consiguiente, una α 2,6-transsialidasa mutada preferida de esta invención tiene:

- 50 a) una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.1, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, o la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15, más preferiblemente de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15,
- 55 b) por lo menos dos, preferiblemente tres mutaciones, en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las posiciones de aminoácidos siguientes (numeración correspondiente a la alineación de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):
- 60 - posición 156 donde Gly está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferiblemente Ser, Cys o Tyr;
 - posición 218 donde Ala está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferiblemente Ile, Val, Phe o Tyr;
 - 65 - posición 222 donde Asn o Ser está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o

- His, preferiblemente Cys, Asp, Arg o Phe; y
- posición 349 donde Gly está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferiblemente Ser o Cys; preferiblemente las siguientes mutaciones: A218Y, N222R y G349S, y

5 c) una mutación adicional en la posición 353, 400, 412 o 450 a 458.

Una α 2,6-transsialidasa mutante más preferida de esta invención

10 a) es la sialil transferasa de *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, que

b) tiene las siguientes mutaciones: A218Y, N222R y G349S, y

15 c) tiene por lo menos una de las siguientes mutaciones: K353I, S400Y, S412P, D451 K, D451L, D451M, T452V, D458R y D458F.

20 Una α 2,6-transsialidasa mutada incluso más preferida de esta invención es la sialil transferasa de *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15 que ha sido mutada de la siguiente manera: A218Y, N222R, G349S, S412P y D451 K.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para elaborar una α 2,6-transsialidasa mutada del primer aspecto de la invención, que comprende los pasos de:

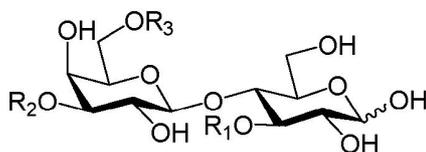
25 a) proporcionar una secuencia de ADN que codifica dicha α 2,6-transsialidasa mutada, luego

b) expresar dicha α 2,6-transsialidasa mutada en una célula huésped transformada con la secuencia de ADN obtenida en el paso a).

30 El paso a) puede llevarse a cabo de manera convencional elaborando una secuencia de ADN que codifique una α 2,6-transsialidasa mutada de la invención. En el paso b), la secuencia de ADN así creada se introduce a nivel génico mediante métodos biológicos moleculares habituales. La secuencia de ADN de las variantes enzimáticas puede clonarse en un vector de expresión que puede introducirse en una cepa de expresión del huésped apropiada, como *E. coli*, que contiene plásmidos de ADN con la información requerida para la regulación de la expresión de la variante de la enzima. La secuencia que codifica la variante enzimática puede colocarse bajo el control de un promotor inducible. Como resultado, añadiendo un inductor, puede controlarse la expresión de la variante enzimática (generalmente, se usa isopropil- β -O-tiogalactopiranosido (IPTG)). Las células huésped así transformadas se cultivan luego en medio nutritivo convencional (por ejemplo, caldo Lennox, medio mínimo M9) e inducido con IPTG. Después de la expresión, la biomasa puede recogerse por centrifugación. La enzima mutada puede aislarse de la biomasa después de una lisis y purificación celular apropiadas. En este proceso, pueden usarse métodos convencionales de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatográfica.

45 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para sintetizar un sacárido o glicoconjugado sialilado haciendo reaccionar un donante de sialilo y un aceptor de sacárido o glicoconjugado en presencia de una α 2,6-transsialidasa mutada del primer aspecto de la invención, por lo que el residuo de sialilo del donante de sialilo se transfiere al aceptor de sacárido o de glucoconjugado.

50 El aceptor de sacárido usado en el tercer aspecto de la invención puede ser cualquier mono- u oligosacárido, o el aceptor de glicoconjugado (como glicoproteínas, glicopéptidos, peptidoglicanos, glicolípidos, lipopolisacáridos, etc.) pueden comprender cualquier mono- u oligosacárido. El aceptor de oligosacárido o el fragmento de oligosacárido del aceptor de glicoconjugado comprende preferiblemente 2-10, más preferiblemente 2-6, particularmente 2-4 unidades de monosacárido, y preferiblemente contiene una unidad de galactosa, más preferiblemente una unidad de galactosa terminal en el extremo no reductor. Incluso más preferiblemente, dicha unidad de galactosa forma un fragmento de N-acetil-lactosaminilo (Galp β 1-4GlcNAcp) o de lacto-N-biosilo (Galp β 1-3GlcNAcp) con una N-acetilglucosamina adyacente o un fragmento de lactosilo con una unidad de glucosa cuya glucosa está ventajosamente en el extremo reductor. En particular, el aceptor de oligosacáridos es lactosa, o comprende una fracción de N-acetil-lactosaminilo o lacto-N-biosilo y es de fórmula 1



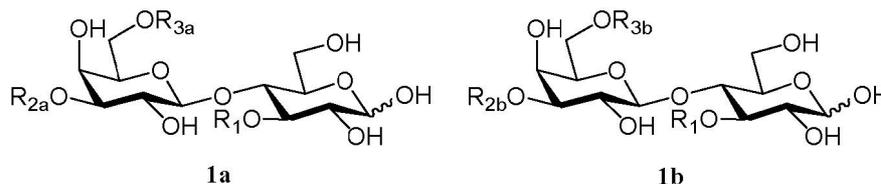
1

en donde R_1 es fucosilo o H,

R_2 se selecciona de grupos N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo, en donde el grupo N-acetil-lactosaminilo puede llevar un residuo de glicosilo que comprende uno o más grupos N-acetil-lactosaminilo y/o lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más residuos de sialilo y/o fucosilo, siempre que por lo menos un residuo de galactosilo de un grupo N-acetil-lactosaminilo o uno lacto-N-biosilo no esté sustituido,

R_3 es un grupo H o N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un residuo glucosilo que comprende uno o más grupos N-acetil-lactosaminilo y/o uno o más lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más residuos sialilo y/o fucosilo, siempre que por lo menos un residuo de galactosilo de un grupo N-acetil-lactosaminilo o uno lacto-N-biosilo no esté sustituido.

Preferiblemente, los compuestos de fórmula **1** son de las fórmulas **1a** o **1b**



en donde R_1 es como se ha definido anteriormente,

R_{2a} es un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con otro grupo N-acetil-lactosaminilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo puede estar sustituido con uno o más residuos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente sin un residuo de sialilo y/o fucosilo,

R_{3a} es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo que puede estar sustituido con un grupo lacto-N-biosilo si R_{2a} es un grupo N-acetil-lactosaminilo no sustituido; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más residuos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente sin un residuo sialilo y/o fucosilo,

R_{2b} es un grupo lacto-N-biosilo opcionalmente sustituido con un residuo de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente sin un residuo de sialilo y/o fucosilo, y

R_{3b} es un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un grupo N-acetil-lactosaminilo, o con dos grupos N-acetil-lactosaminilo o con un grupo N-acetil-lactosaminilo y un grupo lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más residuos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente sin un residuo de sialilo y/o fucosilo.

Más preferiblemente, los compuestos de fórmulas **1a** y **1b** tienen uno o más de los siguientes enlaces y modificaciones:

- al grupo N-acetil-lactosaminilo de R_{2a} , si está sustituido, se le une otro grupo N-acetil-lactosaminilo por un enlace interglucosídico 1-3,
- el grupo lacto-N-biosilo, si está presente en R_{3a} , se une al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3,
- al grupo N-acetil-lactosaminilo de R_{3b} , si está sustituido,
 - o se le une otro grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3,
 - o se le unen dos grupos N-acetil-lactosaminilo mediante enlace interglucosídico un 1-3 y uno 1-6, y
 - o se le une un grupo lacto-N-biosilo mediante un enlace interglucosídico 1-3 y se le une un grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-6.

Incluso más preferiblemente, el aceptor de carbohidratos usado en el tercer aspecto de la invención se selecciona del grupo que consiste de lactosa, lacto-N-neotetraosa (LNnT), Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuca α 1-3]Glc, lacto-N-hexaosa (LNH, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc), lacto-N-neohexaosa (LNnH, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc), Fuca α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc, Gal β 1-3[Fuca α 1-4]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc, Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-6[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3]Gal β 1-4Glc, Fuca α 1-2Gal β 1-3[Fuca α 1-4]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc, Fuca α 1-2Gal β 1-4[Fuca α 1-3]

GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc, NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc, sialil-LNnH I (SLNnH-I, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc), sialyl-LNnH II (SLNnH-II, Gal β 1-4GlcNAc β 1-6[NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3]Gal β 1-4Glc), NeuAc α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc, NeuAc α 2-6Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc, Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc, y disialil-LNH II (DSLNH-II, Gal β 1-4GlcNAc β 1-6[NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GlcNAc β 1-3]Gal β 1-4Glc), ventajosamente lactosa, LNnT, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc, LNnH y LNnH.

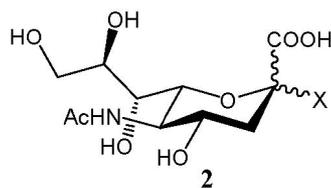
Una α 2,6-transsialidasa mutada del primer aspecto de la invención demuestra una fuerte selectividad para α 2,6 y una fuerte regioselectividad cuando se lleva a cabo el método del tercer aspecto de la invención. No puede observarse ningún producto α 2,3-sialilado. Como resultado, el producto de la reacción es un sacárido o glicoconjugado de α 2,6-sialilo, preferiblemente un oligosacárido o un glicoconjugado de α 2,6-sialilo que comprende un fragmento de oligosacárido de 2,6-sialilo, cuyo oligosacárido comprende preferiblemente 2-10, más preferiblemente 2-6, particularmente 2-4 unidades de monosacárido, y preferiblemente contiene una unidad de galactosa, más preferiblemente una unidad de galactosa terminal en el extremo no reductor. Preferiblemente, la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención lleva el residuo sialilo de un donante apropiado a la posición 6 de la galactosa terminal en el aceptor, más preferiblemente a la posición 6 de galactosa en lactosa, o, si el aceptor es de fórmula 1 anterior, específicamente a la posición 6 de la galactosa no sustituida terminal en un grupo N-acetil-lactosaminilo o uno lacto-N-biosilo. Por consiguiente, una α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención se usa preferiblemente para sintetizar HMO sialilados en los que el residuo de sialilo está unido a una galactosa con un enlace α 2,6, preferiblemente los HMO sialilados enumerados en la Tabla 2 a continuación (para las abreviaturas ver Urashima et al. Milk Oligosaccharides, Nova Science Publishers, NY, 2011, Tabla 4 en pág. 14-25).

Tabla 2

aceptor	producto
lactosa	6'-SL
LNnT	LST c
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc	FLST c
LNnH	SLNH
LNnH	SLNnH-I
LNnH	SLNnH-II
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	FSLNH
Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc	FSLNH-III
Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-6[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3]Gal β 1-4Glc	FSLNnH-I
LNnH fucosilado	FSLNnH-II
Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	DFSLNH-I
Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc	DFSLNnH
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc	DSLNH-I
SLNnH-I	DSLNnH
SLNnH-II	DSLNnH
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	FDSLNH-III
NeuAc α 2-6Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	FDSLNnH
Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	FDSLNnH
DSLNH-II	TSLNH

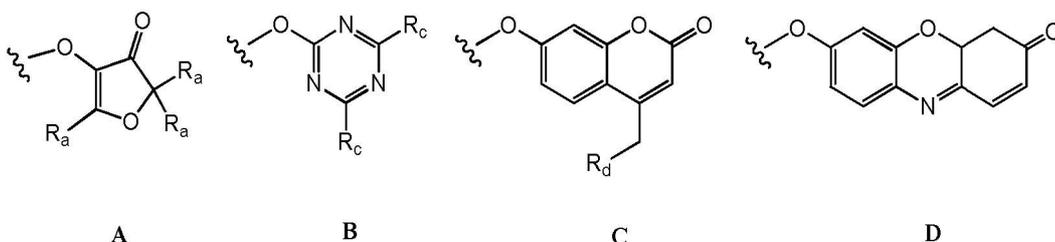
El donante de sialilo usado en el tercer aspecto de la invención puede ser cualquier compuesto de sialilo del cual la α 2,6-transsialidasa mutada de esta invención pueda transferir el residuo de sialilo a un aceptor de carbohidratos como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, en una reacción de transsialidasa, el donante de sialilo puede ser un sacárido de sialilo α 2-6, preferiblemente de 3 o 4 unidades de monosacárido que incluyen el residuo de sialilo, más preferiblemente 6'-SL, o un compuesto de fórmula 2

5



en donde X se selecciona del grupo que consiste de azida, flúor, fenoxi opcionalmente sustituido, piridiniloxi opcionalmente sustituido, grupo **A**, grupo **B**, grupo **C** y grupo **D**

10



15

20

en donde R_a es independientemente H o alquilo, o dos grupos R_a adyacentes representan un grupo $a=C(R_b)_2$, en donde R_b es independientemente H o alquilo, R_c se selecciona independientemente del grupo que consiste de alcoxi, amino, alquilamino y dialquilamino, R_d se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo y $-C(=O)R_e$, en donde R_e es OH, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, hidrazino, alquilhidrazino, dialquilhidrazino o trialquilhidrazino, preferiblemente X en la fórmula 2 se selecciona del grupo que consiste de grupo fenoxi, p-nitrofenoxi, 2,4-dinitrofenoxi, 2-cloro-4-nitrofenoxi, 4,6-dimetoxi-1, 3,5-triazin-2-iloxi, 4,6-dietoxi-1, 3,5-triazin-2-iloxi, 2-etil-5-metil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi, 5-etil-2-metil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi y 2,5-dimetil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi. Ventajosamente, el donante de sialilo es 6'-SL. Alternativamente, los sialoglicoconjugados naturales como la fetuina, el glicomacropéptido de caseína (cGMP) o el ácido polisálico, también son donantes de ácido siálico adecuados en las reacciones de transsialidasa. En las reacciones de sialil transferasa, el donante de sialilo es un derivado nucleotídico del ácido siálico, preferiblemente ácido CMP-siálico.

25

30

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso de una α 2,6-transsialidasa mutada del primer aspecto de la invención para sintetizar un carbohidrato sialilado, preferiblemente un mono u oligosacárido α 2-6-sialílico, más preferiblemente un HMO sialilado que tiene un residuo α 2-6-sialilo, incluso más preferiblemente aquellos en los que el residuo de sialilo está unido a una fracción Gal, aún más preferiblemente aquellos en los que el residuo de sialilo está unido a una fracción Gal terminal, especialmente los HMO sialilados enumerados en el Tabla 2 anterior, particularmente 6'-SL, LST c, FLST c, SLNH, SLNnH-I, SLNnH-II o DSLNnH.

35

40 EJEMPLOS

En los ejemplos siguientes, se probaron mutantes de *PP. leiognathi* JT-SHIZ-119 sialil transferasa truncada por su péptido señal (Δ 2-15), la(s) posición(es) de la mutación es/son de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

45 Ejemplo 1 - mutantes de un solo punto

La determinación de la actividad se realizó en tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH = 6,0) a 30° C en una escala de 100-200 μ l usando 50 mM de LNnT y 50 mM de 6'-SL con 1/10 volúmenes de extracto enzimático bruto. Se tomaron muestras (20 μ l) en los puntos temporales proporcionados a continuación. Las reacciones se detuvieron añadiendo 20 μ l de una mezcla de acetonitrilo-formiato de amonio (10 mM, pH = 4.0) 4:1.

50

Posteriormente se añadieron 160 μ l de agua destilada, las muestras se mezclaron de nuevo, se centrifugaron y se analizaron con HPLC (inyección de 5 μ l). Se usó una columna Kinetix 2.6 μ HILIC 100A (150x4.6 mm) a una temperatura de horno de columna de 401 C con un caudal de 2,5 ml/min usando 81% de acetonitrilo y 19% de tampón de formiato de amonio (10 mM, pH = 4.0) como fase móvil. Los sustratos y productos eluidos se detectaron a 200 nm.

55

Para todos los cálculos, las áreas de pico de LNnT y los productos sialilados individuales (compuestos **A**, **B** y **C**, ver Esquema 1) se normalizaron de acuerdo con sus respectivos números de residuos de N-acetilo como sigue:

60

$$\text{área de pico normalizada de LNnT} = \text{área de pico de LNnT}$$

$$\text{área de pico normalizada del compuesto A} = \frac{1}{2} \cdot \text{área de pico del compuesto A}$$

$$\text{área de pico normalizada del compuesto B} = \frac{1}{2} \cdot \text{área de pico del compuesto B}$$

65

área de pico normalizada del compuesto **C** = $\frac{1}{2}$ · área de pico del compuesto **C**

La selectividad se indica mediante el cálculo del porcentaje de producto de los compuestos **A**, **B** y **C** y se calcula como

$$\text{producto}[\%] = 100 \cdot \frac{\text{producto [área de pico normalizada]}}{\sum \text{productos [área de pico normalizada]} + \text{LNnT [área de pico normalizada]}}$$

Las concentraciones de productos individuales [mM] se calcularon como (suponiendo que la suma de la concentración de LNnT y de todos los productos es 50 mM):

$$\text{producto}[\%] = 50 \cdot \frac{\text{producto [área de pico normalizada]}}{\sum \text{productos [área de pico normalizada]} + \text{LNnT [área de pico normalizada]}}$$

La conversión total de LNnT a productos se calculó como:

$$\text{conversión} [\%] = \frac{100}{50} \cdot \sum \text{productos} [\text{mM}].$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de productos generados por enzimas de tipo salvaje y mutantes dados después de 24 horas. Las conversiones fueron del 46-67%.

mutante	compuesto A (%)	compuesto B (%)	compuesto C (%)
<i>tipo salvaje</i>	26	23	10
A186L	34	17	9
A186C	45	8	3
A186Y	42	8	4
A218F	44	8	2
A218I	43	8	4
A218V	42	8	3
A218Y	43	8	3
E180D	35	13	7
G156C	33	10	4
G156S	36	11	7
G156Y	33	16	8
G349C	35	11	4
G349S	37	12	6
G350C	40	13	5
G350F	38	14	6
G350S	36	13	7
G350Y	32	15	7
K235C	37	10	6
K235H	33	14	8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

mutante	compuesto A (%)	compuesto B (%)	compuesto C (%)
K235R	38	11	5
K235V	37	10	5
L315C	36	12	7
N222C	38	12	4
N222D	37	12	5
N222F	35	11	6
N222R	36	10	5
P438H	33	10	5
Q161F	35	10	5
Q161G	37	12	6
R261D	40	11	5
R261F	44	8	4
R261H	37	10	6
R261V	34	17	9
T342C	38	6	3
Y356F	37	14	6
Y356V	33	9	5
V242H	36	13	7

Todos los mutantes produjeron una cantidad reducida de subproductos (compuestos **B** y **C**).

Ejemplo 2 - mutantes multipunto

La determinación de la actividad se realizó como se describe en el Ejemplo 1, y las muestras se tomaron típicamente después de 1, 2, 4 y 24 horas. La selectividad se demuestra por la pureza del producto del compuesto **A** (calculado como

$$100 \cdot \frac{\text{compuesto A [mM]}}{\text{compuesto A [mM]} + \text{compuesto B [mM]} + \text{compuesto C [mM]}}$$

en función de la conversión en la tabla siguiente.

mutante	conversión (%)	pureza (≥%)	mutante	conversión (%)	pureza (≥%)
<i>tipo salvaje</i>	22	92	G156S-A218Y-N222S-G349C	20	99
	36	91		33	97
	41	89		44	96
	51	77		54	95
A218Y-N222D-G349C	26	96	G156Y-N222D-G349C	26	96
	35	97		31	96
	45	97		36	96

	mutante	conversión (%)	pureza (≥%)	mutante	conversión (%)	pureza (≥%)
5	G156Y-A218I- N222D- G349C	20	95	G156S-A218Y-N222S- G349C	20	94
		29	95		39	96
		48	95		53	92
10	G156S-A218I- N222D- G349S	22	97	A218Y-N222R-G349S	20	100
		33	97		34	100
		41	97		47	99
		47	96		54	97
15	A218Y-N222R- G349S- S412P	20	100	A218Y-N222R-G349S- S412P- D451K	16	100
		31	100		24	100
		48	99		47	99
20		50	95		49	97

Ejemplo 3 - mejora de la termoestabilidad de mutantes multipunto

25 La termoestabilización de mutantes multipunto se verificó mediante la determinación de la temperatura de fusión (T_m) de curvas de inactivación. La temperatura de fusión (T_m) es la temperatura a la que permanece el 50% de la actividad inicial de los restos enzimáticos después de 15 min de incubación a temperaturas elevadas.

30 La determinación de la actividad residual se realizó como se describe en el Ejemplo 1. La concentración de mutantes y de tipo salvaje se normalizó por lo tanto al mismo nivel. Las temperaturas de fusión de los mutantes se enumeran en la tabla siguiente.

	mutante	T_m (°C)
35	<i>tipo salvaje</i>	43-44
	A218Y-N222R-G349S	47-48
	A218Y-N222R-G349S-D458R	50-51
40	A218Y-N222R-G349S-D451M	51-52
	A218Y-N222R-G349S-D451L	52-53
	A218Y-N222R-G349S-D451K	49-50
45	A218Y-N222R-G349S-T452V	51-52
	A218Y-N222R-G349S-D458F	51-52
	A218Y-N222R-G349S-S400Y	50-51
50	A218Y-N222R-G349S-K353I	51-52
	A218Y-N222R-G349S-S412P	55-56
	A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K	57-58

55 Ejemplo 4 - Demostración de la actividad sialil transferasa y transsialidasa de un mutante de acuerdo con la invención

60 El mutante A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K de sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal ($\Delta 2-15$) (las posiciones de las mutaciones son de acuerdo con la SEQ ID No. 1) se probó en reacciones de sialil transferasa y transsialidasa.

65 La determinación de la actividad se realizó en tampón de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,0; condición A) o en medio tipo *E. coli* in vivo (KCl = 125 mM, K_3PO_4 = 25 mM, glutamato monosódico = 10 mM, $CaCl_2$ = 1 μ M, $MgSO_4$ = 5 mM,

5 pH = 7.5, ver Garcia-Contreras et al. FEBS Journal 279, 4145 (2012); condición B) usando extracto enzimático (0,1 g/l) a 30° C en escala de 1 ml. Para probar la actividad de transsialidasa, la reacción se realizó con 10 mM de LNnT y 10 mM de 6'-SL. Para la actividad de la sialil transferasa, la reacción se realizó con 10 mM de LNnT o lactosa y 10 mM de CMP-ácido siálico. Se tomaron muestras (100 µl) en diferentes puntos temporales. Las reacciones se detuvieron calentando las muestras a 90° C durante 10 min. Las muestras luego se centrifugaron y los sobrenadantes se diluyeron antes del análisis HPAEC.

La tabla muestra la formación del producto (LST-c o 6'-SL, en mM) en función del tiempo.

Tiempo (min)	LNnT + 6'-SL → LST-c		LNnT + CMP- ácido siálico → LST- c		lactosa + CMP-ácido siálico → 6'- SL	
	condición A	condición B	condición A	condición B	condición A	condición B
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5 min	0.43	0.09	0.06	0.10	0.05	0.06
15 min	1.24	0.22	0.10	0.16	0.09	0.09
30 min	2.00	0.41	0.18	0.27	0.14	0.26
1 h	3.50	0.72	0.32	0.42	0.24	0.29
2 h	4.55	1.26	0.61	0.72	0.44	0.56
3.5 h	6.07	1.87	0.88	1.20	0.68	0.83
18 h	6.61	4.40	3.15	3.99	2.38	3.17

30 Los resultados muestran que la enzima retuvo su actividad de sialil transferasa en el curso de la modificación de proteínas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Glycom A/S
- <120> Sialidasas Mutadas
- <130> DAS/P19659WO
- 40 <150> EP15171175.1
- <151> 2015-06-09
- <160> 3
- <170> BiSSAP 1.3.6
- 45 <210> 1
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-119
- 50 <400> 1

Met Cys Asn Asp Asn Gln Asn Thr Val Asp Val Val Val Ser Thr Val
 1 5 10 15
 Asn Asp Asn Val Ile Glu Asn Asn Thr Tyr Gln Val Lys Pro Ile Asp
 5 20 25 30
 Thr Pro Thr Thr Phe Asp Ser Tyr Ser Trp Ile Gln Thr Cys Gly Thr
 35 40 45
 Pro Ile Leu Lys Asp Asp Glu Lys Tyr Ser Leu Ser Phe Asp Phe Val
 50 55 60
 Ala Pro Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Phe Cys Phe Glu Phe Thr Gly
 10 65 70 75 80
 Asp Val Asp Gly Lys Arg Tyr Val Thr Gln Thr Asn Leu Thr Val Val
 85 90 95
 Ala Pro Thr Leu Glu Val Tyr Val Asp His Ala Ser Leu Pro Ser Leu
 15 100 105 110
 Gln Gln Leu Met Lys Ile Ile Gln Gln Lys Asn Glu Tyr Ser Gln Asn
 115 120 125
 Glu Arg Phe Ile Ser Trp Gly Arg Ile Gly Leu Thr Glu Asp Asn Ala
 20 130 135 140
 Glu Lys Leu Asn Ala His Ile Tyr Pro Leu Ala Gly Asn Asn Thr Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Leu Val Asp Ala Val Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Lys Asn Arg
 25 165 170 175
 Leu Asn Leu Glu Leu Asn Thr Asn Thr Ala His Ser Phe Pro Asn Leu
 180 185 190
 Ala Pro Ile Leu Arg Ile Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ile Leu Ile Ser
 30 195 200 205
 Asn Ile Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Ala Glu Tyr Val Asn Leu Tyr
 210 215 220
 Asn Trp Lys Asp Thr Glu Asp Lys Ser Val Lys Leu Ser Asp Ser Phe
 35 225 230 235 240
 Leu Val Leu Lys Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Ser Ser Glu Lys Pro Ser
 245 250 255
 Gly Ile Tyr Gly Arg Tyr Asn Trp His Gln Leu Tyr Asn Thr Ser Tyr
 40 260 265 270
 Tyr Phe Leu Arg Lys Asp Tyr Leu Thr Val Glu Pro Gln Leu His Asp
 275 280 285
 Leu Arg Glu Tyr Leu Gly Gly Ser Leu Lys Gln Met Ser Trp Asp Gly
 290 295 300
 Phe Ser Gln Leu Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Phe Leu Asn Ile Val
 45 305 310 315 320
 Gly Phe Asp Gln Glu Lys Leu Gln Gln Glu Tyr Gln Gln Ser Glu Leu

50

55

60

65

ES 2 798 373 T3

				325					330					335		
	Pro	Asn	Phe	Val	Phe	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Trp	Ala	Gly	Gly	Glu	Thr
				340					345					350		
5	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Gln	Gln	Val	Asn	Val	Val	Asn	Asn	Ala	Ile
			355					360					365			
	Asn	Glu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Arg	Glu	His	Asp	Leu	Phe	Phe
		370					375					380				
10	Lys	Gly	His	Pro	Arg	Gly	Gly	Ile	Ile	Asn	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Ser
	385					390					395					400
	Phe	Asn	Asn	Met	Ile	Asp	Ile	Pro	Ala	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Leu
				405						410					415	
15	Met	Met	Thr	Gly	Met	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Ser	Ser
			420						425					430		
	Leu	Tyr	Phe	Ser	Ile	Pro	Ala	Glu	Lys	Val	Ser	Phe	Ile	Val	Phe	Thr
			435					440					445			
20	Ser	Ser	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Arg	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Pro	Leu
		450					455					460				
	Val	Gln	Val	Met	Met	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Lys	Asp	Val	Leu
	465					470					475					480
25	Phe	Trp	Ser	Asp	Leu	Pro	Asp	Cys	Ser	Ser	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Gln
				485						490					495	
	Tyr															

<210> 2

<211> 483

30 <212> PRT

<213> Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-145

<400> 2

35

40

45

50

55

60

65

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

40
45
50
55
60
65

Gly Ile Tyr Ser Ile Tyr Asn Trp His Gln Leu Tyr His Ser Ser Tyr
 260 265 270
 Tyr Phe Leu Arg Lys Asp Tyr Leu Thr Val Glu Thr Lys Leu His Asp
 275 280 285
 5 Leu Arg Glu Tyr Leu Gly Gly Ser Leu Lys Gln Met Ser Trp Asp Thr
 290 295 300
 Phe Ser Gln Leu Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Phe Leu Asn Ile Val
 305 310 315 320
 10 Gly Phe Asp Gln Glu Lys Leu Gln Gln Glu Tyr Gln Gln Ser Glu Leu
 325 330 335
 Pro Asn Phe Val Phe Thr Gly Thr Thr Thr Trp Ala Gly Gly Glu Thr
 340 345 350
 15 Lys Glu Tyr Tyr Ala Gln Gln Gln Val Asn Val Val Asn Asn Ala Ile
 355 360 365
 Asn Glu Thr Ser Pro Tyr Tyr Leu Gly Arg Glu His Asp Leu Phe Phe
 370 375 380
 20 Lys Gly His Pro Arg Gly Gly Ile Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Asn Asn Met Ile Asp Ile Pro Ala Lys Val Ser Phe Glu Val Leu
 405 410 415
 25 Met Met Thr Gly Met Leu Pro Asp Thr Val Gly Gly Ile Ala Ser Ser
 420 425 430
 Leu Tyr Phe Ser Ile Pro Ala Glu Lys Val Ser Phe Ile Val Phe Thr
 435 440 445
 30 Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Asp Ala Leu Lys Ser Pro Leu
 450 455 460
 Val Gln Val Met Met Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
 465 470 475 480
 Phe Trp Cys

35 <210> 3
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> Photobacterium damselaе JT0160
 40 <400> 3

45
 50
 55
 60
 65

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

REIVINDICACIONES

1. Una α 2,6-transsialidasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, y que comprende por lo menos uno de:

- 5 - en la posición 156, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp; y/o
- en la posición 161, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly; y/o
- en la posición 180, un aminoácido seleccionado de Asp, Asn, Gln; y/o
- en la posición 186, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr; y/o
- 10 - en la posición 218, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr; y/o
- en la posición 222, un aminoácido seleccionado de Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His; y/o
- en la posición 235, un aminoácido seleccionado de Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu; y/o
- en la posición 242, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys; y/o
- 15 - en la posición 261, un aminoácido seleccionado de His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe; y/o
- en la posición 315, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys; y/o
- en la posición 342, un aminoácido seleccionado de Ser o Cys; y/o
- en la posición 349, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys; y/o
- en la posición 350, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe; y/o
- 20 - en la posición 356, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp; y/o
- en la posición 438, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys;

en donde dichas posiciones se definen mediante la alineación de dicha secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1 usando un algoritmo de comparación.

25 **2.** La α 2,6-transsialidasa de la reivindicación 1 que tiene una regioselectividad mejorada en una reacción de transsialidación en comparación con una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID No. 1.

30 **3.** La α 2,6-transsialidasa de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de aminoácidos por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, o la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 o su variante truncada Δ 2-15.

35 **4.** La α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia de aminoácidos por lo menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es la de la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, y mutada en las posiciones de aminoácidos siguientes:

- en la posición 156 Gly está sustituido por Ser, Cys o Tyr; y/o
- en la posición 161 Gln está sustituido por Phe o Gly; y/o
- 40 - en la posición 180 Glu está sustituido por Asp, y/o
- en la posición 186 Ala está sustituido por Tyr, Cys o Leu; y/o
- en la posición 218 Ala está sustituido por Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- en la posición 222 Asn está sustituido por Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235 Lys está sustituido por Arg, His, Cys o Val; y/o
- 45 - en la posición 242 Val está sustituido por His; y/o
- en la posición 261 Arg está sustituido por Asp, Phe, His o Val; y/o
- en la posición 315 Leu está sustituido por Cys; y/o
- en la posición 342 Thr está sustituido por Cys; y/o
- en la posición 349 Gly está sustituido por Ser o Cys; y/o
- 50 - en la posición 350 Gly está sustituido por Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356 Tyr está sustituido por Val o Phe; y/o
- en la posición 438 Pro está sustituido por His.

55 **5.** La α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una mutación en por lo menos dos de las posiciones de aminoácidos siguientes: 156, 218, 222 y 349.

6. La α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que tiene las siguientes mutaciones: A218Y, N222R y G349S.

60 **7.** La α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene además una mutación en las posiciones de aminoácidos 353, 400, o 450-458.

8. La α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que tiene las siguientes mutaciones A218Y, N222R, G349S, S412P y D451K.

65

9. Un proceso para elaborar una α 2,6-transsialidasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende los pasos de:
- 5 a) proporcionar una secuencia de ADN que codifica dicha α 2,6-transsialidasa, luego
b) expresar dicha α 2,6-transsialidasa en una célula huésped transformada con la secuencia de ADN obtenida en el paso a).
10. Un método para sintetizar un sacárido o glicoconjugado sialilado que comprende el paso de hacer reaccionar un donante de sialilo y un sacárido o glicoconjugado como aceptor en presencia de una α 2,6-transsialidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para transferir el residuo de donante de sialilo al aceptor de sacárido o glicoconjugado.
15. El método de la reivindicación 10, en donde el aceptor es un oligosacárido o glicoconjugado que comprende un oligosacárido, dicho oligosacárido tiene un residuo de galactosilo terminal en el extremo no reducto, y el residuo de sialilo es transferido por la α 2,6-transsialidasa para unirlo en la posición 6 de dicho residuo de galactosilo.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 que resulta en la formación de un oligosacárido de leche humana sialilado que tiene un residuo de galactosilo al que se une el residuo de sialilo con un enlace α 2-6.
25. El método de la reivindicación 12, en donde dicho residuo de galactosilo en dicho oligosacárido de leche humana es una parte de un residuo de N-acetil-lactosaminilo.
14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el oligosacárido de leche humana es 6'-SL, LST c, FLST c, SLNH, SLNnHI, SLNnH-II, FSLNH, FSLNH-III, FSLNnH-I, FSLNnH-II, DFSLNH-I, DFSLNnH, DSLNH-I o DSLNnH.
15. El uso de una α 2,6-transsialidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un sacárido o glicoconjugado sialilado.

ES 2 798 373 T3

SEQ ID NO. 1	MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPILKDDKEYSLS	60
SEQ ID NO. 2	MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPILKDDKEYSLS	60
SEQ ID NO. 3	MCNSDNTSLKETVSSNSADVETETYQLTPIDAPSSFLSHSWEQTCGTPILNESDKQAIS	60
SEQ ID NO. 1	FDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTLEVYVDHASLPSLQQLMKIIQ	120
SEQ ID NO. 2	FDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTLEVYVDHASLPSLQQLMKIIQ	120
SEQ ID NO. 3	FDFVAPELKQDEKYCFTFKGITGDHRYITNTTTLTVVAPTLEVYIDHASLPSLQQLIHIQ	120
SEQ ID NO. 1	QKNEYSQNERFISWGRIGLTEDNAEKLNHAHYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLE	180
SEQ ID NO. 2	QKNEYSQNERFISWGRIRLTEDNAEKLNHAHYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLE	180
SEQ ID NO. 3	AKDEYPSNQRFVSWKRVTVDADNANKLNIIHTYPLKGNNTSPEMVAAIDEYAQSKNRLNIE	180
SEQ ID NO. 1	LNTNTAHSFFNLAPILRIISSKSNILISNINLYDDGSAEYVNLYNWKDTEKSVKLSDSF	240
SEQ ID NO. 2	LNTNTGHSFRNIAPILRATSSKNNILISNINLYDDGSAEYVSLYNWKDTPDNKSQKLSDSF	240
SEQ ID NO. 3	FYTNTAHVFNNLPPIIQFLYNNEKVKISHISLYDDGSSEYVSLYQWKDTPNKIETLEGEV	240
SEQ ID NO. 1	LVLKDYFNGISSEKPSGIYGRYNWHQLYNTSYYFLRKDYLTVEPQLHDLREYLGGS LKQM	300
SEQ ID NO. 2	LVLKDYLNIGISSEKPNGIYSIYNWHQLYHSSYYFLRKDYLTVETKLHDLREYLGGS LKQM	300
SEQ ID NO. 3	SLLANYLAGTSPDAPKMGNRYNWHKLYDTDYFFLREDYLDVEANLHDLRDLGSSAKQM	300
SEQ ID NO. 1	SWDGFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 2	SWDTFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 3	PWDEFAKLSDSQQTLEFLDIVGFDKEQLQQQYSQSPLPNFI FTGTTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 1	VNVVNAINNETSPYYLGREHDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNNMIDI PAKVSFEVLMMTG	420
SEQ ID NO. 2	VNVVNAINNETSPYYLGREHDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNNMIDI PAKVSFEVLMMTG	420
SEQ ID NO. 3	VNVINNAINNETSPYYLGKDYDLFFKGHPRAGGVINDIILGSFPDMINI PAKISFEVLMMTD	420
SEQ ID NO. 1	MLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMMLTGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 2	MLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMMLTGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 3	MLPDTVAGIASSLYFTIPADRVNFIVFTSSDTITDREERALKSPLVQVMMLTGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 1	FWSDLPDCSSGVCIAQY-----	497
SEQ ID NO. 2	FWC-----	483
SEQ ID NO. 3	FWADHKVNSMEVAIDEACTRIIAKRQPTASDLRLVIAI IKTITDLERIGDVAESI AKVAL	540
SEQ ID NO. 1	-----	497
SEQ ID NO. 2	-----	483
SEQ ID NO. 3	ESFSNKQYNLLVSLES LGQHTVRMLHEVLDAFARMVKAAIEVYQEDDRI DQEYESIVRQ	600
SEQ ID NO. 1	-----	497
SEQ ID NO. 2	-----	483
SEQ ID NO. 3	LMAHMEDPSSI PNVMKVMWAARSIERVGDRCQNICYIIYFVKGKDV RHTKPD DFGTML	660
SEQ ID NO. 1	--	497
SEQ ID NO. 2	-	483
SEQ ID NO. 3	D	661

Figura 1

ES 2 798 373 T3

SEQ ID NO. 1	1 MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCTGTP	50
SEQ ID NO. 2	1 MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCTGTP	50
SEQ ID NO. 1	51 LKDDEKYSLSFDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTL	100
SEQ ID NO. 2	51 LKDDEKYSLSFDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTL	100
SEQ ID NO. 1	101 EVYVDHASLPSLQQLMKIIQQKNEYSQNERFISWGRIGLTEDNAEKLNAH	150
SEQ ID NO. 2	101 EVYVDHASLPSLQQLMKIIQQKNEYSQNERFISWGRIRLTEDNAEKLNAH	150
SEQ ID NO. 1	151 IYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLELNTNTAHSFPNLAPILRIIS	200
SEQ ID NO. 2	151 IYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLELNTNTGHSFRNIAPILRATS	200
SEQ ID NO. 1	201 SKSNILISNINLYDDGSAEYVNLYNWKDTEKSVKLSDSFVLVKDYFNGI	250
	:	
SEQ ID NO. 2	201 SKNNILISNINLYDDGSAEYVSLYNWKDTDNKSQKLSDSFVLVKDYLNIGI	250
SEQ ID NO. 1	251 SSEKPSGIYGRYNWHQLYNTSYYFLRKDYLTVEPQLHDLREYLGGSQKQ	300
	:	
SEQ ID NO. 2	251 SSEKPNGIYSIYNWHQLYHSSYYFLRKDYLTVETKLHDLREYLGGSQKQ	300
SEQ ID NO. 1	301 SWDGFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTTWAGG	350
	.	
SEQ ID NO. 2	301 SWDTFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTTWAGG	350
SEQ ID NO. 1	351 ETKEYYAQQQVNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPRGGIINDIILGS	400
SEQ ID NO. 2	351 ETKEYYAQQQVNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPRGGIINDIILGS	400
SEQ ID NO. 1	401 FNNMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSS	450
SEQ ID NO. 2	401 FNNMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSS	450
SEQ ID NO. 1	451 DTITDREDALKSPLVQVMMTLGIVKEKDVLFWSDLPCSSGVCIAQY	497
SEQ ID NO. 2	451 DTITDREDALKSPLVQVMMTLGIVKEKDVLFWC-----	483

Figura 2

