

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 973**

51 Int. Cl.:

C07H 5/06 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

C07H 3/04 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/IB2016/053412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16199071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16806994 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3307752**

54 Título: **Mezclas ternarias de 6'-SL, LNnT y LST c**

30 Prioridad:

09.06.2015 EP 15171177

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

28.10.2021

73 Titular/es:

GLYCOM A/S (100.0%)

Kogle Allé 4

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

CHAMPION, ELISE;

MCCONNELL, BRUCE y

DEKANY, GYULA

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 870 973 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

Mezclas ternarias de 6'-SL, LNnT y LST c

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a mezclas ternarias de oligosacáridos de leche humana (HMO), particularmente mezclas de 6'-O-sialilactosa (6'-SL), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y sialilacto-N-tetraosa c (LST c), un proceso para hacer las mezclas ternarias, y aplicaciones de las mezclas ternarias en la salud humana.

10

Antecedentes de la invención

Los HMO se han convertido en un tema de gran interés en los últimos años debido a sus roles en numerosos procesos biológicos que ocurren en el organismo humano. La leche de mamíferos contiene al menos 130 de estos oligosacáridos complejos (Urashima y otros: Milk Oligosaccharides, Nova Biomedical Books, Nueva York, 2011, ISBN: 978-1-61122-831-1).

15

Anteriormente, la única fuente de HMO había sido la leche de mamíferos que contiene principalmente agua, junto con 55-70 g/L de lactosa, 24-59 g/L de lípidos, aproximadamente 13 g/L de proteínas, 5-15 g/L de HMO y aproximadamente 1,5 g/L de minerales.

20

Sin embargo, los esfuerzos para desarrollar procesos para sintetizar estos oligosacáridos se han incrementado significativamente en los últimos diez años debido a sus roles en numerosos procesos biológicos humanos. En este sentido, se han desarrollado procesos para la producción de HMO mediante fermentaciones microbianas, procesos enzimáticos, síntesis químicas o combinaciones de estas tecnologías. Por ejemplo, mediante procesos químicos, LNnT puede prepararse como se describe en los documentos WO 2011/100980 y WO 2013/044928, LNT puede sintetizarse como se describe en los documentos WO 2012/155916 y WO 2013/044928, puede prepararse una mezcla de LNT y LNnT como se describe en el documento WO 2013/091660, 2'-FL puede prepararse como se describe en el documento WO 2010/115934 y WO 2010/115935, 3-FL puede prepararse como se describe en el documento WO 2013/139344, y 6'-SL y sales de las mismas pueden prepararse como se describe en el documento WO 2010/100979. Como ejemplos de procesos biotecnológicos, los documentos WO 01/04341 y WO 2007/101862 describen cómo preparar oligosacáridos centrales de la leche humana opcionalmente sustituidos por fucosa o ácido siálico mediante el uso de *E. coli* genéticamente modificada. Como ejemplo de procesos enzimáticos, pueden prepararse oligosacáridos sialilados como se describe en el documento EP-A-577580.

25

30

También se han realizado esfuerzos para desarrollar procesos para sintetizar enzimáticamente mezclas de oligosacáridos de HMO, sin tener que sintetizar todos los oligosacáridos componentes de la mezcla como se describe en los documentos WO 2012/156897 y WO 2012/156898. Tales procesos han proporcionado mezclas de reacción que contienen una pluralidad de diferentes oligosacáridos.

40

El documento US 2004/0219158 describe composiciones y métodos relacionados con el diagnóstico y la terapia de afecciones médicas que implican infección con bacterias *Pseudomonas*, incluidos oligosacáridos para la inhibición de bacterias *Pseudomonas*.

45 El documento US2014/0187464 describe una mezcla sintética de, al menos, seis oligosacáridos en el tratamiento de la microbiota en un mamífero.

Sin embargo, se han buscado mejores procesos para la síntesis de mezclas de HMO, especialmente mezclas que consisten de tres HMO, particularmente 6'-SL, LNnT y LST c.

50

La evidencia se acumula de que la comunidad residente de microbios, llamada microbioma, en el tracto digestivo humano juega un papel importante en la salud y la enfermedad. Cuando la composición normal del microbioma se desequilibra, el huésped humano puede sufrir consecuencias. Investigaciones recientes han implicado a los desequilibrios del microbioma en trastornos tan diversos como cáncer, obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, asma y posiblemente incluso autismo. Se cree que los HMO modulan positivamente el microbioma y son de creciente interés para este propósito. Sin embargo, la notable diversidad de los HMO, junto con su falta de disponibilidad, ha obstaculizado los estudios de las funciones específicas de los HMO individuales. Existe una clara necesidad de HMO específicos o combinaciones de HMO para modular el microbioma de la manera deseada, a fin de abordar problemas específicos de la salud humana.

60

Resumen de la invención

Un primer aspecto de esta invención se refiere a una primera mezcla de HMO que consiste esencialmente de 6'-O-sialilactosa (6'-SL), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y sialilacto-N-tetraosa c (LST c). Ventajosamente en esta primera mezcla de HMO, la relación molar de LST c con respecto a (6'-SL + LNnT) es al menos 1:18, ventajosamente al menos 1:8, más ventajosamente al menos 1:5, incluso más ventajosamente al menos 1:3. También ventajosamente

65

en la primera mezcla, la relación molar de 6'-SL con respecto a LNnT es 0,18-5,5, más ventajosamente 0,3-3, todavía más ventajosamente aproximadamente 1.

Un segundo aspecto de esta invención se refiere a un proceso para preparar la primera mezcla de HMO al hacer reaccionar un donante de 6'-SL y un aceptor de LNnT en presencia de una α 2,6-transsialidasa y luego eliminar la lactosa y la α 2,6-transsialidasa del medio de reacción. Ventajosamente, el proceso implica el uso de 6'-SL y LNnT en una relación molar de 1:3 a 3:1, ventajosamente 1:2 a 2:1, más ventajosamente 1:1, con una α 2,6-transsialidasa que tiene un tasa de conversión de al menos 20 % hasta 55 %, ventajosamente al menos 30 %, más ventajosamente al menos 40 %, incluso más ventajosamente al menos 45 %, para la reacción de 6'-SL y LNnT.

Un tercer aspecto de esta invención se refiere a una segunda mezcla de HMO que consiste esencialmente en 6'-SL, LNnT, LST c y lactosa. Ventajosamente en esta segunda mezcla:

- la relación molar de (6'-SL + LNnT) con respecto a LST c es 2-18 y
- la relación molar de lactosa con respecto a LST c es aproximadamente 1.

Más ventajosamente, una de las relaciones molares 6'-SL a LST c y LNnT a LST c no es mayor de 4. Incluso más ventajosamente, la segunda mezcla de HMO tiene una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,18-5,5.

Un cuarto aspecto de esta invención se refiere a un proceso para preparar la segunda mezcla de HMO al hacer reaccionar un donante de 6'-SL y un aceptor de LNnT en presencia de una α 2,6-transsialidasa, y luego eliminar la α 2,6-transsialidasa del medio de reacción. La mezcla de reacción resultante es una segunda mezcla de HMO de esta invención.

Un quinto aspecto de esta invención se refiere a una composición antiinfecciosa para usar en el tratamiento de infecciones bacterianas que comprende 6'-SL, LNnT y LST c. Esta composición contiene una mezcla de una pluralidad de diferentes HMO con propiedades y actividades biológicas novedosas. Específicamente, la composición aumenta la abundancia de *Bifidobacterium* del microbioma en un ser humano. Además, la composición inhibe la unión de patógenos y, por lo tanto, protege al huésped de infecciones, especialmente infecciones del tracto respiratorio. La composición también puede usarse para tratar y/o reducir el riesgo de una amplia gama de infecciones bacterianas de un ser humano, especialmente infecciones del tracto respiratorio. La composición antiinfecciosa es ventajosamente la primera o segunda mezcla de esta invención, más ventajosamente la primera mezcla, como se describió anteriormente.

Un sexto aspecto de esta invención se refiere a una composición para modular el microbioma de un ser humano, en particular un individuo no infantil, para incrementar la abundancia de *Bifidobacterium*, la composición que comprende 6'-SL, LNnT y LST c, ventajosamente la primera o segunda mezcla de esta invención, más ventajosamente la primera mezcla, como se describió anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras están destinadas a ilustrar aún más la invención. No pretenden limitar el tema en cuestión de la invención.

Figura 1: muestra las secuencias y alineamiento 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. 3). Las secuencias se alinearon por Alineamiento Múltiple de Secuencias (MSA) mediante el uso de CLUSTAL Omega (1.2.1) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

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

Figura 3: muestra las secuencias y alineamiento de 2 α 2,6-sialil transferasas: sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal (Δ 2-15) (al ser 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 por Alineamiento de Pares de Secuencias mediante el uso de EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con esta invención, se ha descubierto sorprendentemente que una mezcla de 6'-SL, LNnT y LST c posee una actividad antiinfecciosa y, por lo tanto, puede usarse como una composición antiinfecciosa, por ejemplo, para tratar infecciones bacterianas mediante modulación específica del microbioma y al evitar la unión de patógenos a las células epiteliales. La mezcla aumenta la abundancia del microbioma de *Bifidobacterium*. La mezcla también

reduce la abundancia del microbioma de *Firmicutes*, especialmente las especies de *Clostridia*. La mezcla también se une a una variedad de patógenos respiratorios que inhiben la unión de estos patógenos a las células epiteliales. De esta manera, la mezcla proporciona una forma de protección contra infecciones, especialmente infecciones del tracto respiratorio.

La presente invención se refiere a mezclas sintéticas de HMO. El término "mezcla sintética" o "composición sintética" designa una mezcla o composición que se prepara artificialmente y preferentemente significa una mezcla o composición que contiene al menos un compuesto que se produce *ex vivo* química y/o biológicamente, por ejemplo, por medio de una reacción química, reacción enzimática o de forma recombinante. En este sentido, "sintético" se usa como opuesto a "natural", y significa que una mezcla o composición sintética de la invención no es idéntica a una composición o mezcla natural, como la leche humana, o al menos un HMO de la mezcla o la composición no se origina a partir de una fuente natural, como por ejemplo la leche humana.

La primera mezcla de HMO y su producción

La mezcla de esta invención puede ser una primera mezcla de HMO que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT y LST c. La relación molar de HMO en la primera mezcla puede variar. En una modalidad, la relación molar de LST c con respecto a una combinación 6'-SL + LNnT es al menos 1:18. En otra forma de modalidad, esta relación puede ser de al menos 1:8. Ciertas relaciones de LST c con respecto a una combinación 6'-SL + LNnT en la primera mezcla, tales como al menos 1:5 o al menos 1:3, pueden ser preferidas en algunas modalidades. En algunas otras modalidades, la primera mezcla de HMO puede tener una relación molar de 6'-SL con respecto a LNnT de 0,18-5,5 o 0,3-3, preferentemente alrededor de 1.

La primera mezcla de HMO puede obtenerse fácilmente mediante un proceso, que implica tratar un donante de 6'-SL y un aceptor de LNnT, con una α 2,6-transsialidasa y luego eliminar la lactosa y la α 2,6-transsialidasa del medio de reacción. En una modalidad, este proceso comprende la etapa de poner en contacto 6'-SL y LNnT en una relación molar de preferentemente 1:3 a 3:1 o 1:2 a 2:1, tal como alrededor de 1:1, con un α 2,6-transsialidasa que tiene una tasa de conversión para la reacción 6'-SL y LNnT de al menos 20 %, hasta aproximadamente 55 %, preferentemente al menos 30 % tal como de al menos 30 % a aproximadamente 50 %, al menos 40 % o al menos el 45 %. La mezcla de reacción, así producida, que contiene LST c, lactosa, 6'-SL, LNnT y α 2,6-transsialidasa sin reaccionar, se somete luego a etapas de purificación convencionales para eliminar sustancias distintas de 6'-SL, LNnT y LST c, es decir α 2,6-transsialidasa y lactosa. Si la mezcla se obtiene mediante una reacción enzimática *in situ*, la α 2,6-transsialidasa se puede inactivar y eliminar, por ejemplo, mediante desnaturalización seguida de centrifugación o ultrafiltración, para producir una mezcla que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT, LST c y lactosa. La lactosa en esta mezcla puede separarse luego de la 6'-SL, LNnT y LST c, por ejemplo, mediante ultra y/o nanofiltración en cascada, o la lactosa puede tratarse primero con lactasa para degradarla a glucosa y galactosa que luego puede ser separada del 6'-SL, LNnT y LST c mediante ultra y/o nanofiltración. En caso de producir la mezcla que contiene LST c, lactosa, 6'-SL, LNnT y α 2,6-transsialidasa sin reaccionar de forma recombinante, es decir, por un proceso de fermentación mediante el uso de un microorganismo modificado genéticamente, tal como una bacteria, que expresa una α 2,6-transsialidasa recombinante, la purificación de la mezcla de HMO puede realizarse mediante etapas de eliminación del material celular del caldo de fermentación seguido de la eliminación de partículas que no son carbohidratos y contaminantes como sales, moléculas cargadas, proteínas, ADN, colorantes/cuerpos de caramelo, etc. para producir una mezcla que consiste esencialmente de 3'-SL, 3-FL, FSL y lactosa. La separación de lactosa puede realizarse como se describió anteriormente.

La segunda mezcla de HMO y su producción

La mezcla de esta invención también puede ser una segunda mezcla de HMO que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT, LST c y lactosa. Preferentemente, en esta segunda mezcla:

- la relación molar de (6'-SL + LNnT) con respecto a LST c es 2-18, y
- la relación molar de lactosa con respecto a LST c es aproximadamente 1.

Con mayor preferencia, una de las relaciones molares 6'-SL a LST c y LNnT a LST c no es más de 4.

La segunda mezcla de HMO de la invención puede obtenerse al llevar a cabo el proceso como se describió anteriormente, que no comprende una etapa de eliminación de lactosa de las mezclas de HMO obtenidas. En una modalidad, 6'-SL y LNnT se hacen reaccionar en una relación molar de preferentemente 1:3 a 3:1, con mayor preferencia 1:2 a 2:1, incluso con mayor preferencia 1:1, con una α 2,6-transsialidasa en donde la tasa de conversión es al menos 20 %, ventajosamente al menos 30 %, más ventajosamente al menos 40 %, incluso más ventajosamente al menos 45 %. Preferentemente, en la segunda mezcla de HMO resultante, la relación molar de 6'-SL a LNnT es 0,3-3.

Modalidades de la primera y segunda mezclas de HMO

Cuando el proceso de esta invención se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 2:1 a 1:2 y una tasa de conversión de 20-50 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2-13 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,33-3.

5 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1:1 y una tasa de conversión de 20-45 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2,44-8 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1.

10 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 3:1 a 1:3 y una tasa de conversión de 30-50 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2-12 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,2-5.

15 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 2:1 a 1:2 y una tasa de conversión de 30-50 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2-8 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,33-3.

20 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1:1 y una tasa de conversión de 30-45 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2,44-5 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1.

25 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 3:1 a 1:3 y una tasa de conversión de 25-35 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 3,7-14 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,25-4,1.

30 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 2:1 a 1:2 y una tasa de conversión de 25-35 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 3,7-10 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,39-2,54.

35 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1:1 y una tasa de conversión de 25-35 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 3,7-6 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1.

40 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 3:1 a 2:1 y una tasa de conversión de 30-50 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 4-12 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 2,43-5.

45 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 2:1 a 1:1 y una tasa de conversión de 20-45 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2,44-13 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1-2,82.

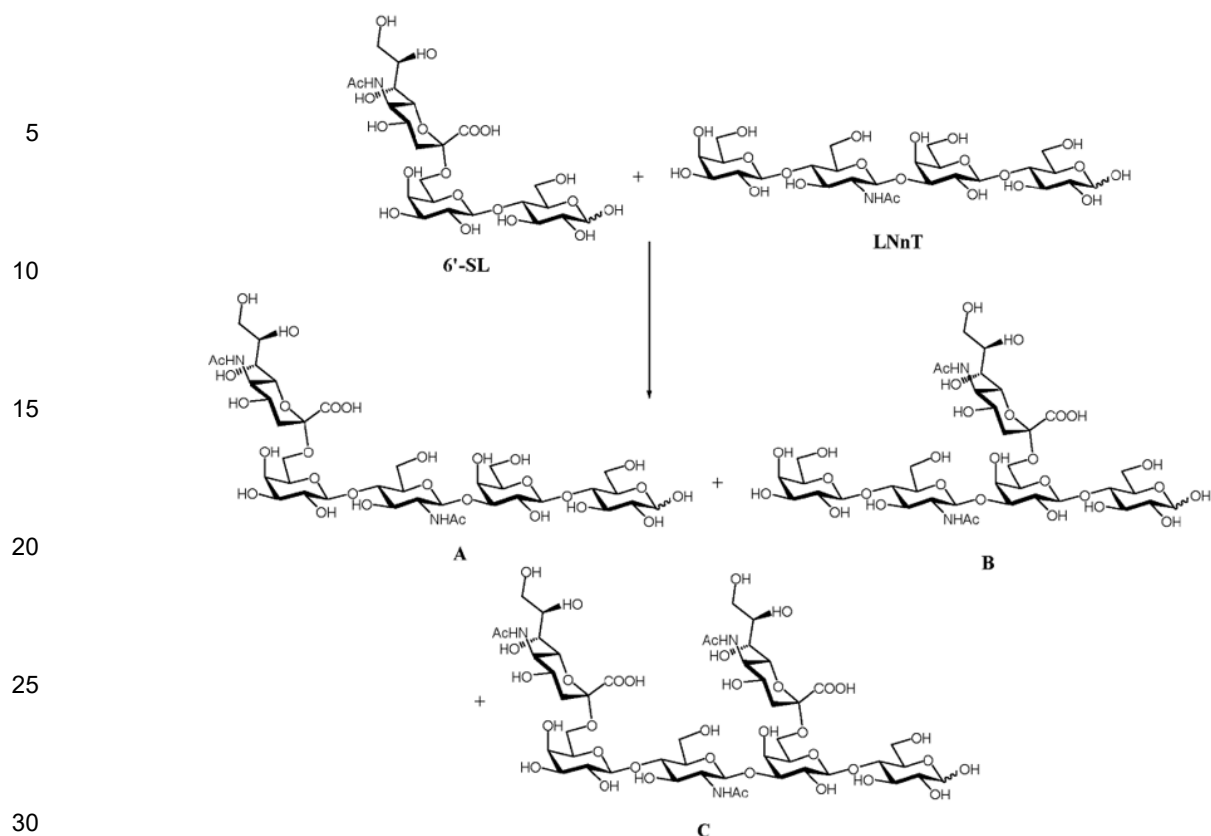
50 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1:1 a 1:2 y una tasa de conversión de 20-45 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 2,44-13 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,35-1.

55 Cuando el proceso se lleva a cabo con una relación molar de 6'-SL a LNnT de 1:2 a 1:3 y una tasa de conversión de 30-50 %, pueden prepararse una primera o una segunda mezcla de HMO que tienen una relación molar de (6'-SL + LNnT) a LST c de 4-12 y una relación molar de 6'-SL a LNnT de 0,20-0,41.

Producción enzimática de las mezclas de HMO de la invención

50 De acuerdo con esta invención, el término "α2,6-transsialidasa" significa cualquier sialidasa de tipo salvaje o modificada genéticamente que es capaz de transferir un residuo de sialilo a la posición 6 de una unidad de galactosa, preferentemente terminal, en un aceptor de oligosacáridos. Para preparar la primera o la segunda mezclas de HMO, la α2,6-transsialidasa debe ser regioselectiva con respecto al aceptor de LNnT ya que contiene dos unidades de galactosilo. Las α2,6-transsialidasas usadas para este propósito serán regioselectivas al residuo galactosilo terminal de la LNnT, es decir, se prefiere la formación de LST c (representada como compuesto **A**) sobre la del compuesto **B** y/o el compuesto **C** (véase, esquema 1). Por tanto, cuando se emplea una α2,6-transsialidasa regioselectiva, la reacción debe detenerse antes de que se produzca una formación significativa de subproductos. Este punto de tiempo puede determinarse fácilmente mediante mediciones cinéticas enzimáticas bien conocidas y, en el caso de las enzimas más específicas, no puedan observarse subproductos incluso al 45 % de conversión cuando se emplean 6'-SL y LNnT en relación equimolar. La conversión sin la aparición de subproductos puede ser mayor cuando se usa en exceso 6'-SL o LNnT.

65



Esquema 1.

35 La α 2,6-transsialidasa usada para preparar las mezclas de HMO de esta invención puede ser cualquier enzima de tipo salvaje que tenga actividad α 2,6-transsialidasa, tal como una α 2,6-sialil transferasa de *Photobacterium damselae* JT0160 (US 5827714, US 6255094, Yamamoto y otros J. Biochem. 123, 94 (1998)), *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 (US 7993875, US 8187838, Tsukamoto y otros J. Biochem. 143, 187 (2008)) *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 (US 8187853, US 8372617, Yamamoto y otros Glycobiology 17, 1167 (2007)) o *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 (US 2012/184016, Mine y otros Glycobiology 20, 158 (2010)).

40 La α 2,6-transsialidasa usada para preparar las mezclas de HMO de esta invención tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, y que comprende al menos uno de:

- 45 - en la posición 156, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr; y/o
- 50 - en la posición 161, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferentemente Phe o Gly; y/o
- en la posición 180, un aminoácido seleccionado de Asp, Asn, Gln, preferentemente Asp; y/o
- 55 - en la posición 186, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferentemente 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, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
- 60 - en la posición 222, un aminoácido seleccionado de Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
- en la posición 235, un aminoácido seleccionado de Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferentemente Arg, His, Cys o Val; y/o
- 65 - en la posición 242, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferentemente His; y/o

ES 2 870 973 T3

- en la posición 261, un aminoácido seleccionado de His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferentemente Asp, Phe, His o Val; y/o
- 5 - en la posición 315, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferentemente Cys; y/o
- en la posición 342, un aminoácido seleccionado de Ser o Cys, preferentemente Cys; y/o
- en la posición 349, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys; y/o
- 10 - en la posición 350, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferentemente Val o Phe; y/o
- 15 - en la posición 438, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferentemente His; en donde dichas posiciones se definen por alineamientos de dicha secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1 mediante el uso de un algoritmo de comparación.
- 20 Por consiguiente, la α 2,6-transsialidasa usada para preparar las mezclas de HMO de esta invención es preferentemente una α 2,6-transsialidasa mutada que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID No. 1 (es decir, tiene al menos 60 por ciento (%) de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1) y se ha mutado (es decir, un aminoácido se ha reemplazado por otro aminoácido) en una o más posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la
- 25 SEQ ID No. 1) de la siguiente manera:
 - 156 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr;
 - 161 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferentemente Phe o Gly;
 - 30 - 180 que está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferentemente Asp;
 - 186 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferentemente Tyr, Cys o Leu;
 - 35 - 218 que está sustituido por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr;
 - 222 que está sustituido por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe;
 - 40 - 235 que está sustituido por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferentemente Arg, His, Cys o Val;
 - 242 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferentemente His;
 - 45 - 261 que está sustituido por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferentemente Asp, Phe, His o Val;
 - 315 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferentemente Cys;
 - 342 que está sustituido por Ser o Cys, preferentemente Cys;
 - 50 - 349 que está sustituido por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys;
 - 350 que está sustituido por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Ser, Tyr, Phe o Cys;
 - 55 - 356 que está sustituido por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferentemente Val o Phe; o
 - 438 que está sustituido por Arg, His o Lys, preferentemente His.

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

Las α 2,6-transsialidasas mutadas definidas anteriormente muestran regioselectividad mejorada en comparación con la enzima parental de tipo salvaje (no mutada) que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica con la de la SEQ ID

No. 1 u otras enzimas de tipo salvaje correspondiente (no mutadas) que tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica con la SEQ ID No. 1, y de cuyas enzimas de tipo salvaje proceden los mutantes.

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

De acuerdo con esta invención, los términos "identidad sustancial" y "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significan preferentemente que las dos o más secuencias son iguales o tienen al menos aproximadamente un 60 % de nucleótidos o residuos de aminoácidos en común cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o secuencias designadas de ácidos nucleicos o aminoácidos (es decir, las secuencias tienen al menos aproximadamente un 60 por ciento (%) de identidad). El porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos puede medirse mediante el uso de algoritmos de comparación de secuencias BLAST 2.0 con parámetros predeterminados o mediante alineamientos manual e inspección visual (véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). De acuerdo con esta invención, el porcentaje de identidad de: i) un fragmento polipeptídico que es "sustancialmente idéntico" con un polipéptido de la SEQ ID No. 1 o ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento polipeptídico y que es "sustancialmente idéntico" con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la SEQ ID No. 1 es preferentemente al menos 65 %, con mayor preferencia al menos 70 %, aún con mayor preferencia al menos 75 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, aún con mayor preferencia al menos 85 %, aún con mayor preferencia al menos 90 %, aún con mayor preferencia al menos 92 %, especialmente al menos 93 %, más especialmente al menos 94 %, incluso más especialmente al menos 95 %, aún más especialmente al menos 96 %, particularmente al menos 97 %, más particularmente al menos 98 %, y más particularmente al menos 99 % idéntico a la SEQ ID No. 1. Esta definición también se aplica al complemento de una secuencia de prueba y a las secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como a las que tienen sustituciones. En este sentido, la posición de una mutación en la secuencia de aminoácidos de las nuevas transsialidasas modificadas genéticamente (mutadas) de la invención con referencia a la SEQ ID No. 1 significa que la posición está definida por el alineamiento de la secuencia de transsialidasa de prueba con la SEQ ID No. 1 mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencias de proteínas o mediante el alineamiento manual y la inspección visual mencionados anteriormente. En las figuras 1-3 se muestran ejemplos de tales secuencias alineadas. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad, similitud de secuencia y la preparación de alineamientos es el algoritmo BLAST 2.2.20+, que se describe en Altschul y otros Nucl. Acids Res. 25, 3389 (1997). El BLAST 2.2.20+ se usa para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los ejemplos de algoritmos de alineamientos 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/>).

Las α 2,6-sialil transferasas de tipo salvaje preferidas con una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica con la SEQ ID No. 1, que tienen al menos aproximadamente un 60 por ciento de identidad de secuencia (determinada por BLAST) con la SEQ ID No. 1, se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1.

Descripción	Identidad	Número de acceso
α 2,6-sialil transferasa [<i>Photobacterium leiognathi</i>]	100 %	BAI49484.1
α 2,6-sialil transferasa [<i>Photobacterium leiognathi</i>]	96 %	BAF91416.1
Cadena A, estructura cristalina de la sialil transferasa de <i>Photobacterium damselae</i> , residuos 113-497	70 %	4R9V_A
sialil transferasa 0160 [<i>Photobacterium damselae</i>]	68 %	WP_005298232.1
Cadena A, estructura cristalina de la sialil transferasa de <i>Photobacterium damselae</i>	67 %	4R83_A
sialil transferasa 0160 [<i>Photobacterium damselae</i>]	66 %	BAA25316.1

Preferentemente, las α 2,6-sialil transferasas con una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica con la SEQ ID No. 1 que pueden mutarse para tener una actividad α 2,6-transsialidasa 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, o la sialil transferasa de *P. damselae* JT0160 o su variante truncada Δ 2-15, con mayor preferencia la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15.

En la α 2,6-transsialidasa mutada usada para preparar las mezclas de HMO de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es preferentemente 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, o la sialil transferasa de *P. damselae* JT0160 o su variante truncada Δ 2-15, y tiene las siguientes mutaciones (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

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

45 Preferentemente, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, con mayor preferencia 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 comprende mutaciones en las siguientes posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- 55 - en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr; y/o
- en la posición 161, Gln está sustituida por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferentemente Phe o Gly; y/o
- 60 - en la posición 180, Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferentemente Asp y/o
- en la posición 186, Ala o Gly está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferentemente Tyr, Cys o Leu; y/o

ES 2 870 973 T3

- en la posición 218, Ala está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - 5 - en la posición 222, Asn o Ser está sustituida por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 235, Lys está sustituida por Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferentemente Arg, His, Cys o Val; y/o
 - 10 - en la posición 242, Val está sustituida por Arg, His o Lys, preferentemente His; y/o
 - en la posición 261, Arg o Ile está sustituida por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferentemente Asp, Phe, His o Val; y/o
 - 15 - en la posición 315, Leu está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Cys; y/o
 - en la posición 342, Thr está sustituida por Ser o Cys, preferentemente Cys; y/o
 - 20 - en la posición 349, Gly está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys; y/o
 - en la posición 350, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
 - 25 - en la posición 356, Tyr está sustituida por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferentemente Val o Phe; y/o
 - en la posición 438, Pro está sustituida por Arg, His o Lys, preferentemente His.
- Con mayor preferencia, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica con 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, que está mutada en las siguientes posiciones de aminoácidos (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):
- 30 - en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr; y/o
 - 35 - en la posición 161, Gln está sustituida por Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferentemente Phe o Gly; y/o
 - en la posición 180, Glu está sustituido por Asp, Asn, Gln, preferentemente Asp y/o
 - 40 - en la posición 186, Ala está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferentemente Tyr, Cys o Leu; y/o
 - 45 - en la posición 218, Ala está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - en la posición 222, Asn está sustituida por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - 50 - en la posición 235, Lys está sustituida por Arg, His, Ser, Thr, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferentemente Arg, His, Cys o Val; y/o
 - en la posición 242, Val está sustituida por Arg, His o Lys, preferentemente His; y/o
 - 55 - en la posición 261, Arg está sustituida por His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferentemente Asp, Phe, His o Val; y/o
 - en la posición 315, Leu está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Cys; y/o
 - 60 - en la posición 342, Thr está sustituida por Ser o Cys, preferentemente Cys; y/o
 - en la posición 349, Gly está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys; y/o

ES 2 870 973 T3

- en la posición 350, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
- en la posición 356, Tyr está sustituida por Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferentemente Val o Phe; y/o
- en la posición 438, Pro está sustituida por Arg, His o Lys, preferentemente His.

También preferentemente, en la α 2,6-transsialidasa mutada usada en la preparación de las mezclas de HMO de esta invención, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica, particularmente al menos en un 90 % idéntica, con la SEQ ID No. 1 tiene al menos dos, preferentemente al menos tres, mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de posiciones de aminoácidos de la siguiente manera (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

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

Estas α 2,6-transsialidasas mutadas se caracterizan por una regioselectividad incluso más mejorada hacia el resto de galactosilo terminal frente a un resto de galactosilo interno de LNnT en comparación con las enzimas mutadas de un punto divulgadas anteriormente en las reacciones de transsialidasa y/o sialil transferasa.

De acuerdo con una modalidad preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica, particularmente al menos 90 % idéntica, con la SEQ ID No. 1 tiene al menos dos, preferentemente al menos tres, mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de posiciones de aminoácidos de la siguiente manera (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

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

- sustitución del aminoácido en la posición 349 por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys.

De acuerdo con una modalidad más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, es preferentemente 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, o la sialil transferasa de *P. damselae* JT0160 o su variante truncada Δ 2-15, que comprende al menos dos, preferentemente al menos tres, mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones de la siguiente manera (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr;

- en la posición 218, Ala o Ser está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr;

- en la posición 222, Asn o Ser está sustituida por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y

- en la posición 349, Gly está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys.

De acuerdo con una modalidad aún más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica, particularmente al menos 90 % idéntica, con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es preferentemente 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, que comprende al menos dos, preferentemente al menos tres, mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1):

- en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr;

- en la posición 218, Ala está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr;

- en la posición 222, Asn o Ser está sustituida por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y

- en la posición 349, Gly está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys.

De acuerdo con una modalidad incluso más preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica, particularmente al menos 90 % idéntica, con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 es preferentemente la sialil transferasa de *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 o su variante truncada Δ 2-15, que comprende al menos dos, preferentemente al menos tres, mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las siguientes posiciones de la siguiente manera:

- en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr;

- en la posición 218, Ala está sustituida por Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Gly o Thr, preferentemente Ile, Val, Phe o Tyr;

- en la posición 222, Asn está sustituida por Gln, Asp, Glu, Cys, Thr, Phe, Tyr, Trp, Arg, Lys o His, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y

- en la posición 349, Gly está sustituida por Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys.

De acuerdo con una modalidad especialmente preferida, en la α 2,6-transsialidasa mutada, la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica, particularmente al menos 90 % idéntica, con 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, contiene las siguientes mutaciones: A218Y, N222R y G349S (numeración correspondiente al alineamiento de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1).

Además de la regioselectividad, es importante que la actividad transsialidasa de la α 2,6-transsialidasa sea mayor que su actividad hidrolítica. En el curso de la reacción $6\text{'-SL} + \text{LNnT} \rightleftharpoons \text{LST c} + \text{Lac}$, la hidrólisis de LST c puede volverse significativa en un cierto punto de tiempo, debido a la concentración creciente de LST c, que luego se degrada en LNnT y ácido siálico. Para preparar las mezclas de HMO de la invención, la reacción debe detenerse

antes de que se produzca una hidrólisis significativa del producto. Este punto de tiempo puede determinarse fácilmente mediante mediciones cinéticas enzimáticas bien conocidas.

5 Las α 2,6-transsialidasas para preparar las mezclas de HMO de esta invención se seleccionan preferentemente de las α 2,6-transsialidasas que carecen de actividad hidrolítica, o al menos tienen una actividad hidrolítica significativamente reducida, y tienen un alto grado de regiospecificidad como se discutió anteriormente.

10 Al llevar a cabo el proceso de esta invención, en particular las concentraciones relativas del donante de 6'-SL, aceptor de LNnT, la α 2,6-transsialidasa, el disolvente acuoso y el tampón de incubación (por ejemplo, KHPO₄ 100 mM) no son críticos. A este respecto, el proceso se puede llevar a cabo de manera adecuada a temperatura ambiente (por ejemplo, 15-50, preferentemente 20-37 °C) a un pH de 6-8, preferentemente alrededor de 6, durante 15 minutos a 24 horas.

15 En una modalidad preferida, cualquiera de las mezclas de HMO de la invención se produce por un microorganismo genéticamente modificado para expresar una α 2,6-transsialidasa como se describió anteriormente. Los métodos de modificaciones genéticas de microorganismos para la producción recombinante de moléculas biológicamente activas y la manipulación molecular de moléculas enzimáticas son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Green MR & Sambrook J: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4ta ed, 2012, CSHL PRESS.

20 Uso de las mezclas de HMO de la invención

Sorprendentemente, las mezclas de HMO que contienen 6'-SL, LNnT y LST c son composiciones antiinfecciosas, por lo que pueden usarse ventajosamente para tratar infecciones virales y/o bacterianas, especialmente infecciones del tracto respiratorio.

25 Por consiguiente, en una modalidad, las composiciones antiinfecciosas de esta invención pueden ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede contener además un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, mezclas de etanol en agua, agua y emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, así como varios agentes humectantes o excipientes. La composición farmacéutica de la invención también puede contener otros materiales que no produzcan una reacción adversa, alérgica o de cualquier otra manera no deseada cuando se administran a un paciente. Los portadores y otros materiales pueden incluir disolventes, dispersantes, de recubrimientos, agentes promotores de la absorción, agentes de liberación controlada y uno o más excipientes inertes, tales como almidones, polioles, agentes de granulación, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes y agentes desintegrantes. Si se desea, las dosificaciones en tabletas de las composiciones antiinfecciosas pueden recubrirse mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas.

40 En otra modalidad, las composiciones antiinfecciosas de esta invención pueden ser composiciones nutricionales. Por ejemplo, una composición nutricional puede formularse como una solución de rehidratación o un mantenimiento o suplemento dietético para individuos de edad avanzada o individuos inmunocomprometidos. En dichas composiciones nutricionales también pueden incluirse macronutrientes tales como grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Las grasas comestibles incluyen, por ejemplo, aceite de coco, aceite de soja y monoglicéridos y diglicéridos. Los carbohidratos incluyen, por ejemplo, glucosa, lactosa comestible y almidón de maíz hidrolizado. Las proteínas incluyen, por ejemplo, proteína de soja, suero y leche desnatada. Las vitaminas y minerales (por ejemplo, calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo y vitaminas A, E, D, C y complejo B) también pueden incluirse en dichas composiciones nutricionales.

50 Las composiciones antiinfecciosas de esta invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, como una tableta, cápsula o sedimento que contiene una cantidad predeterminada de la primera o la segunda mezcla, o como un polvo o gránulos que contienen una concentración predeterminada de la primera mezcla o la segunda mezcla, o un gel, pasta, solución, suspensión, emulsión, jarabe, bolo, electuario o suspensión, en un líquido acuoso o no acuoso, que contiene una concentración predeterminada de la primera o la segunda mezcla. La composición administrada por vía oral puede incluir aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes aromatizantes y humectantes. Las composiciones administradas por vía oral, tales como tabletas, pueden recubrirse opcionalmente y pueden formularse de modo que proporcionen una liberación sostenida, retardada o controlada de la primera o la segunda mezcla que contienen.

60 Las composiciones antiinfecciosas de esta invención, ventajosamente una composición farmacéutica, también pueden administrarse mediante supositorio rectal, tubo de aerosol, tubo nasogástrico o infusión directa en el tracto GI o el estómago.

65 Las composiciones farmacéuticas antiinfecciosas de esta invención también pueden incluir agentes terapéuticos tales como agentes antivirales, antibióticos, probióticos, analgésicos y agentes anti-inflamatorios. La dosificación adecuada de estas composiciones para un paciente puede determinarse de manera convencional, en base a factores tales como el estado inmunológico, el peso corporal y la edad del paciente. En algunos casos, la dosificación estará en una concentración similar a la encontrada para 6'-SL, LNnT y/o LST c en la leche humana. La

cantidad requerida generalmente estaría en el rango de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 20 g por día, en ciertas modalidades de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 15 g por día, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 10 g por día, en ciertas modalidades de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10 g por día, en ciertas modalidades de aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g por día. Los regímenes de dosis apropiados pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

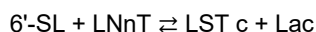
En otro aspecto, la invención proporciona unas composiciones para modular el microbioma de un ser humano, en particular un individuo no infantil, para aumentar la abundancia de *Bifidobacterium*, que comprende 6'-SL, LNnT y LST c, ventajosamente la primera o segunda mezcla de esta invención, más ventajosamente la primera mezcla, como se describió anteriormente.

"Ser humano no infantil", "individuo no infantil" o "no infantil" significa preferentemente un ser humano de 3 años de edad o mayor. Un ser humano no infantil puede ser un niño, un adolescente, un adulto o una persona mayor.

En esta especificación, a menos que se indique expresamente de cualquier otra manera, la palabra 'o' se usa en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumple una o ambas de las condiciones establecidas, en oposición al operador 'exclusivo o' que requiere que solo se cumpla una de las condiciones. La palabra 'que comprende' se usa en el sentido de 'incluir' en lugar de significar que consiste de'. Ningún reconocimiento de ningún documento publicado anteriormente en la presente descripción debe considerarse como una admisión o representación de que la enseñanza del mismo era de conocimiento general común en Australia o en cualquier otro lugar en la fecha de la presente.

Ejemplos

Ejemplo 1



Se probaron mutantes de la sialil transferasa de *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119 truncada por su péptido señal ($\Delta 2$ -15), las posiciones de la mutación son de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

Las pruebas se realizaron en tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH=6,0) a 30 °C en una escala de 100-200 μL mediante el uso de 50 mM de LNnT y 50 mM de 6'-SL con 1/10 volúmenes de extracto de enzima crudo. Se tomaron muestras (20 μL) en los puntos de tiempo que se indican a continuación. Las reacciones se detuvieron al añadir 20 μL de una mezcla de acetonitrilo-formato de amonio (10 mM, pH=4,0) 4:1. Posteriormente se añadieron 160 μL de agua destilada, las muestras se mezclaron de nuevo, se centrifugaron y analizaron con HPLC (inyección de 5 μL). Se usó una columna Kinetix 2,6 μ HILIC 100A (150x4,6 mm) a una temperatura del horno de columna de 40 °C con un caudal de 2,5 mL/min mediante el uso de 81 % de acetonitrilo y 19 % de tampón de formato de amonio (10 mM, pH=4,0) como fase móvil. Los sustratos y productos eluidos se detectaron a 200 nm.

Para todos los cálculos, las áreas de los picos de LNnT y los productos sialilados individuales (compuestos **A**, **B** y **C**, véase, esquema 1) se normalizaron de acuerdo con sus números respectivos de residuos de N-acetilo de la siguiente manera:

área del pico normalizada de LNnT = área del pico de LNnT

área del pico normalizada del compuesto **A** = $\frac{1}{2}$ área del pico del compuesto **A**

área del pico normalizada del compuesto **B** = $\frac{1}{2}$ área del pico del compuesto **B**

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

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

$$\text{Producto [mM]} = 50 \cdot \frac{\text{producto [área del piconormalizada]}}{\sum \text{productos [área del piconormalizada]} + \text{LNnT [área del pico normalizada]}}$$

La conversión total de LNnT a productos se calculó como:

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

La pureza del producto del compuesto **A** (LST c) se calculó como

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

mutante	conversión (%)	pureza (≥%)
A218Y-N222R-G349S	20	100
	34	100
	47	99
	54	97
A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K	16	100
	24	100
	47	99
	49	97
A218Y-N222R-G349S-S412P	20	100
	31	100
	48	99
	50	95

A partir de los datos, se podría estimar que el único producto formado en las síntesis enzimáticas anteriores es el compuesto **A** (LST c) cuando la conversión es ≤45 %. Por consiguiente, se podrían obtener las siguientes mezclas (la lactosa es equimolar a LST c):

conversión	6'-SL (% en moles)	LNnT (% en moles)	LST c (% en moles)
16 %	42 %	42 %	8 %
20 %	40 %	40 %	10 %
24 %	38 %	38 %	12 %
31 %	34,5 %	34,5 %	15,5 %
34 %	33 %	33 %	17 %
45 %	27,5 %	27,5 %	22,5 %

45 Ejemplo 2

Se recluta un total de 20 pacientes masculinos y femeninos para participar en el estudio. Después de una visita de selección y un período de preinclusión de 1-2 semanas, los pacientes se seleccionan y aleatorizan en dos grupos, cada uno de 10 pacientes. A un grupo se le administra el producto de tratamiento que contiene 5 gramos de una combinación de LNnT, 6'-SL y LST c, y a un grupo el producto placebo (2 gramos de glucosa) durante 8 semanas. El producto de tratamiento y el placebo están en forma de polvo en un recipiente de dosificación unitaria.

Los pacientes son elegibles para participar si tienen al menos 18 años de edad. Todos los pacientes reclutados pueden y están dispuestos a comprender y cumplir con los procedimientos del estudio. Los pacientes se excluyen si: han participado en un estudio clínico un mes antes de la visita de selección; tienen resultados anormales en las pruebas de detección que son clínicamente relevantes para la participación en el estudio; padecen una enfermedad grave tal como malignidad, diabetes, enfermedad coronaria grave, enfermedad renal, enfermedad neurológica o enfermedad psiquiátrica grave o cualquier condición que pueda confundir los resultados del estudio; han usado suplementos probióticos en dosis elevadas (se permite el yogur) durante los 3 meses anteriores al estudio; han consumido antibióticos 3 meses antes del estudio; han consumido regularmente cualquier medicamento que pudiera interferir con la evaluación de los síntomas 2 semanas antes del estudio; y embarazadas o lactantes.

En la visita de selección, se registra el historial médico y la medicación concomitante y se colecta una muestra de sangre para análisis de seguridad. Se distribuye un estuche de muestra fecal. Se indica a los pacientes que guarden sus muestras en el congelador hasta la próxima visita.

En la segunda visita, se verifican los criterios de elegibilidad y los sujetos elegibles se aleatorizan a los tres brazos del ensayo. Se colectan las muestras fecales y se distribuyen los equipos para nuevas muestras. Los pacientes se familiarizan con un sistema interactivo habilitado para internet que registra datos a diario y se les proporciona productos de tratamiento o de control. Se recuerda a los sujetos que no cambien su dieta habitual durante el estudio. Se colectan muestras de sangre para estudios de biomarcadores. Las muestras fecales se almacenan a -80 °C hasta su análisis. Las muestras fecales se someten a análisis de secuenciación de ARNr 16S.

El estudio tiene una duración de 8 semanas con los pacientes que consumen diariamente un producto placebo o de tratamiento. Se indica a los pacientes que consuman los productos por la mañana con el desayuno. El cumplimiento se supervisa a través del sistema interactivo habilitado para internet. Los pacientes también usan el sistema para registrar:

- información de escala de heces de Bristol (BSFS),
- información de síntomas tales como dolor abdominal, malestar abdominal, calambre abdominal, distensión abdominal y plenitud abdominal,
- información adicional sobre la escala de evaluación de síntomas gastrointestinales (GSRS).

Este cuestionario incluye 15 ítems que cubren cinco dimensiones (dolor abdominal, indigestión, reflujo, diarrea, constipación) y usa una escala Likert de siete grados.

Al final del estudio, cada paciente tiene una visita de salida con el equipo médico. Las muestras de heces y de sangre se colectan y analizan como antes.

El análisis fecal indica que los pacientes tratados tienen una mayor abundancia de *Bifidobacterium*.

Ejemplo 3

Diez ratas Sprague-Dawley de 5 días se alojan individualmente para evitar la contaminación entre ratas y se les proporciona alimento y agua irradiados. Las ratas se separan en 2 grupos de 5 ratas: un grupo de tratamiento y un grupo de control.

Se añade una mezcla de LNnT, 6'-SL y LST c al agua potable del grupo de tratamiento a una concentración total de 40 mg/mL. El agua del grupo de control no se altera (Día 0). Se administra agua fresca a diario y todas las ratas tienen libre acceso al agua potable. Las ratas se alimentan con pienso para roedores y se les da pienso fresco a diario.

Dos días después de la administración de la mezcla (Día 2), las ratas de ambos grupos se infectan mediante sonda oral con una cepa de *S. pneumoniae* encapsulada.

Después de 24 horas, las ratas se someten a lavado nasal mediante el uso de una solución salina. Se recupera la solución y se obtiene el número de bacterias viables al contar las colonias en placas de agar. Las ratas se controlan durante 1 semana y luego se sacrifican (Día 10). Se recolectan los pulmones. Los sedimentos de heces frescas se obtienen los días 0, 3 y 10. Las muestras se congelan inmediatamente y se almacenan a -80 °C. El ADN se extrae mediante el uso de un estuche de aislamiento de ADN PowerSoil de 96 pocillos (MO-BIO). Se mantiene vacío un mínimo de un pocillo de muestra por placa para que sirva como control negativo durante la PCR. La PCR se realiza con el cebador directo SD-Bact-0341-bS-17 y el cebador inverso SD-Bact-0785-aA-21 (Klindworth y otros Nucleic Acids Res. 41, e1 (2013)) con adaptadores Illumina adjuntos. Estos son cebadores bacterianos universales de ARNr 16S, que se dirigen a la región V3-V4. Se usa el siguiente programa de PCR: 98 °C durante 30 segundos, 25x (98 °C durante 10 s, 55 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s), 72 °C durante 5 min. La amplificación se verifica al correr los productos en un gel de agarosa al 1 %. Los códigos de barras se añaden en una PCR anidada mediante el uso del estuche Nextera Index V2 (Illumina) con el siguiente programa de PCR: 98 °C durante 30 segundos, 8x (98 °C durante 10 s, 55 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s), 72 °C durante 5 min. La unión de los cebadores se verifica al correr los productos en un gel de agarosa al 1 %.

Los productos de la PCR anidada se normalizan mediante el uso del estuche de placa de normalización SequalPrep y se agrupan. Las bibliotecas agrupadas se concentran por evaporación y la concentración de ADN de las bibliotecas agrupadas se midió en un fluorómetro Qubit mediante el uso del estuche del ensayo de alta sensibilidad Qubit (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se realiza en un secuenciador de escritorio MiSeq mediante el uso del estuche de reactivos MiSeq V3 (Illumina) para una secuenciación de pares finales de 2 x 300 pb. La versión de 64-bit de USEARCH (Edgar, 2013) se usa para el análisis bioinformático de los datos de la secuencia.

En las ratas tratadas con HMO (LNnT, 6'-SL y LST c), la colonización de los pulmones por *S. pneumoniae* se reduce en comparación con las ratas de control. De manera similar, la cantidad de *S. pneumoniae* viables recuperada en el lavado nasal de las ratas tratadas se reduce en comparación con las ratas de control.

ES 2 870 973 T3

Listado de secuencias

- <110> Glycom A/S
- 5 <120> Mezclas ternarias de 6'-SL, LNnT y LST c
- <130> DAS/P19660WO
- <150> EP15171177.7
- 10 <151> 2015-06-09
- <160> 3
- <170> BiSSAP 1.3.6
- 15 <210> 1
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-119
- 20 <400> 1

25	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
				20					25					30		
	Thr	Pro	Thr	Thr	Phe	Asp	Ser	Tyr	Ser	Trp	Ile	Gln	Thr	Cys	Gly	Thr
			35					40					45			
30	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
	65				70					75						80
	Asp	Val	Asp	Gly	Lys	Arg	Tyr	Val	Thr	Gln	Thr	Asn	Leu	Thr	Val	Val
35				85						90					95	
	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			
40	Glu	Arg	Phe	Ile	Ser	Trp	Gly	Arg	Ile	Gly	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	
	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Lys	Asn	Arg
45				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
			195					200					205			
50	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
	225			230						235					240	
	Leu	Val	Leu	Lys	Asp	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ile	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Ser
55				245						250					255	
	Gly	Ile	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Asn	Trp	His	Gln	Leu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Tyr
			260					265						270		
	Tyr	Phe	Leu	Arg	Lys	Asp	Tyr	Leu	Thr	Val	Glu	Pro	Gln	Leu	His	Asp
			275					280					285			

60

ES 2 870 973 T3

	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
	305					310					315					320
5	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	
	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Gln	Gln	Val	Asn	Val	Val	Asn	Asn	Ala	Ile
10			355					360					365			
	Asn	Glu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Arg	Glu	His	Asp	Leu	Phe	Phe
		370					375					380				
	Lys	Gly	His	Pro	Arg	Gly	Gly	Ile	Ile	Asn	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Ser
	385					390					395					400
15	Phe	Asn	Asn	Met	Ile	Asp	Ile	Pro	Ala	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Leu
				405						410					415	
	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
20			435					440					445			
	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															
30	<210>	2														
	<211>	483														
	<212>	PRT														
	<213>	Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-145														
35	<400>	2														
	Met	Cys	Asn	Asp	Asn	Gln	Asn	Thr	Val	Asp	Val	Val	Val	Ser	Thr	Val
	1				5					10					15	
40	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
45		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	
50	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			
	Glu	Arg	Phe	Ile	Ser	Trp	Gly	Arg	Ile	Arg	Leu	Thr	Glu	Asp	Asn	Ala
		130					135					140				
55	Glu	Lys	Leu	Asn	Ala	His	Ile	Tyr	Pro	Leu	Ala	Gly	Asn	Asn	Thr	Ser
	145					150					155					160

ES 2 870 973 T3

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
 5 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
 10 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
 Gly Ile Tyr Ser Ile Tyr Asn Trp His Gln Leu Tyr His Ser Ser Tyr
 260 265 270
 15 Tyr Phe Leu Arg Lys Asp Tyr Leu Thr Val Glu Thr Lys Leu His Asp
 275 280 285
 Leu Arg Glu Tyr Leu Gly Gly Ser Leu Lys Gln Met Ser Trp Asp Thr
 290 295 300
 20 Phe Ser Gln Leu Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Phe Leu Asn Ile Val
 305 310 315 320
 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
 25 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
 30 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
 Met Met Thr Gly Met Leu Pro Asp Thr Val Gly Gly Ile Ala Ser Ser
 420 425 430
 35 Leu Tyr Phe Ser Ile Pro Ala Glu Lys Val Ser Phe Ile Val Phe Thr
 435 440 445
 Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Asp Ala Leu Lys Ser Pro Leu
 450 455 460
 40 Val Gln Val Met Met Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
 465 470 475 480
 Phe Trp Cys

45 <210> 3
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> Photobacterium damsela JT0160

50 <400> 3

Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn
 1 5 10 15
 55 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

ES 2 870 973 T3

	Pro	Ile	Leu	Asn	Glu	Ser	Asp	Lys	Gln	Ala	Ile	Ser	Phe	Asp	Phe	Val
		50					55					60				
	Ala	Pro	Glu	Leu	Lys	Gln	Asp	Glu	Lys	Tyr	Cys	Phe	Thr	Phe	Lys	Gly
	65					70					75					80
5	Ile	Thr	Gly	Asp	His	Arg	Tyr	Ile	Thr	Asn	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Val
					85					90					95	
	Ala	Pro	Thr	Leu	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	His	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu
					100				105					110		
10	Gln	Gln	Leu	Ile	His	Ile	Ile	Gln	Ala	Lys	Asp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Asn
			115					120					125			
	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
15	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		
20	Pro	Pro	Ile	Ile	Gln	Pro	Leu	Tyr	Asn	Asn	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Ser
			195					200					205			
	His	Ile	Ser	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gly	Ser	Ser	Glu	Tyr	Val	Ser	Leu	Tyr
		210					215					220				
	Gln	Trp	Lys	Asp	Thr	Pro	Asn	Lys	Ile	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Glu	Val
	225					230					235					240
25	Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Tyr	Leu	Ala	Gly	Thr	Ser	Pro	Asp	Ala	Pro	Lys
				245						250					255	
	Gly	Met	Gly	Asn	Arg	Tyr	Asn	Trp	His	Lys	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asp	Tyr
				260					265					270		
30	Tyr	Phe	Leu	Arg	Glu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Val	Glu	Ala	Asn	Leu	His	Asp
			275						280				285			
	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Met	Pro	Trp	Asp	Glu
		290					295					300				
	Phe	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp	Ser	Gln	Gln	Thr	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Val
	305					310					315					320
35	Gly	Phe	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gln	Ser	Pro	Leu
					325					330					335	
	Pro	Asn	Phe	Ile	Phe	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Trp	Ala	Gly	Gly	Glu	Thr
				340					345					350		
40	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Gln	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Asn	Ala	Ile
			355						360				365			
	Asn	Glu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Lys	Asp	Tyr	Asp	Leu	Phe	Phe
		370					375					380				
	Lys	Gly	His	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Asn	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Ser
	385					390					395					400
45	Phe	Pro	Asp	Met	Ile	Asn	Ile	Pro	Ala	Lys	Ile	Ser	Phe	Glu	Val	Leu
				405						410					415	
	Met	Met	Thr	Asp	Met	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Ser	Ser
			420						425					430		
50	Leu	Tyr	Phe	Thr	Ile	Pro	Ala	Asp	Lys	Val	Asn	Phe	Ile	Val	Phe	Thr
			435					440					445			
	Ser	Ser	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	Pro	Leu
		450					455					460				
	Val	Gln	Val	Met	Leu	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Glu	Lys	Asp	Val	Leu
	465					470					475					480
55	Phe	Trp	Ala	Asp	His	Lys	Val	Asn	Ser	Met	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Glu
					485					490					495	
	Ala	Cys	Thr	Arg	Ile	Ile	Ala	Lys	Arg	Gln	Pro	Thr	Ala	Ser	Asp	Leu

ES 2 870 973 T3

				500					505					510			
	Arg	Leu	Val	Ile	Ala	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ile	
			515					520					525				
5	Gly	Asp	Val	Ala	Glu	Ser	Ile	Ala	Lys	Val	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Ser	
		530					535					540					
	Asn	Lys	Gln	Tyr	Asn	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Gln	His	
	545				550						555					560	
	Thr	Val	Arg	Met	Leu	His	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Phe	Ala	Arg	Met	Asp	
				565						570					575		
10	Val	Lys	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Tyr	Gln	Glu	Asp	Asp	Arg	Ile	Asp	Gln	
				580					585						590		
	Glu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Val	Arg	Gln	Leu	Met	Ala	His	Met	Met	Glu	Asp	
			595					600					605				
	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	Asn	Val	Met	Lys	Val	Met	Trp	Ala	Ala	Arg	Ser	
15		610				615						620					
	Ile	Glu	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Ile	Cys	Glu	Tyr	Ile	Ile	
	625					630					635					640	
	Tyr	Phe	Val	Lys	Gly	Lys	Asp	Val	Arg	His	Thr	Lys	Pro	Asp	Asp	Phe	
				645						650					655		
20	Gly	Thr	Met	Leu	Asp												
				660													

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de oligosacáridos de la leche humana (HMO) que consiste esencialmente de 6'-O-sialilactosa (6'-SL), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y sialilacto-N-tetraosa c (LST c).
2. La mezcla de la reivindicación 1 en la que la relación molar de LST c con respecto a (6'-SL + LNnT) es al menos 1:18, preferentemente al menos 1:8, con mayor preferencia al menos 1:5, incluso con mayor preferencia al menos 1:3.
3. La mezcla de la reivindicación 1 o 2 en la que la relación molar de 6'-SL con respecto a LNnT es 0,18-5,5, preferentemente 0,3-3, con mayor preferencia aproximadamente 1.
4. Una mezcla de HMO que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT, LST c y lactosa, preferentemente en la que:
 - la relación molar de (6'-SL + LNnT) con respecto a LST c es 2-18, y
 - la relación molar de lactosa con respecto a LST c es aproximadamente 1.
5. La mezcla de la reivindicación 4, en donde una de las relaciones molares 6'-SL a LST c y LNnT a LST c no es mayor de 4.
6. La mezcla de las reivindicaciones 4 a 5, en la que la relación molar de 6'-SL a LNnT es 0,18-5,5.
7. Un proceso para obtener la mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende las etapas de hacer reaccionar 6'-SL y LNnT en presencia de una α 2,6-transsialidasa para producir un medio de reacción, y luego eliminar la lactosa y la α 2,6-transsialidasa del medio de reacción.
8. Un proceso para obtener la mezcla de la reivindicación 4 a 6, que comprende las etapas de hacer reaccionar 6'-SL y LNnT en presencia de una α 2,6-transsialidasa para producir un medio de reacción, y luego eliminar la α 2,6-transsialidasa del medio de reacción.
9. Un proceso de la reivindicación 8, que comprende la etapa de hacer reaccionar 6'-SL y LNnT en una relación molar de 1:3 a 3:1, preferentemente 1:2 a 2:1, con mayor preferencia 1:1, en presencia de una α 2,6-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 20 %, hasta aproximadamente 55 %, preferentemente al menos 30 %, con mayor preferencia al menos 40 %, para la reacción de 6'-SL y LNnT.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la etapa de hacer reaccionar 6'-SL y LNnT en una relación molar de 1:1, en presencia de una α 2,6-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 20 %, hasta aproximadamente 45 %, preferentemente al menos 30 %, con mayor preferencia al menos 40 %, para la reacción de 6'-SL y LNnT.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la etapa de hacer reaccionar 6'-SL y LNnT en una relación molar de 1:1, en presencia de una α 2,6-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de 30-45 %, para la reacción de 6'-SL y LNnT.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde la α 2,6-transsialidasa tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1, y que comprende al menos una de:
 - en la posición 156, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln o Trp, preferentemente Ser, Cys o Tyr; y/o
 - en la posición 161, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp o Gly, preferentemente Phe o Gly; y/o
 - en la posición 180, un aminoácido seleccionado de Asp, Asn, Gln, preferentemente Asp; y/o
 - en la posición 186, un aminoácido seleccionado de Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys o Thr, preferentemente 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, preferentemente 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, preferentemente Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 235, un aminoácido seleccionado de Arg, His, Ser, Cys, Ala, Val, Ile o Leu, preferentemente Arg, His, Cys o Val; y/o
 - en la posición 242, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferentemente His; y/o
 - en la posición 261, un aminoácido seleccionado de His, Lys, Asp, Glu, Ala, Val, Leu o Phe, preferentemente Asp, Phe, His o Val; y/o
 - en la posición 315, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferentemente Cys; y/o
 - en la posición 342, un aminoácido seleccionado de Ser o Cys, preferentemente Cys; y/o

- en la posición 349, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr o Cys, preferentemente Ser o Cys; y/o
 - en la posición 350, un aminoácido seleccionado de Ser, Thr, Cys, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
 - en la posición 356, un aminoácido seleccionado de Ala, Val, Ile, Leu, Phe o Trp, preferentemente Val o Phe; y/o
 - en la posición 438, un aminoácido seleccionado de Arg, His o Lys, preferentemente His, en donde dichas posiciones se definen por alineamientos de dicha secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 1 mediante el uso de un algoritmo de comparación.
- 5
- 10 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica con 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 mutada en las siguientes posiciones de aminoácidos:
- en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Cys o Tyr; y/o
 - en la posición 161, Gln está sustituida por Phe o Gly; y/o
 - en la posición 180, Glu está sustituido por Asp; y/o
 - en la posición 186, Ala está sustituida por Tyr, Cys o Leu; y/o
 - en la posición 218, Ala está sustituida por Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - en la posición 222, Asn está sustituida por Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 235, Lys está sustituida por Arg, His, Cys o Val; y/o
 - en la posición 242, Val está sustituida por His; y/o
 - en la posición 261, Arg está sustituida por Asp, Phe, His o Val; y/o
 - en la posición 315, Leu está sustituida por Cys; y/o
 - en la posición 342, Thr está sustituida por Cys; y/o
 - en la posición 349, Gly está sustituida por Ser o Cys; y/o
 - en la posición 350, Gly está sustituida por Ser, Tyr, Phe o Cys; y/o
 - en la posición 356, Tyr está sustituida por Val o Phe; y/o
 - en la posición 438, Pro es sustituida por His.
- 15
- 20
- 25
- 30 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la α 2,6-transsialidasa tiene una mutación al menos en dos posiciones de aminoácidos de 156, 218, 222 y 349, particularmente al menos en tres posiciones de aminoácidos de 156, 218, 222 y 349, más particularmente:
- en la posición 156, Gly está sustituida por Ser, Cys o Tyr; y/o
 - en la posición 218, Ala está sustituida por Ile, Val, Phe o Tyr; y/o
 - en la posición 222, Asn está sustituida por Cys, Asp, Arg o Phe; y/o
 - en la posición 349, Gly está sustituida por Ser o Cys.
- 35
- 40 15. Una composición antiinfecciosa para usar en el tratamiento de infecciones bacterianas, o una composición para usar en la modulación del microbioma de un ser humano para aumentar la abundancia de *Bifidobacterium*, que comprende 6'-SL, LNnT y LST c, preferentemente que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT y LST c o que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT, LST c y lactosa, con mayor preferencia que consiste esencialmente de 6'-SL, LNnT y LST c.

ES 2 870 973 T3

SEQ ID NO. 1	MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPILKDDEKYSLS	60
SEQ ID NO. 2	MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPILKDDEKYSLS	60
SEQ ID NO. 3	MCNSDNTSLKETVSSNSADVVETETYQLTPIADAPSSFLSHSWEQTCGTPILNESDKQAIS	60
SEQ ID NO. 1	FDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTLEVYVDHASLPSLQQLMKIIQ	120
SEQ ID NO. 2	FDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPTLEVYVDHASLPSLQQLMKIIQ	120
SEQ ID NO. 3	FDFVAPELKQDEKYCFTEFKGITGDHRYITNTTLTVVAPTLEVYIDHASLPSLQQLIHIQ	120
SEQ ID NO. 1	QKNEYSQNERFISWGRIGLTEDNAEKLNAHIYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLE	180
SEQ ID NO. 2	QKNEYSQNERFISWGRIRLTEDNAEKLNAHIYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLE	180
SEQ ID NO. 3	AKDEYPSNQRFVSWKRVTVADANANKLNIHTYPLKGNNTSPEMVAIDEYAQSKNRLNIE	180
SEQ ID NO. 1	LNTNTAHSFPNLAPILRRISSKSNILISNINLYDDGSAEYVNLNWKDTEKSVKLSDSF	240
SEQ ID NO. 2	LNTNTGHSFRNIAPILRATSSKSNILISNINLYDDGSAEYVSLNWKDTEKSVKLSDSF	240
SEQ ID NO. 3	FYTNTAHVFNNLPPIIQPLYNNEKVKISHISLYDDGSSEYVSLYQWKDTPNKIETLEGEV	240
SEQ ID NO. 1	LVLKDYFNGISSEKPSGIYGRYNWHQLYNTSYYFLRKDYLTVEPQLHDLREYLGGSLKQM	300
SEQ ID NO. 2	LVLKDYLNGISSEKPNGIYSIYNWHQLYHSSYYFLRKDYLTVEPKLHDLREYLGGSLKQM	300
SEQ ID NO. 3	SLLANYLAGTSPDAPKGMGNRYNWHKLYDTPDYFLREDYLDVEANLHDLRDYLGSSAKQM	300
SEQ ID NO. 1	SWDGFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 2	SWDTFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 3	PWDEFKLSDSQQTFLFLDIVGFDKEQLQQQYSQSPLPNFITGTTWAGGETKEYYAQQQ	360
SEQ ID NO. 1	VNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPGGIINDIILGSFNNMIDIIPAKVSFEVLMMTG	420
SEQ ID NO. 2	VNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPGGIINDIILGSFNNMIDIIPAKVSFEVLMMTG	420
SEQ ID NO. 3	VNVINNAINETSPYYLGKDYDLFFKGHPAGGVINDIILGSFPDMINIPAKISFEVLMMTD	420
SEQ ID NO. 1	MLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMMTLGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 2	MLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMMTLGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 3	MLPDTVAGIASSLYFTIPADKVNFI VFTSSDTITDREELKSP LVQVMLTLGIVKEKDVL	480
SEQ ID NO. 1	FWSDLPDCSSGVCIAQY-----	497
SEQ ID NO. 2	FWC-----	483
SEQ ID NO. 3	FWADHKVNSMEVAIDEACTRI LAKRQPTASDLRLVIAI IKTI TDLERIGDVAESIAKVAL	540
SEQ ID NO. 1	-----	497
SEQ ID NO. 2	-----	483
SEQ ID NO. 3	ESFSNKQYNLLVLSLES LGQHTVPRMLHEVLDAFARM DVKAAIEVYQEDDRI DQEYESIVRQ	600
SEQ ID NO. 1	-----	497
SEQ ID NO. 2	-----	483
SEQ ID NO. 3	LMAHMMEDPSSIPNVMKVMWAARSIERVGDRCQNICEYIIYFVKGKDV RHTKPDDEFGTML	660
SEQ ID NO. 1	- 497	
SEQ ID NO. 2	- 483	
SEQ ID NO. 3	D 661	

Figura 1

ES 2 870 973 T3

SEQ ID NO. 1	1 MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPI 	50
SEQ ID NO. 2	1 MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPI	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 SKSNILISNINLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSVKLSDSFVLVKDYFNIGI :	250
SEQ ID NO. 2	201 SKNNILISNINLYDDGSAEYVSLNWKDTDNKSQKLSDSFVLVKDYLNIGI	250
SEQ ID NO. 1	251 SSEKPSGIYGRYNWHQLYNTSYYFLRKDYLTVEPQLHDLREYLGGS LKQM : . :	300
SEQ ID NO. 2	251 SSEKPNGIYSIYNWHQLYHSYYFLRKDYLTVETKLHDLREYLGGS LKQM	300
SEQ ID NO. 1	301 SWDGFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQOEYQQSELPNFVFTGTTTWAGG .	350
SEQ ID NO. 2	301 SWDTFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQOEYQQSELPNFVFTGTTTWAGG	350
SEQ ID NO. 1	351 ETKEYYAQQQVNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPGGIINDIILGS 	400
SEQ ID NO. 2	351 ETKEYYAQQQVNVVNNAINETSPYYLGREHDLFFKGHPGGIINDIILGS	400
SEQ ID NO. 1	401 FNNMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSS 	450
SEQ ID NO. 2	401 FNNMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGGIASSLYFSIPA EKVSFIVFTSS	450
SEQ ID NO. 1	451 DTITDREDALKSPLVQVMFTLGI VKEKDVLFWSDLPDCSSGVCIAQY 	497
SEQ ID NO. 2	451 DTITDREDALKSPLVQVMFTLGI VKEKDVLFWC-----	483

Figura 2.

ES 2 870 973 T3

SEQ ID NO. 1	1 MCNDNQNTVDVVVSTVNDNVIENNTYQVKPIDTPTTFDSYSWIQTCGTPI . : . : . : . : : . : . : : . : . : : . :	50
SEQ ID NO. 3	1 MCNSDNTSLKETVSSNSADVVETETYQLTPIDAPSSFLSHSWEQTCGTPI	50
SEQ ID NO. 1	51 LKDEKYSLSFDFVAPELDQDEKFCFEFTGDVDGKRYVTQTNLTVVAPT . : . : . : : . : : . :	100
SEQ ID NO. 3	51 LNESDKQAI SDFVAPELKQDEKYCFTFKGITGDHRYITNTTLTVVAPT	100
SEQ ID NO. 1	101 EVYVDHASLPSLQQLMKIIQKNEYSQNERFISWGRIGLTEDNAEKLNAH : : . . : . . : : . :	150
SEQ ID NO. 3	101 EVYIDHASLPSLQQLIHI IQAKDEYPSNQRFVSWKRVTVADNANKLNH	150
SEQ ID NO. 1	151 IYPLAGNNTSQELVDAVIDYADSKNRLNLELNTNTAHSFPNLAPILRIIS . . . : . : . : . : :	200
SEQ ID NO. 3	151 TYPLKGNNTSPEMVAAIDEYAQSKNRLNIEFYTNTAHVFNLLPPIIQPLY	200
SEQ ID NO. 1	201 SKSNILISNINLYDDGSAEYVNLYNWKDTEKSVKLSDSFVLVKDYFNIGI : : : : : : . . : : : . . .	250
SEQ ID NO. 3	201 NNEKVKISHISLYDDGSSEYVSLYQWKDTPNKIETLEGEVSLANLNYLAGT	250
SEQ ID NO. 1	251 SSEKPSGIYGRYNWHQLYNTSYFRLKDYLTVEPQLHDLREYLGGSLKQM . : . . : . . : : . : . . : .	300
SEQ ID NO. 3	251 SPDAPKGMGNRYNWHKLYDTDYFRLREYLDVEANLHDLRDLGSSAKQM	300
SEQ ID NO. 1	301 SWDGFSQLSKGDKELFLNIVGFDQEKLQQEYQQSELPNFVFTGTTWAGG . . : : : : : : : . . :	350
SEQ ID NO. 3	301 PWDEFKLSDSQQTLFLFDIVGFDKEQLQQQYSQSPLPNFI FTGTTWAGG	350
SEQ ID NO. 1	351 ETKEYYAQQQVNVNAINETSPYYLGREHDLFFKGGHPGGIINDIILGS : : : . :	400
SEQ ID NO. 3	351 ETKEYYAQQQVNVNAINETSPYYLGDYDLFFKGGHPAGGVINDIILGS	400
SEQ ID NO. 1	401 FNNMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGGIASSLYFSIPAERKVSFIVFTSS . : : : . . : : :	450
SEQ ID NO. 3	401 FPDMINIPAKISFEVLMMTDMLPDTVAGIASSLYFTIPADKVNFI VFTSS	450
SEQ ID NO. 1	451 DTITDREDALKSPLVQVMMTLGIVKEKDVLFWSDLPDCSSGVCIAQY---- : : : : . .	497
SEQ ID NO. 3	451 DTITDREEALKSPLVQVMLTLGIVKEKDVLFWADHKVNSMEVAIDEACTR	500
SEQ ID NO. 1	498 -----	497
SEQ ID NO. 3	501 IIAKRQPTASDLRLVIAIKTITDLERIGDVAESI AKVALESFSNKQYNL	550
SEQ ID NO. 1	498 -----	497
SEQ ID NO. 3	551 LVSLES LGQHTVRMLHEVLDAFARMDVKA AIEVYQEDDRIDQEYESIVRQ	600
SEQ ID NO. 1	498 -----	497
SEQ ID NO. 3	601 LMAHMEDPSSIPNVMKVMWAARSIERVGDRCQNIC EYIIYFVKGDVVRH	650
SEQ ID NO. 1	498 -----	497
SEQ ID NO. 3	651 TKPDDFGTMLD	661

Figura 3.