

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 871**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**C12P 19/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2018 PCT/JP2018/033897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2019 WO19050051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2018 E 18783145 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3679147**

54 Título: **Mutante de enzima de 2-O-sulfatación y mutante de enzima de 3-O-sulfatación y método para utilizar los mismos**

30 Prioridad:

**05.09.2017 JP 2017170637**

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

**19.12.2024**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)  
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku  
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**TSUJI, CHIHIRO;  
SHIMIZU, TOMOKO;  
TAGAMI, UNO;  
MIHARA, YASUHIRO;  
SUGIKI, MASAYUKI;  
NAKANO, SHOGO;  
MOTOYAMA, TOMOHARU y  
ITO, SOHEI**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 992 871 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

Mutante de enzima de 2-O-sulfatación y mutante de enzima de 3-O-sulfatación y método para utilizar los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un mutante de la enzima de 2-O-sulfatación y a un método para utilizar el mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

10 La heparina es una clase de sulfatos de heparán y es un compuesto que presenta actividad anticoagulante. La heparina derivada de animales implica un problema en cuanto al control de calidad, y se ha investigado el desarrollo de fabricación de heparina no derivada de animales de calidad controlada. Como método de producción de heparina no derivada de animales, existe, por ejemplo, un método de producción de heparina sometiendo  
15 heparosano producido utilizando un microorganismo a una reacción, tal como sulfatación e isomerización, etc. (ver los documentos de patente 1 y 2, y los documentos no de patente 1 a 3).

20 El heparosano es conocido como materia prima preferida para fabricar heparina. El heparosano es un polisacárido constituido por una unidad de repetición de disacárido compuesta por un residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico (GlcA) y un residuo de N-acetil- $\alpha$ -D-glucosamina (GlcNAc) [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ ].

25 Como método de producción de heparina a partir de heparosano, se conoce un método que requiere una serie de reacciones mutuamente intercambiables que comprenden (1) N-desacetilación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (2) despolimerización, (3) N-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (4) C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico (concretamente, isomerización de un residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico en un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico ácido), (5) 2-O-sulfatación de un residuo de ácido hexurónico (preferentemente un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico), (6) 6-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina y (7) 3-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina (ver los documentos de patente 1 y 3 a 5).

30 Entre estas reacciones, con respecto a una enzima (2-OST) que cataliza la reacción de 2-O-sulfatación, se notifican unos cuantos hallazgos. Por ejemplo, en el análisis que utiliza 2-OST derivada de pollo, se notifica que el trímero está en una forma activa; que el polímero (distinto de trímero) agregado en la enzima purificada existe; y que la mutación de valina en la posición 332 reduce la razón de trímeros (tasa de activador) (documento no de patente 4). Pero, con respecto a 2-OST, no se notifica ni una mejora de la razón de trímeros ni un mutante cuya actividad se haya mejorado de ese modo.  
35

40 Además, con respecto a una enzima (3-OST) que cataliza la reacción de 3-O-sulfatación, asimismo se notifican unos cuantos hallazgos. Por ejemplo, con respecto a 3-OST-1 como isoforma de 3-OST derivada de ratón, se notifica una estructura cristalina (documento no de patente 5), mutante E90Q y mutante R276A (documento no de patente 6), y diversos mutantes, tales como mutante E76A, mutante E76Q, mutante K123A, mutante Q163A, mutante H271, etc. (documento no de patente 7). Sin embargo, con respecto a 3-OST, no se notifican sustancialmente mutantes que presenten actividades mejoradas. Por ejemplo, en el documento no de patente 7, únicamente se describe que únicamente el mutante H271A presenta una actividad específica ligeramente alta con un 109 % en comparación con enzimas de tipo natural.  
45

50 SUZANNE C. EDAVETTAL *ET AL*: "Crystal Structure and Mutational Analysis of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferase Isoform 1", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, nº 24, 11 de junio de 2004, páginas 25789-25797, da a conocer un mutante W96F de 3-OST-1 de ratón, que presenta aproximadamente 70 % de la actividad del tipo natural.

50 **Referencias de la técnica anterior****Documentos de patente**

55 Documento de patente 1: patente US nº 8.227.449

Documento de patente 2: publicación de solicitud de patente US nº 2012/0322114

Documento de patente 3: WO 2017/115674

60 Documento de patente 4: WO 2017/115675

Documento de patente 5: publicación de solicitud de patente US nº 2012/0322114

**Documentos no de patente**

Documento no de patente 1: Lindahl U, *et al.*, (2005) *J Med Chem*, 48(2): 349-352

5 Documento no de patente 2: Zhang Z., *et al.*, (2008) *Journal of the American Chemical Society*, 130(39): 12998-13007

Documento no de patente 3: Chen J, *et al.*, (2005) *J Biol Chem.*, 280(52): 42817-25

10 Documento no de patente 4: Betea HN, *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(48): 18724-9

Documento no de patente 5: Moon, *et al.*, (2012) *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(14): 5265-70

15 Documento no de patente 6: Munoz, *et al.*, (2006) *Biochemistry*, 45: 5122-28

Documento no de patente 7: Edavettal, *et al.*, (2004) *J BIOL CHEM.*, 279(24): 25789-97

**Divulgación de la invención**

20 **Problema que va a solucionarse mediante la invención**

Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un mutante de 2-OST que presente una alta actividad, y un método de 2-O-sulfatación utilizando el mutante de 2-OST.

25 Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción de un heparán sulfato tal como heparina utilizando el método de sulfatación descrito anteriormente.

**Medios para solucionar el problema**

30 Como resultado de investigaciones extensas e intensivas, los presentes inventores han encontrado que un mutante de 2-OST que presenta una sustitución de un residuo de leucina en la posición 321 con un residuo de aminoácido básico presenta una alta actividad debido a una mejora de la razón de trómeros. En consecuencia, los presentes inventores han proporcionado con éxito un método eficaz de 2-O-sulfatación y un método de producción de un heparán sulfato utilizando tal método de sulfatación, conduciendo de ese modo al logro de la presente invención.

35 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Efecto de la invención**

40 En vista del hecho de que el mutante de la enzima de 2-O-sulfatación de la presente invención presenta una alta actividad, puede adoptarse adecuadamente para procesos que producen sustancias objetivo.

Según el método de la presente invención que utiliza el mutante de la presente invención, las sustancias objetivo pueden producirse eficazmente.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una vista que representa un ejemplo preferido de un método de producción de heparina a partir de heparosano (por ejemplo, documentos WO/2017/115674A, WO/2017/115675A). El heparosano es un polisacárido constituido por una unidad de repetición de disacárido que consiste en un residuo de ácido D-glucurónico (GlcA) y un residuo de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) [ $\rightarrow$ 4]- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ ]. (1) La N-desacetilación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es una reacción de someter el grupo N-acetilo del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano a N-desacetilación (por ejemplo, N-desacetilación parcial) para producir un grupo amino. (2) La despolimerización es una reacción de descomposición de heparosano para producir heparosano que presenta un peso molecular inferior. (3) La N-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es una reacción de sulfatación del grupo amino del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano. (4) La C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico es una reacción de isomerización de un residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico en el heparosano en un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico (IdoA) como un epímero. (5) La 2-O-sulfatación del residuo de ácido hexurónico es una reacción de sulfatación del grupo hidroxilo en la posición 2 del residuo de ácido hexurónico (preferentemente, un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico) en el heparosano. (6) La 6-O-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es una reacción de sulfatación del grupo hidroxilo en la 6-posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano. (7) La 3-O-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es una reacción de sulfatación del grupo hidroxilo en la 3-posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano.

**Forma de realización para poner en práctica la invención****1. Mutante**5 (1-1) Mutante de la enzima de 2-O-sulfatación:

La presente invención proporciona un mutante de la enzima de 2-O-sulfatación, que presenta una sustitución de un residuo de leucina en la posición 321 con un residuo de aminoácido básico en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los siguientes (a) a (f):

10

(a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2;

15

(b) una secuencia de aminoácidos que comprende una o varias sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o

20

(c) una secuencia de aminoácidos que presenta un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o

25

(d) la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2;

30

(e) una secuencia de aminoácidos que comprende una o varias sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o

35

(f) una secuencia de aminoácidos que presenta un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; y

que presenta una actividad de transferencia de 2-O-sulfato.

Se especifican (a) a (c) por SEC ID nº: 2 correspondiente a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino. Se especifican (d) a (f) por los sitios catalíticos de la 2-OST derivada de hámster chino (Asp69-Asn356 en SEC ID nº: 2).

40

Un residuo de aminoácido básico con el que se sustituye el residuo de leucina 321 es un residuo de arginina, un residuo de lisina o un residuo de histidina. Se prefiere un residuo de arginina o un residuo de lisina. Se prefiere más un residuo de arginina.

45

Los (b), (c), (e) y (f) pueden presentar además una mutación deseada en un sitio predeterminado. Por ejemplo, se notifica que, con respecto a 2-OST, cuando el residuo de tirosina 94 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 se sustituye con un residuo de alanina, un residuo de isoleucina, un residuo de glicina, un residuo de fenilalanina o un residuo de ácido glutámico, el grupo hidroxilo en la posición 2 del residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico (residuo de ácido hexurónico) puede sulfatarse más preferentemente (un cambio de especificidad de sustrato, concretamente) que el residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico (residuo de ácido hexurónico) (Li K., *et al.*, (2010) *J Biol Chem*, 285(15): 11106-11113). La sustitución del residuo de leucina 321 en el residuo de aminoácido básico es una que mejora la actividad debido a una mejora de la razón de trómeros y es una mutación que no afecta a la especificidad de sustrato. En consecuencia, asimismo se prefiere que el mutante de la enzima de 2-O-sulfatación de la presente invención presente adicionalmente tal mutación además de la sustitución del residuo de leucina 321 en el residuo de aminoácido básico.

50

El término "actividad de transferencia de 2-O-sulfato" se refiere a una actividad de transferencia de un grupo sulfato desde un donador de grupo sulfato (por ejemplo, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS)) hacia un grupo hidroxilo en la posición 2 del residuo de ácido hexurónico, produciendo de ese modo una estructura de "grupo -O-sulfato" en la posición 2 del residuo de ácido hexurónico. Los ejemplos del residuo de ácido hexurónico incluyen un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico y un residuo de ácido  $\beta$ -D-idurónico. Se prefiere un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico.

55

60

La evaluación de la actividad de transferencia de 2-O-sulfato puede realizarse adecuadamente. Por ejemplo, tal como se describe en la sección de ejemplos, la evaluación de la actividad de transferencia de 2-O-sulfato puede realizarse midiendo la actividad de transferencia de 2-O-sulfato y posteriormente determinando una tasa de 2-O-sulfatación a través del análisis de la composición de disacáridos. Más específicamente, la medición de la actividad de transferencia de 2-O-sulfato puede realizarse añadiendo un 1.9 % de un líquido que contiene mutante a un líquido de reacción (2 mg/ml de un compuesto de heparosano (sustrato), 0.6 mM de PAPS (donador de grupo sulfato) y 50 mM de MES (pH: 7.0)), realizando una reacción a 37 °C durante 30 minutos, mezclando con dos veces la cantidad de disolución acuosa de ácido cítrico 2.0 M y luego tratando térmicamente la mezcla a 95 °C durante 15 minutos, deteniendo de ese modo la reacción. Como líquido que contiene mutante, por ejemplo, puede

65

utilizarse un líquido de enzima purificada o un extracto libre de células. Como compuesto de heparosano (sustrato), pueden utilizarse los descritos a continuación. Se prefiere heparosano N-sulfatado, heparosano epimerizado o heparosano N-sulfatado y epimerizado. Tal heparosano puede despolimerizarse. El compuesto de heparosano (sustrato) puede ser asimismo heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado.

5

(1-2) Mutante de la enzima de 3-O-sulfatación (que no pertenece al alcance de la presente invención):

Una enzima de 3-O-sulfatación, en la que en una secuencia de aminoácidos cualquiera de (a') a (f'),

10

(i) un residuo de metionina en la posición 77 se sustituye con un residuo de lisina;

(ii) un residuo de triptófano en la posición 96 se sustituye con un residuo de fenilalanina;

15

(iii) un residuo de prolina en la posición 125 se sustituye con un residuo de alanina;

(iv) un residuo de valina en la posición 164 se sustituye con un residuo de isoleucina;

(v) un residuo de asparagina en la posición 167 se sustituye con un residuo de histidina;

20

(vi) un residuo de lisina en la posición 171 se sustituye con un residuo de glutamina; o

(vii) un residuo de tirosina en la posición 259 se sustituye con un residuo de fenilalanina; y

en la que el mutante de la enzima de 3-O-sulfatación presenta una actividad de transferencia de 3-O-sulfato:

25

(a') la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8;

(b') una secuencia de aminoácidos que comprende una o varias sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8; o

30

(c') una secuencia de aminoácidos que presenta un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8; o

35

(d') la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 48 a 311 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8;

40

(e') una secuencia de aminoácidos que comprende una o varias sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 48 a 311 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8; o

45

(f') una secuencia de aminoácidos que presenta un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 48 a 311 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8.

(a') a (c') se especifican por SEC ID nº: 8 correspondiente a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de una isoforma de 3-OST derivada de ratón (3-OST-1). (d') a (f) se especifican por los sitios catalíticos de 3-OST-1 derivada de ratón (Gly48-His311 en SEC ID nº: 8).

50

El término "actividad de transferencia de 3-O-sulfato" se refiere a una actividad de transferencia de un grupo sulfato desde un donador de grupo sulfato (por ejemplo, PAPS) hacia un grupo hidroxilo en la 3-posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, produciendo de ese modo una estructura de "grupo -O-sulfato" en la 3-posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina.

55

La evaluación de la actividad de transferencia de 3-O-sulfato puede realizarse adecuadamente. Por ejemplo, tal como se describe en la sección de ejemplos, la evaluación de la actividad de transferencia de 3-O-sulfato puede realizarse midiendo la actividad de transferencia de 3-O-sulfato y posteriormente determinando una tasa de 3-O-sulfatación a través del análisis de la composición de disacáridos. Más específicamente, la medición de la actividad de transferencia de 3-O-sulfato puede realizarse añadiendo 20  $\mu$ l de un líquido que contiene mutante a 80  $\mu$ l de un líquido mixto (mantenido caliente a 37 °C en un baño de agua de antemano) de 1 g/l de un compuesto de heparosano (sustrato), 1.25 mM de PAPS (donador de grupo sulfato) y 50 mM de HEPES (pH: 7.5) para iniciar una reacción enzimática a 37 °C y, después de que transcurra una hora, calentando la mezcla de reacción a 100 °C durante 3 minutos, inactivando de ese modo la enzima. Como líquido que contiene mutante, por ejemplo, puede utilizarse un líquido de enzima purificada o un extracto libre de células. Como compuesto de heparosano (sustrato), pueden utilizarse los descritos a continuación. Se prefiere heparosano N-sulfatado, heparosano 6-O-sulfatado o heparosano N-sulfatado y 6-O-sulfatado. Tal heparosano puede despolimerizarse. El compuesto de heparosano

65

(sustrato) puede ser asimismo heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado.

(1-3) Explicación de generación respecto al mutante:

5 En la secuencia de aminoácidos de (b), (e), (b') o (e'), uno o varios residuos de aminoácido pueden modificarse mediante 1,2, 3 o 4 mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en delección, sustitución, inserción y adición del residuo de aminoácido. La mutación del residuo de aminoácido puede introducirse en una región en la secuencia de aminoácidos o puede introducirse en varias regiones diferentes. El término "una o varias" se refiere al número de regiones en las que la actividad proteínica no resulta alterada en gran medida. El número al que se hace referencia mediante el término "una o varias" es, por ejemplo, de 1 a 100, preferentemente de 1 a 80, más preferentemente de 1 a 50, todavía más preferentemente de 1 a 40 y de manera especialmente preferida de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10 o de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5). Respecto a la secuencia de aminoácidos de (b), el término "una o varias" es de 1 a 30. Respecto a la secuencia de aminoácidos de (e), el término "una o varias" es de 1 a 20.

15 El porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos de (c), (f), (c') o (f') es de 90 % o más. Preferentemente, la identidad puede ser de 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, o 99 % o más. El cálculo de un porcentaje de identidad de un polipéptido (proteína) puede llevarse a cabo mediante el algoritmo blastp. Más específicamente, el cálculo de un porcentaje de identidad de un polipéptido puede llevarse a cabo mediante el algoritmo blastp en la configuración por defecto de parámetros de puntuación (matriz: BLOSUM62; costes de hueco: existencia=11 extensión=1; ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional) que proporciona el National Center for Biotechnology Information (NCBI). El cálculo de un porcentaje de identidad de un polinucleótido (gen) puede llevarse a cabo mediante el algoritmo blastn. Más específicamente, el cálculo de un porcentaje de identidad de un polinucleótido puede llevarse a cabo mediante el algoritmo blastn en la configuración por defecto de parámetros de puntuación (puntuaciones de apareamiento/apareamiento erróneo=1, -2; costes de hueco=lineal) que proporciona el NCBI.

20 El mutante correspondiente a (b), (c), (e), (f), (b'), (c'), (e') o (f') presenta una característica tal que es excelente en la producción de una sustancia objetivo. Por ejemplo, en el caso de medir la actividad en una condición de medición especificada, se prefiere que los mutantes correspondientes a (b) y (c) presenten una actividad de 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 94 % o más, 96 % o más, 98 % o más, o igual a o mayor que la actividad del mutante correspondiente a (a) como base. En el caso de medir la actividad en una condición de medición especificada, se prefiere que los mutantes correspondientes a (e) y (f) presenten una actividad de 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 94 % o más, 96 % o más, 98 % o más, o igual a o mayor que la actividad del mutante correspondiente a (d) como base. En el caso de medir la actividad en una condición de medición especificada, se prefiere que los mutantes correspondientes a (b') y (c') presenten una actividad de 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 94 % o más, 96 % o más, 98 % o más, o igual a o mayor que la actividad del mutante correspondiente a (a') como base. En el caso de medir la actividad en una condición de medición especificada, se prefiere que los mutantes correspondientes a (e') y (f') presenten una actividad de 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 94 % o más, 96 % o más, 98 % o más, o igual a o mayor que la actividad del mutante correspondiente a (d') como base. Como tal método de medición especificado, puede utilizarse la condición descrita anteriormente.

30 En la secuencia de aminoácidos de (b), (c), (e), (f), (b'), (c'), (e') o (f'), puede introducirse una mutación en un sitio en el dominio catalítico y un sitio distinto del dominio catalítico siempre que se mantenga la característica objetivo. La posición del residuo de aminoácido en la que puede mantenerse la característica objetivo, y en la que puede introducirse una mutación, es evidente para los expertos en la materia. Específicamente, es posible para los expertos en la materia (1) comparar varias secuencias de aminoácidos de proteínas que presentan la misma clase de característica, (2) clarificar una región relativamente conservada y una región relativamente no conservada, y posteriormente, (3) estimar una región en la que puede lograrse un papel importante para la función y una región en la que puede no lograrse un papel importante para la función a partir de la región relativamente conservada y la región relativamente no conservada, respectivamente, y por tanto, puede reconocerse cualquier correlación entre la estructura y la función. En consecuencia, los expertos en la materia son capaces de especificar la posición del residuo de aminoácido en la que puede introducirse una mutación en la secuencia de aminoácidos.

45 En el caso en el que el residuo de aminoácido se muta por sustitución, la sustitución del residuo de aminoácido puede ser una sustitución conservadora. El término "sustitución conservadora" se refiere al hecho de que un residuo de aminoácido predeterminado se sustituye con un residuo de aminoácido que presenta una cadena lateral análoga. En la técnica se conocen bien familias del residuo de aminoácido que presentan una cadena lateral análoga. Los ejemplos de tal familia pueden incluir aminoácidos que presentan una cadena lateral básica (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), aminoácidos que presentan una cadena lateral ácida (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), aminoácidos que presentan una cadena lateral polar no cargada (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), aminoácidos que presentan una cadena lateral no polar (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), aminoácidos que presentan una cadena lateral ramificada en la posición  $\beta$  (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), aminoácidos que presentan una cadena lateral aromática (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina),

aminoácidos que presentan un grupo hidroxilo (por ejemplo, cadena lateral que contiene grupo alcohólico, fenólico (por ejemplo, serina, treonina, tirosina) y aminoácidos que presentan una cadena lateral que contiene azufre (por ejemplo, cisteína, metionina). Preferentemente, la sustitución conservadora del aminoácido puede ser la sustitución entre ácido aspártico y ácido glutámico, la sustitución entre arginina, lisina e histidina, la sustitución entre triptófano y fenilalanina, la sustitución entre fenilalanina y valina, la sustitución entre leucina, isoleucina y alanina, o la sustitución entre glicina y alanina.

El mutante que se utiliza en la presente invención puede ser asimismo una proteína de fusión ligada con una porción heterogénea por medio de un enlace peptídico. Los ejemplos de tal porción heterogénea incluyen componentes peptídicos capaces de facilitar la purificación de una proteína objetivo (mutante) (por ejemplo, porciones de etiqueta, tales como etiqueta de histidina, etiqueta de estrep. II, etc.; y proteínas que van a utilizarse para la purificación de una proteína objetivo, tal como glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, y tipos mutantes de las mismas, etc.), componentes peptídicos capaces de mejorar la solubilidad de una proteína objetivo (por ejemplo, etiqueta Nus), componentes peptídicos que funcionan como una chaperona (por ejemplo, un factor desencadenante), componentes peptídicos que presentan otra función (por ejemplo, una proteína de longitud completa o una parte de la misma), y enlazadores.

Los ejemplos de las secuencias de aminoácidos (a) a (f) y (a') a (f) incluyen secuencias de aminoácidos de proteínas naturales y sus homólogos de origen natural, y proteínas mutantes producidas artificialmente. Las proteínas mutantes pueden obtenerse, por ejemplo, introduciendo una mutación en el ADN capaz de codificar una proteína objetivo y produciendo una proteína mutante utilizando la proteína mutante obtenida. Los ejemplos del método de mutagénesis incluyen mutagénesis específica de sitio y tratamientos de mutagénesis al azar (por ejemplo, un tratamiento con un mutágeno e irradiación con rayos ultravioletas).

## 2. Método de fabricación de una sustancia objetivo utilizando un mutante

### (2-1) Compuesto de heparosano:

Según el método de fabricación de la presente invención, puede producirse una sustancia objetivo predeterminada utilizando un compuesto de heparosano como material de partida.

En la presente invención, el término "compuesto de heparosano" significa heparosano o un derivado de heparosano.

El heparosano es un polisacárido constituido por una unidad de repetición de disacárido que consiste en un residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico (GlcA) y un residuo de N-acetil- $\alpha$ -D-glucosamina (GlcNAc) [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ ]. El heparosano puede prepararse, por ejemplo, mediante el método de fermentación que utiliza un microorganismo que presenta una capacidad de producción de heparosano (por ejemplo, documento WO/2015/050184A).

En la presente invención, el término "derivado de heparosano" se refiere un heparosano que presenta por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en las siguientes (1) a (7) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7):

- (1) N-desacetilación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina;
- (2) despolimerización;
- (3) N-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina;
- (4) C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico;
- (5) 2-O-sulfatación de un residuo de ácido hexurónico;
- (6) 6-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina; o
- (7) 3-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina.

Los detalles de estos modos de modificación son los descritos en la sección de "Breve descripción del dibujo". Tal derivado de heparosano puede prepararse mediante un tratamiento descrito a continuación.

En la presente invención, el término "ácido hexurónico" (HexA) significa ácido  $\beta$ -D-glucurónico (GlcA) o ácido  $\alpha$ -L-idurónico (IdoA). El "residuo de ácido hexurónico" en la "C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico" de (4) es preferentemente ácido  $\beta$ -D-glucurónico. En consecuencia, en la C5-epimerización de (4), se prefiere que se produzca ácido  $\alpha$ -L-idurónico a través de la isomerización de ácido  $\beta$ -D-glucurónico. Además, el "residuo de ácido hexurónico" en la "2-O-sulfatación de un residuo de ácido hexurónico" de (5) es preferentemente ácido  $\alpha$ -L-

idurónico. En consecuencia, en la 2-O-sulfatación de (5), se prefiere que el grupo hidroxilo en la posición 2 del ácido  $\alpha$ -L-idurónico se sulfata como residuo de ácido hexurónico.

(2-2) Método de producción de un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico:

La presente invención proporciona un método de producción de un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico. El presente método comprende convertir un compuesto de heparosano en un compuesto de heparosano modificado en el que un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico se sulfata en presencia del mutante de la enzima de 2-O-sulfatación descrito anteriormente.

En una forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano N-sulfatado. El término "N-sulfatado" significa que el grupo amino del residuo de N-acetil-D-glucosamina está sulfatado. El compuesto de heparosano N-sulfatado puede obtenerse sometiendo el heparosano a ambos tratamientos de los anteriores (1) y (3). El compuesto de heparosano N-sulfatado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (2), (4), (6) y (7) (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4).

En otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano epimerizado. El término "epimerizado" significa que, con respecto al residuo de ácido hexurónico, el residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico se convierte en el residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico. El compuesto de heparosano epimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano al tratamiento del anterior (4). El compuesto de heparosano epimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1) a (3), (6) y (7) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En todavía otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano despolimerizado. El término "despolimerizado" significa que el compuesto de heparosano se trata de manera que su peso molecular deviene bajo. Por ejemplo, el compuesto de heparosano "despolimerizado" presenta un peso molecular medio en número (Mn) de 1,000 a 150,000, y preferentemente de 8,000 a 60,000 y un peso molecular medio en peso (Mw) de 2,000 a 300,000, y preferentemente de 10,000 a 100,000 en cuanto a un valor medido por GPC basándose en pululano. El compuesto de heparosano despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano al tratamiento del anterior (2). El compuesto de heparosano despolimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1), (3), (4), (6) y (7) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En una forma de realización especificada, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado. "N-sulfatado", "epimerizado" y "despolimerizado" en el compuesto de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado son como se describieron anteriormente. El compuesto de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano a los tratamientos de los anteriores (1) a (4). El compuesto de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (6) y (7) (por ejemplo, 1 o 2).

En una forma de realización preferida, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado (ver el ejemplo 5(1)). "N-sulfatado", "epimerizado" y "despolimerizado" en el heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado son como se describieron anteriormente. El heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano a los tratamientos de los anteriores (1) a (4). El heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado no presenta por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (6) y (7) (por ejemplo, 1 o 2).

(2-3) Método de producción de un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la 3-posición de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina:

La presente invención proporciona un método de producción de un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la 3-posición de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina. El presente método comprende convertir un compuesto de heparosano en un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la 3-posición de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en presencia del mutante de la enzima de 3-O-sulfatación descrito anteriormente.

En una forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser el compuesto de heparosano N-sulfatado descrito anteriormente. El compuesto de heparosano N-sulfatado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (2) y (4) a (6) (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4).

En otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo el compuesto de heparosano epimerizado descrito anteriormente. El compuesto de heparosano epimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1) a (3), (5) y (6) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En todavía otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo el compuesto de heparosano despolimerizado descrito anteriormente. El compuesto de heparosano despolimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1), (3) y (4) a (6) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En todavía otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano 2-O-sulfatado. El término "2-O-sulfatado" significa que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico (preferentemente un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico). El compuesto de heparosano 2-O-sulfatado puede obtenerse sometiendo el heparosano al tratamiento del anterior (5). El compuesto de heparosano 2-O-sulfatado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1) a (4) y (6) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En todavía otra forma de realización, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano 6-O-sulfatado. El término "6-O-sulfatado" significa que se sulfata un grupo hidroxilo en la 6-posición de un residuo de N-acetil-D-glucosamina. El compuesto de heparosano 6-O-sulfatado puede obtenerse sometiendo el heparosano al tratamiento del anterior (6). El compuesto de heparosano 6-O-sulfatado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (1) a (5) (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5).

En una forma de realización especificada, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo un compuesto de heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado. "N-sulfatado", "6-O-sulfatado" y "despolimerizado" en el compuesto de heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado son como se describieron anteriormente. El compuesto de heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano a los tratamientos de los anteriores (1) a (3) y (6). El compuesto de heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado puede presentar además por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (4) y (5) (por ejemplo, 1 o 2).

En una forma de realización preferida, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado (ver el ejemplo 9(1)). "N-sulfatado", "6-O-sulfatado" y "despolimerizado" en el heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado son como se describieron anteriormente. El heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano a los tratamientos de los anteriores (1) a (3) y (6). El heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado no presenta por lo menos una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en los anteriores (4) y (5) (por ejemplo, 1 o 2).

En otra forma de realización preferida, el compuesto de heparosano como material de partida puede ser asimismo heparosano N-sulfatado, 2-O-sulfatado, 6-O-sulfatado, epimerizado y despolimerizado. "N-sulfatado", "2-O-sulfatado", "6-O-sulfatado", "epimerizado" y "despolimerizado" en el heparosano N-sulfatado, 2-O-sulfatado, 6-O-sulfatado, epimerizado y despolimerizado son como se describieron anteriormente. El heparosano N-sulfatado, 2-O-sulfatado, 6-O-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede obtenerse sometiendo el heparosano a los tratamientos de los anteriores (1) a (6). Es bien conocido que, en la enzima de 3-O-sulfatación, el heparosano N-sulfatado, 2-O-sulfatado, 6-O-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede utilizarse como sustrato (por ejemplo, documentos WO/2017/115674A, WO/2017/115675A). En consecuencia, en el mutante de la enzima de 3-O-sulfatación enzima de la presente invención, el heparosano N-sulfatado, 2-O-sulfatado, 6-O-sulfatado, epimerizado y despolimerizado puede utilizarse como sustrato.

#### (2-4) Método de producción de heparán sulfato:

La presente invención proporciona un método de producción de un heparán sulfato (preferentemente heparina). El presente método comprende someter heparosano a un tratamiento que comprende (1) N-desacetilación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (2) despolimerización, (3) N-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (4) C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico, (5) 2-O-sulfatación de un residuo de ácido hexurónico, (6) 6-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina y (7) 3-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, produciendo de ese modo un heparán sulfato, en el que

(I) la 2-O-sulfatación del residuo de ácido hexurónico se realiza en presencia del mutante de la enzima de 2-O-sulfatación descrito anteriormente.

En el método de producción de un heparán sulfato, los tratamientos de heparosano según los anteriores (1) a (7) pueden realizarse mediante los métodos descritos anteriormente que se conocen bien en la técnica (por ejemplo, documentos WO 2017/115674 A; WO 2017/115675 A; patente US nº 8,227,449; publicación de solicitud de patente

US nº 2012/0322114; Lindahl U, *et al.*, (2005) *J Med Chem*, 48(2): 349-352; Zhang Z., *et al.*, (2008) *Journal of the American Chemical Society*, 130(39): 12998-13007; y Chen J, *et al.*, *J Biol Chem.*, 30 de diciembre de 2005, 280(52): 42817-25).

5 (1) La N-desacetilación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina puede llevarse a cabo, por ejemplo, químicamente utilizando un agente de desacetilación. Los ejemplos del agente de desacetilación incluyen sustancias básicas, tales como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, hidrazinas, etc. Los ejemplos de la sal de metal alcalino incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de rubidio e hidróxido de cesio. Los ejemplos de la sal de metal alcalinotérreo incluyen hidróxido de berilio, hidróxido de magnesio,  
10 hidróxido de calcio, hidróxido de estroncio e hidróxido de bario.

La N-desacetilación es preferentemente N-desacetilación parcial. La N-desacetilación puede llevarse a cabo, por ejemplo, de manera que una tasa residual de grupo N-acetilo es un valor tal como se describe a continuación. Es decir, por ejemplo, la tasa residual de grupo N-acetilo puede ser de 1 % o más, 1.5 % o más, 3 % o más, 5 % o más, 7 % o más, 9 % o más u 11 % o más, y puede ser de 50 % o menos, 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o menos, 33 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos o 17 % o menos, o puede ser asimismo una combinación de los mismos. Específicamente, por ejemplo, la tasa residual de grupo N-acetilo puede ser de 1 % a 33 %, de 7 % a 33 %, de 7 % a 30 % o de 11 % a 17 %. Por ejemplo, la tasa residual de grupo N-acetilo de 7 % a 30 % es generalmente correspondiente al hecho de que el grupo N-acetilo existe en una razón de uno por cada 6 a 28 residuos de azúcar (uno en de 3 a 14 unidades en cuanto a una unidad de disacárido). Además, por ejemplo, la tasa residual de grupo N-acetilo de 11 % a 17 % es generalmente correspondiente al hecho de que el grupo N-acetilo existe en una razón de uno por cada de 12 a 18 residuos de azúcar (uno en de 6 a 9 unidades en cuanto a una unidad de disacárido). El grado de N-desacetilación (concretamente, tasa residual de grupo N-acetilo) puede confirmarse, por ejemplo, a través de análisis de disacáridos. Es decir, la tasa residual de grupo N-acetilo puede calcularse en cuanto a una razón (razón molar) de la cantidad de la unidad de disacárido que presenta un grupo N-acetilo con respecto a la cantidad total de las unidades de disacárido al someter el polisacárido a análisis de disacáridos.

En cuanto a una condición de la N-desacetilación parcial que utiliza hidróxido de sodio, por ejemplo, puede hacerse referencia a condiciones notificadas anteriormente (Kuberan B., *et al.*, (2003) *J Biol Chem.*, 278(52): 52613-52621; y publicación de solicitud de patente US nº 2011/0281820). En cuanto a una condición de la N-desacetilación parcial que utiliza una hidrazina, por ejemplo, puede hacerse referencia a condiciones mencionadas anteriormente (*Glycobiology*, 10 (2000) 159-171; *Carbohydrate Research*, 290 (1996) 87-96; y *Biochem. J.*, 217 (1984) 187-197).

35 (2) La despolimerización puede llevarse a cabo enzimáticamente utilizando una heparinasa. Los ejemplos de la heparinasa incluyen heparinasa I, heparinasa II y heparinasa III. Se prefiere heparinasa III. La despolimerización no está particularmente limitada siempre que el heparosano se trate de manera que el peso molecular del heparosano después de la despolimerización sea inferior al del heparosano antes de la despolimerización. La despolimerización puede llevarse a cabo de manera que el heparosano después de la despolimerización presente un peso molecular medio en número (Mn) de 1,000 a 150,000, y preferentemente de 8,000 a 60,000 y un peso molecular medio en peso (Mw) de 2,000 a 300,000, y preferentemente de 10,000 a 100,000 en cuanto a un valor medido mediante GPC basándose en pululano.

45 Preferentemente, la despolimerización se realiza utilizando heparinasa III. La "heparinasa III" se refiere a una enzima que escinde el sitio del residuo de glucosamina N-sulfatado o N-acetilado en un glucosaminoglucano, tal como heparosano, etc. (normalmente EC4.2.2.8). La heparinasa III que se utiliza en la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea capaz de escindir preferentemente el sitio del residuo de glucosamina que presenta un grupo N-acetilo de heparosano N-desacetilado.

50 (3) La N-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es un proceso de sulfatación del grupo amino del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en heparosano. La N-sulfatación puede llevarse a cabo, por ejemplo, químicamente utilizando un reactivo de sulfatación. Los ejemplos del reactivo de sulfatación incluyen complejos de trióxido de azufre, tales como un complejo de trióxido de azufre-piridina (PySO<sub>3</sub>), un complejo de trióxido de azufre-trimetilamina (TMASO<sub>3</sub>), etc.

55 (4) La C5-epimerización del residuo de ácido hexurónico es un proceso de producción del residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico a través de la isomerización del residuo de ácido  $\beta$ -D-glucurónico en el heparosano. La C5-epimerización puede realizarse utilizando una C5-epimerasa. Como C5-epimerasa, pueden utilizarse diversas C5-epimerasas derivadas de mamíferos o bacterias (patente US nº 8.227.449; publicación de solicitud de patente US nº 2012/0322114; documento WO 02/046379 A; Lindahl U, *et al.*, (2005) *J Med Chem*, 48(2): 349-352; Zhang Z., *et al.*, (2008) *Journal of the American Chemical Society*, 130(39): 12998-13007; Chen J, *et al.*, *J Biol Chem.*, 30 de diciembre de 2005; 280(52): 42817-25; y John R., *et al.*, *J. Biol Chem*, 23 de agosto de 2013; 288(34): 24332-9).

65 (5) La 2-O-sulfatación del residuo de ácido hexurónico es un proceso de sulfatación del grupo hidroxilo en la posición 2 del residuo de ácido hexurónico (preferentemente un residuo de ácido  $\alpha$ -L-idurónico) en el heparosano. La 2-O-sulfatación puede llevarse a cabo, por ejemplo, enzimáticamente utilizando diversas enzimas de 2-O-

sulfatación (2-OST) (por ejemplo, ver los documentos enumerados en los antecedentes de la técnica).

(6) La 6-O-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es un proceso de sulfatación del grupo hidroxilo en la 6-  
 5 posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano. La 6-O-sulfatación puede llevarse a cabo, por ejemplo, enzimáticamente utilizando una enzima de 6-O-sulfatación (6-OST). Los ejemplos de la 6-OST incluyen 6-OST-1, 6-OST-2 y 6-OST-3. La 6-O-sulfatación asimismo puede llevarse a cabo, por ejemplo, químicamente utilizando un reactivo de sulfatación. Los ejemplos del reactivo de sulfatación incluyen complejos de trióxido de azufre, tales como un complejo de trióxido de azufre-piridina ( $\text{PySO}_3$ ), un complejo de trióxido de azufre-trimetilamina ( $\text{TMASO}_3$ ), etc.

(7) La 3-O-sulfatación del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina es un proceso de sulfatación del grupo hidroxilo en la 3-  
 10 posición del residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina en el heparosano. La 3-O-sulfatación puede llevarse a cabo, por ejemplo, enzimáticamente utilizando una enzima de 3-O-sulfatación (3-OST). Los ejemplos de la 3-OST incluyen 3-OST-1, 3-OST-2, 3-OST-3, 3-OST-4 y 3-OST-5 (por ejemplo, ver los documentos enumerados en los antecedentes de la técnica).

Los tratamientos descritos anteriormente pueden realizarse en un orden arbitrario. Por ejemplo, la despolimerización (2) puede realizarse antes o después en la ruta de los anteriores (1) y (3) a (7). Puede realizarse después del anterior (1) y antes del anterior (3).

Además, los tratamientos de los anteriores (5) a (7) pueden realizarse en cualquier orden. Normalmente, los  
 20 tratamientos pueden realizarse en el orden de 2-O-sulfatación, 3-O-sulfatación y 6-O-sulfatación, o en el orden de 2-O-sulfatación, 6-O-sulfatación y 3-O-sulfatación. Los tratamientos descritos anteriormente asimismo pueden realizarse en el orden numérico (figura 1). Dos o más de los tratamientos descritos anteriormente pueden llevarse a cabo simultáneamente o por separado.

El producto de cada proceso puede someterse al siguiente proceso en un estado que está contenido en el líquido  
 de reacción en cada proceso tal como está, o puede someterse al siguiente proceso después de recuperar el  
 30 producto del líquido de reacción. Los medios para recuperar cada producto del líquido de reacción no están particularmente limitados. Los ejemplos de los medios para recuperar cada producto incluyen métodos conocidos que se adoptan para la separación y purificación de compuestos, tales como un método de tratamiento con membrana, un método de precipitación, etc. El producto de cada proceso puede someterse adecuadamente a un tratamiento, tal como purificación, dilución, concentración, secado, disolución, inactivación de enzima, etc., y a continuación someterse al siguiente proceso. La purificación puede llevarse a cabo en una extensión deseada. Estos tratamientos pueden llevarse a cabo solos o apropiadamente en combinación.

(2-5) Maneras de implementación de los métodos de los anteriores (2-2) a (2-4):

Cada una de las reacciones en los métodos de los anteriores (2-2) a (2-4) puede realizarse adecuadamente en un  
 40 sistema apropiado (por ejemplo, sistema tampón, sistema de fermentación). Como condición de tal reacción, pueden adoptarse condiciones mencionadas anteriormente (por ejemplo, ver los documentos descritos anteriormente) o las condiciones descritas en la sección de ejemplos. Por ejemplo, los métodos de (2-2) y (2-3) pueden realizarse a través de una reacción en un tampón (por ejemplo, MES, HEPES) que contiene de 0.1 a 50 g/l de un compuesto de heparosano y de 0.05 a 10 mM de PAPS y que presenta un pH apropiado (por ejemplo, de 5.0 a 9.0) a una temperatura apropiada (por ejemplo, de 25 a 42 °C) durante un tiempo deseado (por ejemplo, de 10 minutos a 48 horas).

En una forma de realización, el método de la presente invención puede realizarse utilizando el propio mutante de  
 50 la presente invención (a continuación en la presente memoria denominado "proteína" o similar, según se requiera). Por ejemplo, en el caso de utilizar una proteína recombinante como mutante de la presente invención, la proteína recombinante puede obtenerse a partir de un microorganismo transformado capaz de producir el mutante de la presente invención utilizando un vector de sistema libre de células. El mutante de la presente invención puede utilizarse como proteína no purificada, en bruto o purificada. Tal proteína puede utilizarse asimismo como proteína inmovilizada, lo que significa proteína inmovilizada en una fase sólida, en la reacción.

Es conocido un medio para cultivar un microorganismo transformado y, por ejemplo, pueden utilizarse unos medios  
 obtenidos añadiendo una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de vitamina, y similares a un  
 60 medio de nutrientes, tal como un medio LB, etc., o un medio mínimo, tal como un medio M9, etc. El microorganismo transformado se cultiva normalmente a de 16 a 42 °C, y preferentemente de 25 a 37 °C durante de 5 a 168 horas, y preferentemente de 8 a 72 horas según el huésped. Es posible realizar cualquiera de cultivo en agitación y cultivo estático dependiendo del huésped. Puede realizarse agitación, o puede realizarse aireación, según se requiera. En el caso de elegir un actinomiceto como huésped de expresión, puede utilizarse adecuadamente una condición que puede utilizarse para el fin de producir una proteína. Además, en el caso de utilizar un promotor inducible para el fin de expresión de una proteína, el cultivo puede realizarse asimismo añadiendo un agente inductor del promotor al medio.

Es posible purificar y aislar la proteína producida mediante un método de precipitación conocido, tal como precipitación con sales, precipitación isoelectrica, precipitación con disolvente, etc., a partir de un extracto del microorganismo transformado; un método que utiliza una diferencia en el peso molecular, tal como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, etc.; un método que utiliza la afinidad específica, tal como cromatografía de intercambio iónico, etc.; un método que utiliza una diferencia en la hidrofobicidad, tal como cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase inversa, etc.; otra cromatografía de afinidad, electroforesis en SDS poliacrilamida, electroforesis isoelectrica, o similares, o una combinación de los mismos. Cuando una proteína objetivo se expresa de manera secretora, puede obtenerse un sobrenadante de cultivo que contiene la proteína eliminando una célula bacteriana mediante centrifugación o similar de un caldo de cultivo obtenido cultivando un microorganismo transformado. La proteína asimismo puede purificarse y aislarse de este sobrenadante de cultivo.

En otra forma de realización, el método de la presente invención puede realizarse en presencia de un microorganismo transformado capaz de producir el mutante de la presente invención o un extracto del mismo.

Como extracto del microorganismo capaz de producir el mutante de la presente invención, puede utilizarse un líquido tratado que contiene la proteína objetivo que se trató mediante un método arbitrario. Como tal tratamiento, puede adoptarse el método tal como se mencionó anteriormente para el aislamiento y la purificación y un método de tratamiento microbicida que hace posible destruir el microorganismo. Como tal método de tratamiento microbicida, puede utilizarse un método arbitrario que hace posible destruir el microorganismo. Los ejemplos del mismo incluyen un tratamiento térmico, un tratamiento ácido, un tratamiento alcalino, un tratamiento con tensoactivo y un tratamiento con disolvente orgánico.

En una forma de realización preferida, el microorganismo transformado es un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el mutante de la presente invención y una célula huésped que contiene una unidad de expresión que contiene un promotor operativamente ligado con la misma.

El término "unidad de expresión" se refiere a una unidad mínima que contiene un polinucleótido predeterminado que va a expresarse como proteína y un promotor operativamente ligado con el mismo, que hace posible lograr la transferencia del polinucleótido, a su vez la producción de una proteína que va a codificar el polinucleótido. La unidad de expresión puede contener además un elemento, tal como un terminador, un sitio de unión al ribosoma, un gen resistente a fármacos, etc. La unidad de expresión puede ser ADN o ARN y es preferentemente ADN.

La unidad de expresión puede ser o bien homóloga (concretamente, inherente) o heteróloga (concretamente, no inherente) para la célula huésped. Es preferentemente una unidad de expresión heteróloga. El término "unidad de expresión heteróloga" significa que la unidad de expresión es heteróloga para la célula huésped. En consecuencia, en la presente invención, por lo menos un elemento que constituye la unidad de expresión es heterólogo para la célula huésped. Los ejemplos del elemento que constituye la unidad de expresión, que es heterólogo para la célula huésped, incluyen los elementos anteriormente descritos. Preferentemente, o bien uno o bien ambos del polinucleótido que codifica la proteína objetivo y el promotor que constituye la unidad de expresión heteróloga son heterólogos para la célula huésped. En consecuencia, en la presente invención, o bien uno o bien ambos del polinucleótido que codifica la proteína objetivo y el promotor son uno derivado de un organismo distinto de la célula huésped (por ejemplo, un procarionte y un eucariote, o un microorganismo, un insecto, una planta y un animal, tal como un mamífero, etc.) o un virus, o un material sintetizado de manera artificial. Alternativamente, el polinucleótido que codifica la proteína objetivo puede ser heterólogo para la célula huésped. Preferentemente, la proteína objetivo es heteróloga para la célula huésped.

El promotor que constituye la unidad de expresión heteróloga no está particularmente limitado siempre que sea capaz de expresar la proteína que va a codificarse con el polinucleótido ligado aguas abajo del mismo, con la célula huésped. Por ejemplo, el promotor puede ser o bien homólogo o bien heterólogo para la célula huésped. Por ejemplo, pueden utilizarse promotores constitutivos o inducibles que se utilizan generalmente para producción de una proteína recombinante. Los ejemplos de tal promotor incluyen un promotor PhoA, un promotor PhoC, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, un promotor lac, un promotor trp, un promotor trc, un promotor tac, un promotor PR, un promotor PL, un promotor SP6, un promotor inducible por arabinosa, un promotor de choque frío y un promotor inducible por tetraciclina. Preferentemente, puede utilizarse un promotor que presenta una fuerte actividad de transferencia en la célula huésped. Los ejemplos del promotor que presenta una fuerte actividad de transferencia en la célula huésped incluyen un promotor de un gen que se expresa altamente en la célula huésped y un promotor derivado de virus.

En la presente invención, los ejemplos de la célula huésped que se utiliza como microorganismo transformado incluyen diversos microorganismos incluida una bacteria que pertenece al género *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), un actinomiceto y una bacteria corineforme. En la presente invención, en la *Escherichia coli* que se utiliza como célula huésped, se incluyen cepas que se utilizan frecuentemente para clonación o expresión general de proteínas heterólogas, por ejemplo, HB101, MC1061, JM109, CJ236 y MV1184. En la presente invención, en el actinomiceto que se utiliza como célula huésped, se incluyen cepas que se utilizan frecuentemente en general para la expresión de proteínas de proteínas heterólogas, por ejemplo, *S. lividans* TK24 y *S. coelicolor* A3(2). En la presente invención, una bacteria del género *Corynebacterium* que se utiliza como célula huésped es

un bacilo aerobio Gram-positivo y hasta ahora se ha clasificado en el género *Brevibacterium*; sin embargo, en la actualidad, incluye bacterias unificadas en el género *Corynebacterium* (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 255 (1981)) y bacterias que pertenecen al género *Brevibacterium* muy estrechamente relacionado con el género *Corynebacterium*. Las ventajas de utilizar bacterias corineformes incluyen que secretan inherentemente una cantidad extremadamente pequeña de proteínas al exterior de las células bacterianas en comparación con hongos, levaduras, bacterias *Bacillus*, etc., que se utilizan convencionalmente para la producción secretora de proteínas y, por tanto, en el caso de la producción de manera secretora de la proteína objetivo, el proceso de purificación puede simplificarse o eliminarse; que en el caso de realizar la reacción enzimática con una enzima producida de manera secretora, puede utilizarse un sobrenadante de cultivo como fuente de enzimas y, por tanto, pueden reducirse las impurezas o reacciones secundarias debidas a componentes de células bacterianas, enzimas contaminantes, etc.; y que las bacterias corineformes pueden crecer bien en un medio simple que contiene un sacárido, amoníaco, una sal inorgánica, etc. y, por tanto, son excelentes en vista del coste del medio, el método de cultivo y la productividad del cultivo. Además, al utilizar la ruta secretora del sistema Tat, asimismo es posible secretar eficazmente proteínas que son una proteína útil industrialmente, cuya producción secretora es difícil en la ruta secretora del sistema Sec conocida convencionalmente, tal como isomaltodextranasa, proteína glutaminasa, etc. (documento WO 2005/103278 A). Además, asimismo puede utilizarse *Corynebacterium glutamicum* tal como se da a conocer en los documentos WO 01/023491 A, WO 02/081694 A, WO 01/023491 A, etc.

Preferentemente, el microorganismo transformado es una bacteria que pertenece al género *Escherichia*. La bacteria que pertenece al género *Escherichia* es preferentemente *Escherichia coli*.

El microorganismo transformado que se utiliza en la presente invención puede prepararse mediante un método arbitrario que se conoce en la técnica. Por ejemplo, tal unidad de expresión está contenida en la célula huésped en una morfología en la que se incorpora en el ADN genómico de la célula huésped, o en una morfología en la que no se incorpora en el ADN genómico de la célula huésped (por ejemplo, un estado del vector de expresión). La célula huésped que contiene una unidad de expresión puede obtenerse transformando la célula huésped con un vector de expresión mediante un método arbitrario que se conoce en la técnica (por ejemplo, un método de célula competente, un método de electroporación). En el caso en el que el vector de expresión es un vector integrativo que genera recombinación homóloga con el ADN genómico de la célula huésped, la unidad de expresión puede incorporarse en el ADN genómico de la célula huésped a través de transformación. Mientras tanto, en el caso en el que el vector de expresión es un vector no integrativo que no genera recombinación homóloga con el ADN genómico de la célula huésped, la unidad de expresión no se incorpora en el ADN genómico de la célula huésped a través de transformación sino que puede existir en la célula huésped en un estado del vector de expresión ya que es independiente del ADN genómico. Alternativamente, es posible incorporar la unidad de expresión en el ADN genómico de la célula huésped mediante la tecnología de edición genómica (por ejemplo, sistema CRISPR/Cas, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN)).

El vector de expresión que se utiliza en la presente invención puede contener adicionalmente, además de la unidad mínima descrita anteriormente como unidad de expresión, un elemento que funciona en la célula huésped, tal como un terminador, un sitio de unión al ribosoma, un gen resistente a fármacos, etc. Los ejemplos del gen resistente a fármacos incluyen genes resistentes a fármacos, tales como tetraciclina, ampicilina, kanamicina, higromicina, fosfinotricina, etc.

El vector de expresión puede contener además una región que hace posible lograr la recombinación homóloga con el genoma de la célula huésped para la recombinación homóloga con el ADN genómico de la célula huésped. Por ejemplo, el vector de expresión puede estar diseñado de manera que la unidad de expresión contenida en el mismo esté situada entre un par de regiones homólogas (por ejemplo, un brazo de homología homólogo a una secuencia especificada en el genoma de la célula huésped, loxP, FRT). La región genómica de la célula huésped (diana de la región homóloga) en la que va a introducirse la unidad de expresión no está particularmente limitada, pero puede ser asimismo un locus de gen en el que la cantidad de expresión es grande en la célula huésped.

El vector de expresión puede ser un plásmido, un vector de virus, un fago o un cromosoma artificial. El vector de expresión puede ser asimismo o bien un vector integrativo o bien un vector no integrativo. El vector integrativo puede ser un vector de un tipo en el que la totalidad se incorpora en el genoma de la célula huésped. Alternativamente, el vector integrativo puede ser asimismo un vector de un tipo en el que únicamente se incorpora una parte del mismo (por ejemplo, una unidad de expresión) en el genoma de la célula huésped. El vector de expresión puede ser además un vector de ADN o un vector de ARN (por ejemplo, un retrovirus). Como vector de expresión, pueden utilizarse vectores de expresión utilizados generalmente. Los ejemplos de tal vector de expresión incluyen pUC (por ejemplo, pUC19, pUC18), pSTV, pBR (por ejemplo, pBR322), pHSG (por ejemplo, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398), RSF (por ejemplo, RSF1010), pACYC (por ejemplo, pACYC177, pACYC184), pMW (por ejemplo, pMW119, pMW118, pMW219, pMW218), pQE (por ejemplo, pQE30), y derivados de los mismos. Además, en el caso de seleccionar, como célula huésped, la bacteria corineforme, tal como *Corynebacterium glutamicum*, puede utilizarse adecuadamente pPK4 que es un vector de alto número de copias, etc.

## Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos.

### 5 Ejemplo 1: preparación de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado

#### (1) Fermentación de heparosano

10 Se obtuvo un caldo de cultivo que contenía heparosano según la bacteria productora de heparosano (cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3)/pVK9-kfiABCD) y las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1 del documento WO 2015/050184 A.

#### (2) Purificación de heparosano

15 Se recuperó un sobrenadante de cultivo del caldo de cultivo por medio de centrifugación. Con el fin de eliminar los componentes del medio, se lavó 1 ml del sobrenadante de cultivo con agua milliQ utilizando una membrana UF y se concentró hasta 250 µl. A 250 µl del líquido concentrado con membrana UF, se le añadieron 500 µl de etanol al 100 %, y se precipitó el heparosano por medio de centrifugación. El precipitado obtenido se secó al aire para obtener heparosano. Se purificó el heparosano del sobrenadante de cultivo restante mediante los mismos procedimientos, obteniendo de ese modo 10 g de heparosano en total.

#### (3) N-Desacetilación de heparosano

25 En primer lugar, a 1.22 g de heparosano, se le añadieron 61 ml de hidrazina-H<sub>2</sub>O y 4.7 ml de ácido sulfúrico 1 N, y después de purgar la fase gaseosa con nitrógeno, se calentaron los contenidos hasta 100 °C y se dejaron reaccionar entre sí durante 4.75 horas.

30 Posteriormente, se detuvo la reacción por medio de enfriamiento con hielo, a continuación se añadieron 61 ml de una disolución acuosa de NaCl al 16 % y 610 ml de MeOH, y se centrifugaron los contenidos para eliminar un sobrenadante. Se disolvió el precipitado obtenido en 50 ml de H<sub>2</sub>O y luego se desaló y se concentró utilizando una membrana Amicon UF (3 kDa).

35 Posteriormente, al concentrado obtenido, se le añadieron una cantidad doble de H<sub>2</sub>O y una cantidad igual de NaHCO<sub>3</sub> 1 M, y se hizo gotear una disolución de I<sub>2</sub> 0.2 M/KI 0.4 M hasta que la mezcla se coloreó de amarillo. Después de eso, se hizo gotear hidrazina-H<sub>2</sub>O; el yodo en exceso se redujo a un ion de yodo; el resultante de desaló y se concentró de nuevo utilizando una membrana Amicon UF (3kDa); y se sometió el concentrado a evaporación hasta sequedad a presión reducida, obteniendo de ese modo heparosano N-desacetilado. La tasa residual del grupo N-acetilo en el heparosano N-desacetilado obtenido era del 14.9 % (tal como se describe a continuación).

#### (4) Despolimerización de heparosano N-desacetilado

##### (4-1) Preparación de heparinasa III

#### 45 <Construcción de plásmido de expresión para genes hepC derivados de *Flavobacterium heparinum*>

50 A partir de *Flavobacterium heparinum* (ATCC13125), se clonó el gen hepC que codifica heparinasa III en el vector pMIV-Pnlp0 (publicación de solicitud de patente US nº 2005/0196846) para construir un plásmido de expresión de gen hepC, pMIV-Pnlp0-hepC. Se incorporan un promotor nlp0 fuerte (Pnlp0) y un terminador rrnB en pMIV-Pnlp0-ter, y el promotor y el terminador pueden funcionar como unidad de expresión de un gen diana cuando el gen diana se inserta entre ellos. "Pnlp0" indica el promotor de tipo natural del gen nlpD derivado de la cepa de *Escherichia coli* K-12.

55 A continuación se muestran los detalles de la construcción del plásmido de expresión. Mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde, así como el cebador P1 (SEC ID nº: 11) y el cebador P2 (SEC ID nº: 12), se obtuvo un fragmento de ADN que contenía la región promotora (Pnlp0) del gen nlpD de aproximadamente 300 pb. Los sitios para las enzimas de restricción Sall y PaeI se diseñaron en las regiones del extremo 5' de los respectivos cebadores. Los ciclos de PCR consistieron en 95 °C durante 3 minutos, luego 2 ciclos de 95 °C durante 60 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 15 segundos, y 72 °C durante 5 minutos como ciclo final. El fragmento obtenido se trató con Sall y PaeI, y se insertó en pMIV-5JS (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2008-99668) en el sitio Sall-PaeI para obtener el plásmido pMIV-Pnlp0. La secuencia de nucleótidos del fragmento de PaeI-Sall del promotor Pnlp0 insertado en este plásmido pMIV-Pnlp0 es tal como se muestra como SEC ID nº: 13.

65 Posteriormente, mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de MG1655 como molde, así como el cebador P3

(SEC ID nº: 14) y el cebador P4 (SEC ID nº: 15), se obtuvo un fragmento de ADN (SEC ID nº: 16) que contenía aproximadamente 300 pb de la región terminadora del gen *rrnB*. Los sitios para las enzimas de restricción XbaI y BamHI se diseñaron en las regiones del extremo 5' de los respectivos cebadores. Los ciclos de PCR consistieron en 95 °C durante 3 minutos, luego 2 ciclos de 95 °C durante 60 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 59 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 15 segundos, y 72 °C durante 5 minutos como ciclo final. El fragmento obtenido se trató con XbaI y BamHI, y se insertó en pMIV-Pnlp0 en el sitio XbaI-BamHI para obtener el plásmido pMIV-Pnlp0-ter.

Posteriormente, se sintetizó artificialmente una cadena de ADN que contenía el ORF de genes *hepC* derivados de *Flavobacterium heparinum* (ATCC13125) (Su H., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62:2723-2734). Mediante PCR utilizando esta cadena de ADN como molde, así como el cebador P5 (SEC ID nº: 17) y el cebador P6 (SEC ID nº: 18) como cebadores, se amplificó un fragmento de ADN para el gen *hepC*. Se utilizó polimerasa PrimeStar (TaKaRa) para la PCR, y se realizó PCR en la composición de reacción descrita en el protocolo adjunto. Los ciclos de PCR consistieron en 94 °C durante 5 minutos, luego 30 ciclos de 98 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 8 minutos, y mantenimiento final a 4 °C. Además, mediante PCR utilizando pMIV-Pnlp0 como ADN de molde y los oligonucleótidos del cebador P7 (SEC ID nº: 19) y el cebador P8 (SEC ID nº: 20) como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN de pMIV-Pnlp0. Se utilizó polimerasa PrimeStar para la PCR, y se realizó PCR en la composición de reacción descrita en el protocolo adjunto. Los ciclos de PCR consistieron en 94 °C durante 5 minutos, luego 30 ciclos de 98 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 6 minutos, y mantenimiento final a 4 °C. Ambos fragmentos de ADN obtenidos se ligaron entre sí utilizando el kit de clonación HD In-Fusion (marca comercial registrada) (fabricado por Clontech) para construir un plásmido de expresión de gen *hepC*, pMIV-Pnlp0-*hepC*. Una secuencia de nucleótidos que contiene los genes *hepC* clonados se muestra como SEC ID nº: 21, y una secuencia de aminoácidos de heparinasa III (*HepC*) codificada de ese modo se muestra como SEC ID nº: 22.

<Construcción de la cepa que expresa el gen *hepC* de la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y preparación de líquido de la enzima heparinasa III>

El plásmido de expresión del gen *hepC*, pMIV-Pnlp0-*hepC*, se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Life Technologies) mediante electroporación (célula: 80 µl, 200 Ω, 25 µF, 1.8 kV, cubeta: 0.1 ml) para obtener la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3)/pMIV-Pnlp0-*hepC* como cepa de producción de heparinasa III. Esta cepa se propagó sobre el medio LB que presentaba 25 µg/ml de cloranfenicol añadido al mismo y se precltivó durante la noche a 37 °C. Después de eso, se inoculó el caldo de cultivo en 300 ml de un medio LB contenido en un matraz Sakaguchi de manera que la concentración final fuera del 2 % v/v. Se realizó cultivo en agitación a 37 °C durante 4 horas, y luego se terminó el cultivo. Después de la centrifugación, la célula bacteriana se lavó dos veces con NaCl al 0.85 % y se suspendió en 30 ml de un tampón HEPES 50 mM (pH: 7.0). Se sometió la suspensión a ultrasonidos para romper la célula bacteriana. El líquido con células rotas se centrifugó para preparar el líquido de la enzima heparinasa III como sobrenadante (extracto libre de células).

(4-2) Despolimerización mediante reacción de heparinasa III

Se disolvieron 1 g del heparosano N-desacetilado que presentaba una tasa residual de grupo N-acetilo del 14.9 % tal como se obtuvo en el anterior (3) y 2 ml de la disolución de heparinasa III de 31.3 mUI/µl en 100 ml de un tampón Tris (pH: 8.0) que contenía 100 mM de NaCl y 1.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, y se dejó que los contenidos reaccionaran entre sí a 37 °C durante 5.3 horas. Se añadió el líquido de reacción y se mezcló con 100 ml de una disolución acuosa de NaCl al 16 % y 900 ml de EtOH, y se centrifugó la mezcla para eliminar un sobrenadante, obteniendo de ese modo un heparosano despolimerizado, N-sulfatado y desacetilado.

El peso molecular después de la despolimerización con heparinasa III se midió mediante GPC basándose en pululano. Como resultado, el peso molecular medio en número (Mn) era de 9,860, y el peso molecular medio en peso (Mw) era de 15,430.

(5) N-Sulfatación de heparosano despolimerizado y N-desacetilado

En primer lugar, se disolvió 1 g del heparosano despolimerizado, N-desacetilado obtenido en el anterior (4) en 50 ml de agua milliQ, a lo que luego se le añadieron 50 ml de una disolución acuosa de 20 mg/ml de NaHCO<sub>3</sub> y 20 mg/ml de trimetilamina·SO<sub>3</sub>, y se dejó que los contenidos reaccionaran entre sí durante la noche a 55 °C.

Posteriormente, se añadió 1 l de EtOH y se mezcló, y se centrifugó la mezcla para eliminar un sobrenadante, obteniendo de ese modo un heparosano N-sulfatado y despolimerizado.

Posteriormente, el heparosano N-sulfatado y despolimerizado obtenido se disolvió en agua milliQ para preparar 500 µl, y la disolución se sometió a análisis de disacáridos para determinar el rendimiento relativo al heparosano N-desacetilado. Los procedimientos se muestran a continuación.

<Análisis de disacáridos>

El análisis de disacáridos del heparosano N-sulfatado y despolimerizado se llevó a cabo según las condiciones notificadas anteriormente (T. Imanari, *et al.*, "High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides", *J.O. Chromato. A*, 720, 275-293 (1996)). Es decir, el heparosano N-sulfatado y despolimerizado se descompuso en un disacárido insaturado utilizando heparinasa II y heparinasa III, y el producto de descomposición se analizó mediante HPLC, cuantificando de ese modo las cantidades de los respectivos disacáridos constituyentes.

De manera similar, se llevó a cabo el análisis de disacáridos del heparosano N-desacetilado. El análisis de disacáridos del heparosano N-desacetilado se llevó a cabo después de la N-sulfatación del heparosano N-desacetilado. Es decir, las cantidades de los respectivos disacáridos constituyentes se cuantificaron mediante la N-sulfatación del heparosano N-desacetilado, descomponiendo el resultante en un disacárido insaturado utilizando heparinasa II y heparinasa III, y analizando el producto de descomposición mediante HPLC. La N-sulfatación del heparosano N-desacetilado se llevó a cabo de la misma manera que en la N-sulfatación del heparosano despolimerizado y N-desacetilado.

El análisis de disacáridos se llevó a cabo específicamente en los siguientes procedimientos.

- (a) Se mezclaron 0.2 U de heparinasa II (Sigma), de 0.02 a 0.03 mUI de heparinasa III, 5 µg de una muestra de polisacárido y 10 µl de un tampón para la digestión enzimática (100 mM de CH<sub>3</sub>COONa y 10 mM de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca, pH: 7.0) y se diluyeron con agua milliQ para producir 100 µl, preparando de ese modo una disolución de reacción.
- (b) Se dejó que la disolución de reacción reaccionara a 37 °C durante 16 horas o más y luego se sometió a ebullición a 100 °C durante 2 minutos, deteniendo de ese modo la reacción.
- (c) La disolución de la que se eliminó la materia insoluble con un filtro de 0.45 µm se designó como muestra para el análisis de disacáridos.
- (d) El análisis se realizó de la siguiente manera. Columna: Inertsil ODS-3 150 mm × 2.1 mm, diámetro de partícula: 5 µm, temperatura: 50 °C, velocidad de flujo: 0.25 ml/min, longitud de onda de detección: 230 nm, disolución de elución (disolución A): acetonitrilo al 4 % y 1.2 mM de tributilamina, disolución de elución (disolución B): acetonitrilo al 4 % y CsCl 0.1 M, condición de gradiente: del 1 al 90 % de disolución B.

El rendimiento se calculó a partir de la suma total de las cantidades de los sacáridos constituyentes producidos por las respectivas muestras de polisacáridos. Es decir, el rendimiento se calculó como una razón (razón molar) de la cantidad total de los disacáridos producidos a partir del heparosano N-sulfatado y despolimerizado en relación con la cantidad total de los disacáridos producidos a partir del heparosano N-desacetilado. Además, en ese momento, en el heparosano N-sulfatado y despolimerizado obtenido, se confirmó que el 99 % o más del grupo amino generado por la N-deacetilación estaba N-sulfatado.

Además, se calculó la tasa residual de grupo N-acetilo en el heparosano N-desacetilado basándose en las cantidades de los respectivos sacáridos constituyentes producidos a partir del heparosano N-desacetilado. Es decir, se calculó la tasa residual de grupo acetilo como una razón (razón molar) de la cantidad del disacárido que presenta un grupo N-acetilo en relación con la cantidad total de los disacáridos. La tasa residual de grupo acetilo era de 14.9 %.

(6) Preparación de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado(6-1) Preparación de D-glucuronil C5-epimerasa purificada (Dlce)<Construcción de la cepa de expresión de Dlce derivada de pez cebra>

Mediante una reacción PCR utilizando pMAL-c2x (SEC ID n°: 23, New England BioLabs) como ADN molde, así como SEC ID n°: 24 y 25 como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN de región C-terminal de una proteína de unión a maltosa de tipo mutante (MBP\*). En la reacción PCR descrita anteriormente, se añadió un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción Bg1II al extremo 5'-terminal, y se añadieron sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción HindIII, BamHI, SacI, XhoI y NotI al extremo 3'-terminal. El ADN de plásmido pMAL-c2x y el fragmento de ADN de región C-terminal de MBP\* se escindieron con Bg1II y HindIII, seguido por la realización de la reacción de ligación para obtener un plásmido pMAL-MBP\*. La secuencia de nucleótidos del plásmido pMAL-MBP\* se muestra como SEC ID n°: 26.

Utilizando pMAL-MBP\* como ADN molde y polimerasa PrimeStar (TaKaRa) como polimerasa, se realizó PCR según el protocolo del fabricante, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN de pMAL-MBP\*. Se utilizó una combinación de SEC ID n°: 27 y 28 como cebador.

Se preparó ADNc de Dlce derivada de pez cebra a través de síntesis génica artificial (Thermo Fisher Scientific K.K.). Mediante una reacción PCR utilizando el ADNc como molde, así como SEC ID n°: 29 y 30 como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN que contenía una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio catalítico del Dlce derivada de pez cebra (G70-Asn585). El fragmento de ADN obtenido y el fragmento de ADN de pMAL-MBP\* se ligaron entre sí utilizando el kit de clonación HD In-Fusion (marca comercial registrada) (fabricado por Clontech). Se transformó una cepa de *Escherichia coli* JM109 con el líquido de reacción, obteniendo de ese modo pMAL-MBP\*-dreDlce (G70). Se transformó *Escherichia coli* Origami B (DE3) con el plásmido obtenido y se denominó *Escherichia coli* Origami B (DE3)/pMAL-MBP\*-dreDlce (G70). Una secuencia de nucleótidos del fragmento insertado y una secuencia de aminoácidos que va a codificarse de ese modo se muestran como SEC ID n°: 31 y 32, respectivamente.

#### <Preparación de D-glucuronil C5-epimerasa (Dlce)>

La *Escherichia coli* Origami B (DE3)/pMAL-MBP\*-dreDlce (G70) se inoculó en un medio LB que presentaba 100 µg/ml de ampicilina añadida al mismo y se curó previamente durante la noche a 37 °C. Después de eso, el caldo de cultivo se inoculó en 100 ml de un medio (LB + glicerol) que presentaba 100 µg/ml de ampicilina añadida al mismo (95 % (v/v) de medio LB, 1.0 % (v/v) de glicerol, 5 mM de MOPS-KOH (pH: 7.0)) contenido en un matraz Sakaguchi de 500 ml de volumen de manera que la concentración final era del 1 %. Se realizó el cultivo en agitación a 37 °C hasta que la DO660 era de 0.5 a 0.7. Después de eso, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Nacalai Tesque, Inc.) de manera que la concentración final era 0.5 mM, y el resultante se cultivó adicionalmente durante la noche a 22 °C.

Después de centrifugar el caldo de cultivo, se recuperó la célula bacteriana, se lavó una vez con un tampón-1 (20 mM de Tris-HCl (pH: 7.5) y 200 mM de NaCl), y luego se suspendió. Se sometió la suspensión a ultrasonidos con un ultrasonificador 201M (Kubota Corporation), y después de la centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos, se obtuvo un sobrenadante como extracto libre de células. Posteriormente, el extracto libre de células se suministró a MBPTrap HP 5 ml (GE Healthcare) equilibrado con 20 mM de Tris (pH: 7.5) y 200 mM de NaCl. La proteína no adsorbida se lavó con el tampón-1 y luego se eluyó con el tampón-1 que presentaba maltosa 10 mM añadida al mismo, obteniendo de ese modo una MBP\*-dreDlce purificada (G70).

#### (6-2) C5-Epimerización con Dlce

Se llevó a cabo una reacción de C5-epimerización del heparosano N-sulfatado y despolimerizado obtenido en el anterior (4). Se añadieron 8 mU/ml de la MBP\*-dreDlce purificada (G70) a 4 g/l del heparosano N-sulfatado y despolimerizado, 50 mM de MES (pH: 7.0) y 1 mM de cloruro de calcio, y se dejó que los contenidos reaccionaran entre sí durante la noche a 37 °C. Se detuvo la reacción a través de un tratamiento térmico a 95 °C durante 15 minutos, y el líquido de detención de la reacción se sometió a sustitución del líquido con agua ultrapura utilizando Amicon Ultra-15 3K (Merck Millipore).

#### (6-3) Cuantificación de la tasa de C5-epimerización

La cuantificación de la tasa de C5-epimerización se llevó a cabo mediante análisis de la composición de disacáridos mediante degradación con ácido nitroso. Como resultado, la tasa de C5-epimerización era del 26.7 %.

#### <Reactivo>

NaNO<sub>2</sub> (n° CAS: 7632-00-0, MW: 69.01)

Ácido cítrico (n° CAS: 77-92-9, MW: 192.1)

2,4-Dinitrofenilhidrazina (n° CAS: 119-26-6, MW: 198.1), que contiene un 50 % de agua (abreviatura: DNPH)

#### <Líquido de prueba>

Disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub>: disolución de 49.5 mg del reactivo disuelto en 1 ml de H<sub>2</sub>O

Disolución acuosa de ácido cítrico: disolución de 384.2 mg del reactivo disuelto en 1 ml de H<sub>2</sub>O

Disolución acuosa de DNPH: disolución de 20.4 mg del reactivo (que contiene un 50 % de agua) disuelto en 1 ml de acetonitrilo

#### <Procedimientos de análisis>

En un microtubo de 1.5 ml (Eppendorf), se añadieron sucesivamente 10 µl del líquido de reacción, 20 µl del tampón de ácido cítrico y 10 µl de la disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub>, y se agitó la disolución mezclada (a 1,000 rpm) a 65 °C

durante 2 horas, obteniendo de ese modo un líquido degradado con ácido nitroso. A 40 µl del líquido degradado con ácido nitroso obtenido, se le añadieron 20 µl de la disolución de DNPH, y se agitaron los contenidos (a 1,000 rpm) a 45 °C durante 2 horas, obteniendo de ese modo un líquido derivatizado. Se analizó la composición del líquido derivatizado obtenido mediante HPLC en la siguiente condición.

5

<Condición de análisis mediante HPLC>

Columna: ODS Z-CLUE 3 µm (fabricada por Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.) 2.0 mm × 250 mm

10 Temperatura de la caja de la columna: 50 °C

Velocidad de flujo de la disolución de elución: 0.3 ml/min

Detección: UV 365 nm

15

Cantidad de inyección: 5 µl

Composición de la disolución de elución:

20 Disolución A: HCOONH<sub>4</sub> 50 mM (pH: 4.5)

Disolución B: MeCN

Tabla 1: condiciones de gradiente de la HPLC

25

Tiempo (min)	Disolución A (%)	Disolución B (%)
0.0	90	10
13.0	80	20
27.0	20	80
27.1	90	10
40.0	90	10

Tabla 2

Derivado de disacárido (que muestra la estructura antes de la degradación con ácido nitroso)	Tiempo de retención relativo (min)
GlcA(2S)-GlcN(NS)	1.41
IdoA(2S)-GlcN(NS)	1.50
GlcA-GlcN(NS)	1.73
IdoA-GlcN(NS)	1.89

30 **Ejemplo 2: construcción de la cepa de expresión de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST)**

(1) Construcción de pC2-1

35 Como enzima de 2-O-sulfatación (2-OST), se utilizó una proteína de fusión (MBP\*\*<sup>-</sup>2-OST) de sitios catalíticos (Asp69-Asn356) de un mutante que resulta de la conversión de un residuo de tirosina en la posición 94 de la 2-OST derivada de hámster chino en alanina y una proteína de unión a maltosa MBP.

40 Los detalles de la construcción del plásmido de expresión se muestran a continuación. Utilizando el plásmido pMAL-c2x como ADN molde y polimerasa PrimeStar (TaKaRa) como polimerasa, se realizó PCR según el protocolo del fabricante, obteniendo de ese modo un fragmento de ARN de pMAL-MBP\*\*. Se utilizó una combinación de SEC ID n°: 33 y 34 como cebador.

45 Se preparó ADNc (optimizado de conformidad con la utilización de codones de *Escherichia coli*) de un mutante resultante de la conversión de un residuo de tirosina 94 de la 2-OST derivada de hámster chino en isoleucina a través de síntesis génica artificial (Thermo Fisher Scientific K.K.) mediante referencia al informe de Kobayashi, *et al.* (Kobayashi M., *et al.*, *Jour Biol. Chem.*, 1997, 272:13980-13985) (ver SEC ID n°: 5 y 6 con respecto a la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos). Se obtuvo un fragmento de ADN de 2-OST (Y64A) que contenía la secuencia de nucleótidos que codifica los sitios catalíticos de 2-OST derivada de hámster chino (Asp69-Asn356) a través de una reacción PCR utilizando el ADNc anterior como molde y los oligonucleótidos de SEC ID n°: 35 y 36 como cebadores. El fragmento de ADN obtenido y el fragmento de ADN de pMAL-MBP\*\* se ligaron entre sí utilizando el kit de clonación HD In-Fusion (marca comercial registrada) (fabricado por Clontech). Se transformó una cepa de *Escherichia coli* JM109 con el líquido de reacción y se aplicó en un medio de agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, seguido por cultivo durante la noche a 37 °C. El plásmido se extrajo de una

50

colonia de los microorganismos transformados hechos crecer según un método conocido. La secuencia de nucleótidos se confirmó con el analizador genético 3100 (fabricado por Applied Biosystems), y el plásmido que presentaba una estructura objetivo se denominó "pC2-1".

5 (2) Construcción del plásmido de expresión de 2-OST de tipo mutante

10 Con el fin de construir un plásmido de expresión de 2-OST de tipo mutante, utilizando cebadores (SEC ID nº: 37 a 64) correspondientes a diversos tipos mutantes, se llevó a cabo PCR utilizando pMAL-MBP\*\*2-OST (Y94A) como molde. En la tabla 3 se muestra una relación entre cada mutación y cebador. Después de digerir el producto de PCR obtenido con DpnI, se transformó la cepa de *Escherichia coli* JM109 con el líquido de reacción y se aplicó en un medio de agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, seguido por cultivo durante la noche a 37 °C. Se extrajo el plásmido de una colonia de los microorganismos transformados hechos crecer según un método conocido. La secuencia de nucleótidos se confirmó con el analizador genético 3100 (fabricado por Applied Biosystems), obteniendo de ese modo los plásmidos pC2-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, presentando cada uno una estructura objetivo. Se llevó a cabo PCR con pC2-3 como molde de la misma manera, construyendo de ese modo pC2-22, 25, 26, 27 y 28. Las relaciones entre cada mutación, cebador y plásmido se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

SEC ID nº	Secuencia (5'→3')	Mutación	Plásmido	Cepa
37	gtttatgaattgccaagaacagtttcag	Y94A	pC2-2	C2-2
38	ctgaaactgtctttggcaaatcataaaac	L321K		
39	gtttatgaattgcccgtgaacagtttcag	Y94A	pC2-3	C2-3
40	ctgaaactgttcacgggcaaatcataaaac	L321R		
41	gatggtgatctgatgaactggcccagaacttc	Y94A	pC2-4	C2-4
42	gaagttctgggcccagttcagatcaccatc	I341E		
43	gatggtgatctgatgatctggcccagaacttc	Y94A	pC2-5	C2-5
44	gaagttctgggcccagatcagatcaccatc	I341D		
45	cgtgcacatgcaaaactgaaaaagatgg	Y94A	pC2-7	C2-7
46	ccatcttttcacgttttcatgtgacag	V332K		
47	cgaccaaacagaccgaagcaaaactgcagcag	Y94A	pC2-8	C2-8
48	ctgctgcagtttgcctcgtctgtttggtcg	I301E		
49	cagcagagcgatattgcgaaaatggaaaacgag	Y94A	pC2-10	C2-10
50	ctcgtttccatttgcgaatatcgctctgctg	W310A		
51	cagcagagcgatattaacaaaatggaaaacgag	Y94A	pC2-11	C2-11
52	ctcgtttccatttgttaatatcgctctgctg	W310N		
53	aatggaaaacgagttgctgaattgccc	Y94A	pC2-12	C2-12
54	gggcaaatcagcaaaactcgtttccatt	Y317A		
55	ccgaagggtgtagcgaatgtgcaccggaaaaac	Y94A	pC2-22	C2-22
56	gttttccggtgcacattcgtaccacctcgg	L321R D208E		
57	ctggtgggtgctggaagaactggaag	Y94A	pC2-25	C2-25
58	cttcagttctccagcacaccaccag	L321R T254L		
59	gatattggaaaatggaatcagagtttatgaattg	Y94A	pC2-26	C2-26
60	caaatcataaaactcgtattccattttccaaatc	L321R N314Y		
61	gatattggaaaatggaacgagtttatgaattg	Y94A	pC2-27	C2-27
62	caaatcataaaactcgcgttccattttccaaatc	L321R N314R		
63	gatattggaaaatggaaaaagagtttatgaattg	Y94A	pC2-28	C2-28
64	caaatcataaaactcttttccattttccaaatc	L321R N314K		

20 (3) Construcción de la cepa de expresión

25 Se transformó una cepa de *Escherichia coli* Origami B (DE3) (Novagen) con el plásmido de expresión de chaperoninas pGro7 (TaKaRa), construyendo de ese modo *Escherichia coli* Origami B (DE3)/pGro7. Esta se transformó con los plásmidos pC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 tal como se interpreta en los anteriores (1) y (2), respectivamente, obteniendo de ese modo las cepas C2-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28.

30 **Ejemplo 3: expresión de 2-OST y preparación de extracto libre de células**

La cepa obtenida en el ejemplo 2 se inoculó en un medio LB que presentaba 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de cloranfenicol añadidos al mismo y se curó previamente durante la noche a 37 °C. Después de eso, el caldo de cultivo se inoculó en 100 ml de un medio (LB + glicerol) que presentaba 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml de cloranfenicol añadidos al mismo contenido en un matraz Sakaguchi de 500 ml de volumen de manera que la concentración final era de 1 %. Se realizó el cultivo en agitación a 37 °C hasta que la DO660 era de 0.5 a 0.7. A continuación, se añadieron IPTG (Nacalai Tesque, Inc.) en una concentración final de 0.5 mM y L-arabinosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una concentración final de 0.2 %, y el resultante se cultivó adicionalmente durante la noche a 22 °C.

Después de centrifugar el caldo de cultivo, se recuperó la célula bacteriana, se lavó una vez con un tampón-2 (20 mM de Tris-HCl (pH: 7.5), 200 mM de NaCl y el 15 % de glicerol), y luego se suspendió en el tampón-2 en una cantidad de 1/10 del caldo de cultivo. Posteriormente, la célula bacteriana se sometió a ultrasonidos con Bioruptor (Sonic Bio Co., Ltd.), y después de la centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos, se obtuvo un sobrenadante como extracto libre de células.

#### Ejemplo 4: análisis estructural de orden superior y medición de la razón de activador (trímero) mediante fraccionamiento del peso molecular

Se inyectaron 0.5 ml del extracto libre de células obtenido en el ejemplo 3 en una columna Superose 6 Increase 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con el tampón-2 de antemano y se sometió a fraccionamiento del peso molecular a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min. Los líquidos permeados después de 0.2 veces el volumen de la columna se recogieron en una placa de 98 pocillos en 0.4 ml por pocillo. Como patrones de peso molecular, se utilizaron un patrón de filtración en gel (Bio-Rad, nº 151-1901) y un marcador de peso molecular (HPLC) (Oriental Yeast Co., Ltd., nº 46804000).

A 10 µl de cada fracción, se le añadieron 2 µl de un tampón de muestra (para SDS-PAGE, concentrado 6 veces, que contiene un agente reductor) (Nacalai Tesque, Inc.), y los contenidos se desnaturalizaron térmicamente a 95 °C durante 5 minutos. La cantidad total se sometió a SDS-PAGE utilizando de 4 a 20 % de un gel prefabricado Criterion (marca comercial registrada), TGX (marca comercial registrada), y se tiñó el gel con Bullet CBB Stain One (listo para utilizar) (Nacalai Tesque, Inc.). Originalmente, 2-OST forma un trímero como activador, y el trímero se eluye en las proximidades de la fracción 29ª (fracción C3); sin embargo, se estimó que asimismo se eluye un lote de 2-OST en una fracción que presenta un corte de peso molecular estimado más grande que el trímero, formando un polímero. Luego, se capturó el generador de imágenes teñido en el instrumento Amersham Imager 600 (GE Healthcare), y se analizaron las intensidades de banda de 2-OST en la 9ª fracción (A9) en la que se cortó 2-OST que muestra el peso molecular del polímero y 2-OST en la 29ª fracción (C3) en la que se cortó 2-OST que muestra el peso molecular del trímero con el instrumento Image QuantTL (GE Healthcare). A partir de los resultados del análisis de cada intensidad de banda, se calculó  $[(\text{intensidad de banda de la fracción C3})/(\text{intensidad de banda de la fracción A9}) \times 100]$  y se definió como un índice que expresa la porción en la que está contenido el activador.

Los resultados del cálculo de una tasa de activador del extracto libre de células preparado a partir de las diversas cepas de expresión mutantes se muestran en la tabla 4. Resulta evidente que el índice de tasa de activador mejora por la introducción de la mutación de L321R.

Tabla 4: índice de tasa de activador

Cepa	Mutación	Tasa de activador (fracción C3/A9 × 100)
C2-1	Y94A	32.3
C2-2	Y94A/L321K	38.1
C2-3	Y94A/L321R	66.4
C2-4	Y94A/I341E	16.3
C2-5	Y94A/I341D	25.4
C2-7	Y94A/V323K	16.0
C2-8	Y94A/I301E	13.2
C2-10	Y94A/W310A	20.2
C2-11	Y94A/W310N	4.5
C2-12	Y94A/Y317A	7.1
C2-22	Y94A/L321R/D208E	65.7
C2-25	Y94A/L321R/T254L	67.0

#### Ejemplo 5: reacción de 2-O-sulfatación con extracto libre de células

##### (1) Reacción de 2-O-sulfatación

La reacción se llevó a cabo utilizando, como sustrato, el heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado

5 preparado en el ejemplo 1. Al líquido de reacción (2 mg/ml de heparosano N-sulfatado, epimerizado y despolimerizado, 0.6 mM de 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato y 50 mM de MES (pH 7.0)), se le añadió un 1.9 % de cada extracto libre de células, se realizó una reacción a 37 °C durante 30 minutos y se mezcló el resultante con dos veces la cantidad de disolución acuosa de ácido cítrico 2.0 M, seguido por la realización de un tratamiento térmico a 95 °C durante 15 minutos, deteniendo de ese modo la reacción. Como control negativo, se llevó a cabo una reacción enzimática en una condición en la que se añadió el tampón-2 al líquido de reacción en lugar del extracto libre de células.

10 Se cuantificó la tasa de 2-O-sulfatación a través del análisis de la composición de disacáridos. La tasa de 2-O-sulfatación se calculó a partir de una razón de IdoA-GlcN(NS) y IdoA2S-GlcN(NS) tal como se determina mediante análisis de HPLC, y se determinó un valor obtenido restando la tasa de 2-O-sulfatación del control negativo de la respectiva tasa de 2-O-sulfatación como una proporción convertida en la reacción de 2-O-sulfatación. La cantidad convertida de sustancia se calculó a partir del peso molecular, 415.8 de IdoA-GlcNS que es una unidad de disacárido. Una unidad de enzima (U) se definió como la cantidad de enzima para producir 1 µmol de IdoA(2S)-Glc(NS) durante un minuto en la condición descrita anteriormente. En el ejemplo 4, mientras que la razón del activador (trímero) en el extracto libre de células mejoró aproximadamente dos veces debido a la introducción de la mutación L321R, y se esperaba una mejora de la actividad, tal como se estima a partir de la tasa de activador, la actividad de 2-O-sulfatación mejoró en gran medida desde 135 U/ml hasta 330 U/ml debido a la introducción de la mutación de L321R (tabla 5).

20 Tabla 5: actividad de 2-O-sulfatación del mutante L321R

Cepa	Mutación	Actividad específica (U/ml)
C2-1	Y94A	135
C2-3	Y94A/L321R	330

25 (2) Cuantificación de la tasa de conversión (análisis de la composición de disacáridos)

La cuantificación de la tasa de conversión (tasa de 2-O-sulfatación y tasa de 3-O-sulfatación) se llevó a cabo a través del análisis de la composición de disacáridos mediante degradación con ácido nitroso.

30 <Reactivo>

NaNO<sub>2</sub> (n° CAS: 7632-00-0, MW: 69.01)

Ácido cítrico (n° CAS: 77-92-9, MW: 192.1)

35 2,4-Dinitrofenilhidrazina (n° CAS: 119-26-6, MW: 198.1), que contiene un 50 % de agua (abreviatura: DNPH)

Heparina (fabricada por Aldrich)

40 <Líquido de prueba>

Disolución patrón de heparina: 1 mg/ml

Disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub>: disolución de 49.5 mg del reactivo disuelto en 1 ml de H<sub>2</sub>O

45 Disolución acuosa de ácido cítrico: disolución de 384.2 mg del reactivo disuelto en 1 ml de H<sub>2</sub>O

Disolución acuosa de DNPH: disolución de 20.4 mg del reactivo (que contiene un 50 % de agua) disuelto en 1 ml de acetonitrilo

50 <Condición de análisis de LC-MS>

<Condición de LC>

55 Columna: ODS Z-CLUE 3 µm (fabricada por Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.) 2.0 mm × 250 mm

Temperatura de la caja de la columna: 50 °C

Velocidad de flujo de la disolución de elución: 0.3 ml/min

60 Detección: UV 365 nm

Cantidad de inyección: 5 µl

Composición de la disolución de elución:

Disolución A: HCOONH<sub>4</sub> 50 mM (pH: 4.5)

5 Disolución B: MeCN

Tabla 6: condición de gradiente de LC

Tiempo (min)	Disolución A (%)	Disolución B (%)
0.0	90	10
13.0	80	20
27.0	20	80
27.1	90	10
40.0	90	10

10 <Condición de MS>

Método de ionización: ionización por electropulverización (ESI (+/-))

Temperatura de DL: 250 °C

15

Bloque térmico: 250 °C

Velocidad de flujo del gas nebulizador: 1.5 l/min

20

Velocidad de flujo del gas seco: 15 l/min

Tabla 7: información referente a MS

Derivado de disacárido (que muestra la estructura antes de la degradación con ácido nítrico)	m/z (-)	Tiempo de retención relativo (min)
GlcA-GlcN(NS3S6S)	677	0.83
GlcA(2S)-GlcN(NS6S)		0.97
IdoA(2S)-GlcN(NS6S)		1
GlcA-GlcN(NS6S)	597	1.35
GlcA(2S)-GlcN(NS)		1.41
IdoA(2S)-GlcN(NS)		1.50
GlcA-GlcN(NS)	517	1.73
IdoA-GlcN(NS)		1.89

25 <Procedimientos de análisis y resultados>

En un microtubo de 1.5 ml (Eppendorf), se añadieron sucesivamente 10 µl de la disolución patrón de heparina o disolución de prueba, 20 µl de la disolución acuosa de tampón de ácido cítrico y 10 µl de la disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub>, y se agitó la disolución mezclada (a 1,000 rpm) a 65 °C durante 2 horas, obteniendo de ese modo un líquido degradado con ácido nítrico. A 40 µl del líquido degradado con ácido nítrico obtenido, se le añadieron 20 µl de la disolución de DNPH, y se agitaron los contenidos (a 1,000 rpm) a 45 °C durante 2 horas, obteniendo de ese modo un líquido derivatizado. Se analizó la composición del líquido derivatizado mediante LC-MS. A partir de un pico de IdoA(2S)-GlcN(NS6S) obtenido analizando la disolución patrón de heparina, se calculó un factor de conversión (pureza de área de (1 mg × IdoA(2S)-GlcN(NS6S))/(valor de área de IdoA(2S)-GlcN(NS6S))), y se determinó la concentración de cada derivado de disacárido en la disolución de prueba a partir del valor de área del mismo. En la tabla 3 se muestran la estructura de disacárido calculada y su proporción. En la tabla, se omite cualquier dato referente a picos no identificados que se considera que contienen un derivado de disacárido que presenta el grupo N-acetilo, etc., y la cantidad total de GlcA(2S)-GlcN(NS), IdoA(2S)-GlcN(NS), GlcA-GlcN(NS) y IdoA-GlcN(NS) se definió como 100 %.

40

#### Ejemplo 6: preparación de heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado

##### (1) 6-O-Sulfatación de heparosano N-sulfatado y despolimerizado

45 <Reacción antes de la purificación>

Se centrifugaron 30 ml del heparosano N-sulfatado y despolimerizado obtenido en el ejemplo 1(5) (a 7000G durante 30 minutos), y se filtró su sobrenadante con un filtro de 0.45 µm. Se cargaron 27.3 g del filtrado en 15 g de una resina de intercambio aniónico débil (DIAION, WA-30, fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation; ajustada

previamente a un pH de 5.5 con 25.6 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con la que se rellenó una columna de Pharmacia (número de modelo: XK26) para adsorber componentes de polisacárido, y se hicieron pasar 480 ml de un líquido de lavado (0.5 M de NaCl + 25.6 mM de NaH<sub>2</sub>PCO<sub>4</sub> (pH 5.5)) a su través (velocidad de flujo: 6.4 ml/min). Posteriormente, se hicieron pasar 230 ml de una disolución de elución (2 M de NaCl + 25.6 mM de NaH<sub>2</sub>PCO<sub>4</sub> (pH 5.5)) a través del resultante (velocidad de flujo: 6.4 ml/min), obteniendo de ese modo una disolución de elución que contenía componentes de polisacárido. La disolución de elución obtenida se cargó en un instrumento Amicon-3K (fabricado por Merck Millipore) y se centrifugó (a 4,000 G). Se añadieron adicionalmente 100 ml de agua al líquido concentrado obtenido, y se realizó de nuevo centrifugación. Esta operación de lavado se llevó a cabo tres veces, obteniendo de ese modo 11 g de un líquido concentrado lavado.

<Intercambio iónico>

Se hicieron pasar 11 g del líquido concentrado lavado a través de 3 ml de una resina de intercambio catiónico fuerte (DIAION, UBK550, fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation; previamente convertida en un tipo H con ácido clorhídrico 1 M) (pH 2.25), y entonces se añadieron 1.8 ml de un líquido mixto de 2.36 mg de tributilamina y 10 µl de etanol para realizar la neutralización (pH 8.36). El líquido neutralizado obtenido se secó por congelación.

<Reacción de 6-O-sulfatación>

A la cantidad total del material secado por congelación, se le añadieron 1.92 ml de DMF y 76.4 mg (0.48 mmol) de un aducto de trióxido de azufre y piridina bajo una corriente de gas argón, y se agitaron los contenidos a -10 °C durante 48 horas. Al líquido de reacción, se le añadieron 2.8 ml de una disolución acuosa de acetato de sodio 5 M y 31 ml de agua, y se agitaron los contenidos a temperatura ambiente durante una hora, deteniendo de ese modo la reacción. El líquido de detención de la reacción se filtró con un filtro de 0.2 µm, y se cargó el filtrado en un instrumento Amicon-3K (fabricado por Merck Millipore) y se centrifugó (a 4,000 G). Se añadieron adicionalmente 20 ml de agua al líquido concentrado obtenido, y se realizó de nuevo centrifugación. Esta operación de lavado se llevó a cabo dos veces, obteniendo de ese modo 3.92 g de un líquido concentrado lavado. Se tomaron muestras del líquido concentrado lavado obtenido y se sometieron a análisis de la composición de disacáridos a través de degradación con ácido nítrico en los mismos procedimientos que en el ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que estaban contenidos 76.5 mg del producto de reacción, heparosano N-sulfatado, 6-O-sulfatado y despolimerizado en cuanto a una cantidad de la unidad de disacárido en 3.92 g del líquido concentrado lavado.

**Ejemplo 7 (que no pertenece al alcance de la presente invención): construcción de una cepa de expresión de la enzima de 3-O-sulfatación (3-OST-1)**

(1) Construcción de pETDuet-3-OST-1

Se obtuvo una secuencia de aminoácidos de 3-OST derivada de ratón-1 (ID de proteína de NCBI: NP\_034604; SEC ID n°: 8) de la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Se sintetizó un fragmento de ADN que contenía una secuencia de bases (SEC ID n°: 9) que codifica un sitio catalítico de la 3-OST-1 (Gly48-His311; SEC ID n°: 10) optimizada de conformidad con la utilización de codones de *Escherichia coli* mediante referencia al informe previo (Edavettal S.C., et al., *J Bio Chem.*, 2004; 279(24) 25789-97). El fragmento de ADN obtenido se insertó en un sitio EcoRI-Sall de un vector pETDuet-1 (Novagen), construyendo de ese modo un plásmido de expresión de 3-OST-1, pETDuet-3-OST-1. Según este plásmido de expresión, se expresa 3-OST-1 en la que se añade la etiqueta His al lado N-terminal y, por tanto, se hace posible purificar la 3-OST-1 mediante la etiqueta His.

(2) Construcción del plásmido de expresión de 3-OST-1 de tipo mutante

Con el fin de construir un plásmido de expresión de 3-OST-1 de tipo mutante, utilizando cebadores (SEC ID n°: 65 a 138) correspondientes a diversos tipos mutantes, se llevó a cabo PCR utilizando pETDuet-3-OST-1 como molde. En la tabla 6 se muestra una relación entre cada mutación y cebador. Después de digerir el producto de PCR obtenido con DpnI, se transformó una cepa de *Escherichia coli* JM109 con el líquido de reacción y se aplicó en un medio de agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, seguido por cultivo durante la noche a 37 °C. Se extrajo el plásmido de una colonia de los microorganismos transformados hechos crecer según un método conocido. La secuencia de nucleótidos se confirmó con un analizador genético 3100 (fabricado por Applied Biosystems), obteniendo de ese modo los plásmidos pET3OST#1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, presentando cada uno una estructura objetivo. Las relaciones entre cada mutación, cebador y plásmido se muestran en las tablas 8-1 y 8-2.

Tabla 8-1

SEC ID n°	Secuencia (5'→3')	Mutación	Plásmido	Cepa
65	cgggtgttcgtaaacatggcaccctgcactg	G69H	pET3OST #1	3OS-1
66	cagtgcacgggtgccatgtttacgaacaccg			
67	gtgcactgctggaaaaactgagcctgcaccc	M77K	pET3OST #3	3OS-3

ES 2 992 871 T3

68	ggatgcaggctcagttttcagcagtgac			
69	gtgactgctggaatacctgagcctgcatcc	M77Y	pET3OST #4	3OS-4
70	ggatgcaggctcaggtattccagcagtgac			
71	ctgaccgttgaaaacgtccggcatatttcac	T124R	pET3OST #5	3OS-5
72	gtgaaatatgccggacgttttcaacggtcag			
73	ctgaccgttgaaaacacccggcatatttcac	T124H	pET3OST #6	3OS-6
74	gtgaaatatgccgggtgttttcaacggtcag			
75	ctgaccgttgaaaaaacccggcatatttcac	T124K	pET3OST #7	3OS-7
76	gtgaaatatgccgggtttttcaacggtcag			
77	gcgattataccagcgtctgtataatcatctg	V164R	pET3OST #8	3OS-8
78	cagatgattatacagacgctgggtataatcgc			
79	cccaggttctgtatcatcatctgcagaaac	N167H	pET3OST #9	3OS-9
80	gtttctgcagatgatgatacagaacctggg			
81	ccgttgaaaaaacagcggcatatttcaccag	P125A	pET3OST #10	3OS-10
82	ctggtgaaatatgccgctgttttcaacgg			
83	cccaggttctgtataaacatctgcagaaac	N167K	pET3OST #11	3OS-11
84	gtttctgcagatgtttatacagaacctggg			
85	cccgtgcactgctgcagatgctgagcctgc	E76Q	pET3OST #12	3OS-12
86	gcaggctcagcatctgcagcagtgacggg			
87	cccgtgcactgctgaacatgctgagcctgc	E76N	pET3OST #13	3OS-13
88	gcaggctcagcatgttcagcagtgacggg			
89	gttcagcagcagaacatgaagtgcatttttg	N89H	pET3OST #14	3OS-14
90	caaaaaatgcactcatgttctgctgcaac			
91	gtgcatttttgattcgaggacattatag	W96F	pET3OST #16	3OS-16
92	ctataatgttctcgaatcaaaaaatgcac			
93	gtataatcatctgcagcagcataaacctgatcc	K171Q	pET3OST #17	3OS-17
94	ggatacggttatgctgctgcagatgattatac			
95	gtataatcatctgcagaaccataaacctgatcc	K171N	pET3OST #18	3OS-18
96	ggatacggttatggttctgcagatgattatac			
97	caaaaccaaaggctcttttgcctgctgatag	Y259F	pET3OST #19	3OS-19
98	ctatcacgcaggcaaaagaagcctttggtttg			
99	gcgattataccagattctgtataatcatctg	V164I	pET3OST #20	3OS-20
100	cagatgattatacagaatctgggtataatcgc			
101	gatggtgatcgtctggtctgatccgtttcc	I225V	pET3OST #21	3OS-21
102	ggaacggatcacgaaccagacgatccatc			

Tabla 8-2

SEC ID nº	Secuencia (5'→3')	Mutación	Plásmido	Cepa
103	gtcgaatctggatttaaagcactgaatcg	Y192F	pET3OST #23	3OS-23
104	cgattcagtgcttaaaatccagattcagac			
105	ccattattatcggatttcgtaaagggtggcac	V66I	pET3OST #24	3OS-24
106	gtgccaccttacgaataccgataataatgg			
107	cattgcctgctgctggttctgctgatccgag	I149V	pET3OST #25	3OS-25
108	ctcggatcacgcagaaccagcagcaggcgaatg			
109	cagaaacataaacggttccgctattgaag	Y175F	pET3OST #26	3OS-26
110	ctcaataggcggaaacggttatgtttctg			
111	gattataccaggttctgttaatcatctgcagaaac	Y166F	pET3OST #27	3OS-27
112	gtttctgcagatgataaacagaacctgggtataatc			
113	gaaaaaacaccggcattttcaccagcccgaag	Y127F	pET3OST #28	3OS-28
114	cttcgggctggtgaaaaatgccgggtgttttc			
115	gtgttctgagcagtttaccaggttctg	Y161F	pET3OST #29	3OS-29
116	cagaacctgggtaaaatcgtcagaacac			
117	gattaatgccagcaactactatttaacaaaac	F250Y	pET3OST #30	3OS-30
118	gtttgttaaaatagtagttgctggcattaatc			
119	gtgcactgctggaactgctgagcctgcatcc	M77L	pET3OST #31	3OS-31
120	ggatgcaggctcagcagttccagcagtgac			
121	ctatttaacaaaacccgtggttctattgcctg	K256R	pET3OST #32	3OS-32
122	caggcaatagaagccacgggtttgttaaaatag			
123	gatggtgatcgtctgctgctgatccgtttcc	I225L	pET3OST #33	3OS-33
124	ggaacggatcacgcagcagacgatccatc			
125	ctgaatctggattatcgtgcactgaaatcgtg	K193R	pET3OST #34	3OS-34
126	ctacgattcagtcacgataatccagattcag			



$$\text{Tasa de 3-O-sulfatación (\%)} = \frac{\text{GlcA-Glc(NS}_3\text{S}_6\text{S)}}{\text{GlcA-Glc(NS}_3\text{S}_6\text{S)} + \text{GlcA-Glc(NS}_6\text{S)}} \times 100 \quad (1)$$

**(3) Evaluación de la actividad de 3-OST-1 de tipo mutante**

- 5 La actividad de 3-OST se calculó basándose en la tasa de 3-O-sulfatación determinada en el ejemplo 9(2). La cantidad de enzima para producir 1  $\mu\text{mol}$  de una unidad de disacárido 3-O-sulfatado GlcA-GlcNS3S6S (peso molecular 593) durante un minuto se definió como 1 U. Cuando se define la actividad enzimática de 3-OST-1 de tipo natural como 1, la actividad relativa de 3-OST de tipo mutante se muestra en la tabla 9. Como resultado de la evaluación de la actividad, ha resultado evidente que, mediante la introducción de la mutación de cada una de
- 10 M77K, P125A y V164I, la actividad de 3-OST mejora.

Tabla 9

Cepa	Mutación	Actividad relativa cuando se define la actividad enzimática de 3-OST-1 de tipo natural como 1
3-OS-WT	-	1.00
3OS-1	G69H	0.38
3OS-3	M77K	1.82
3OS-4	M77Y	0.90
3OS-5	T124R	0.32
3OS-6	T124H	0.43
3OS-7	T124K	0.24
3OS-8	V164R	1.02
3OS-9	N167H	1.32
3OS-10	P125A	1.74
3OS-11	N167K	0.35
3OS-12	E76Q	0.58
3OS-13	E76N	0.36
3OS-14	N89H	0.79
3OS-16	W96F	1.20
3OS-17	K171Q	1.21
3OS-18	K171N	0.95
3OS-19	Y259F	1.15
3OS-20	V164I	1.97
3OS-21	I225V	0.73
3OS-23	Y192F	0.52
3OS-24	V66I	0.26
3OS-25	I149V	0.99
3OS-26	Y175F	0.59
3OS-27	Y166F	0.76
3OS-28	Y127F	0.28
3OS-29	Y161F	0.30
3OS-30	F250Y	0.45
3OS-31	M77L	0.30
3OS-32	K256R	0.65
3OS-33	I225L	0.45
3OS-34	K193R	0.71
3OS-35	I149L	0.26
3OS-36	D160E	0.26
3OS-37	E88D	0.79
3OS-38	E155D	0.88
3OS-39	E272D	0.18
3OS-40	E76D	0.24

**15 Texto libre de listado de secuencias**

SEC ID n°: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino.

## ES 2 992 871 T3

- SEC ID nº: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino.
- 5 SEC ID nº: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de los sitios catalíticos (Asp69-Asn356) de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino.
- SEC ID nº: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino que presenta la mutación Y94A.
- 10 SEC ID nº: 5 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica los sitios catalíticos (Asp69-Asn356) de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino que presenta la mutación Y94A, optimizada de conformidad con la utilización de codones en *Escherichia coli*.
- SEC ID nº: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de los sitios catalíticos (Asp69-Asn356) de la enzima de 2-O-sulfatación (2-OST) derivada de hámster chino que presenta la mutación Y94A.
- 15 SEC ID nº: 7 muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica la enzima de 3-O-sulfatación (3-OST-1) derivada de ratón.
- SEC ID nº: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la enzima de 3-O-sulfatación (3-OST-1) derivada de ratón.
- 20 SEC ID nº: 9 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica los sitios catalíticos (Gly48-His311) de la enzima de 3-O-sulfatación (3-OST-1) derivada de ratón, optimizada de conformidad con la utilización de codones en *Escherichia coli*.
- 25 SEC ID nº: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de los sitios catalíticos (Gly48-His311) de la enzima de 3-O-sulfatación (3-OST-1) derivada de ratón.
- SEC ID nº: 11 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P1.
- 30 SEC ID nº: 12 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P2.
- SEC ID nº: 13 muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos del fragmento de Pael-Sall del promotor Pnlp0.
- 35 SEC ID nº: 14 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P3.
- SEC ID nº: 15 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P4.
- 40 SEC ID nº: 16 muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN que contiene aproximadamente 300 pb de la región terminadora del gen rrnB.
- SEC ID nº: 17 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P5.
- 45 SEC ID nº: 18 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P6.
- SEC ID nº: 19 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P7.
- 50 SEC ID nº: 20 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador P8.
- SEC ID nº: 21 muestra la secuencia de nucleótidos del gen hepC clonado en el ejemplo 1.
- SEC ID nº: 22 muestra la secuencia de aminoácidos de heparinasa III (HepC) que codifica la secuencia de nucleótidos de SEC ID: NO 21.
- 55 SEC ID nº: 23 muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pMAL-c2x.
- SEC ID nº: 24 y 25 muestran secuencias de nucleótidos de cebadores utilizados para preparar MBP\* en el ejemplo 1.
- 60 SEC ID nº: 26 muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pMAL-MBP\*.
- SEC ID nº: 27 y 28 muestran secuencias de nucleótidos de cebadores utilizados para obtener el fragmento de ADN de pMAL-MBP\* en el ejemplo 1.
- 65

## ES 2 992 871 T3

SEC ID nº: 29 y 30 muestran la secuencia de nucleótidos de cebadores utilizados para obtener un fragmento de D-glucuronil C5-epimerasa derivada de pez cebra en el ejemplo 1.

5 SEC ID nº: 31 muestra la secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica secuencias de aminoácidos parciales (Gly70-Asn585) de D-glucuronil C5-epimerasa derivada de pez cebra.

SEC ID nº: 32 muestra secuencias de aminoácidos parciales (Gly70-Asn585) de D-glucuronil C5-epimerasa derivada de pez cebra.

10 SEC ID nº: 33 a 138 muestran secuencias de nucleótidos de cebadores.

REIVINDICACIONES

1. Mutante de enzima de 2-O-sulfatación, que presenta una sustitución de un residuo de leucina en la posición 321 con un residuo de aminoácido básico en una secuencia de aminoácidos cualquiera de:
- 5
- (a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2;
  - (b) una secuencia de aminoácidos que comprende una a treinta sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o
  - 10 (c) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 90 % o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o
  - (d) la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2;
  - 15 (e) una secuencia de aminoácidos que comprende una a veinte sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o
  - 20 (f) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 90 % o más respecto a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 69 a 356 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; y
  - 25 que presenta una actividad de transferencia de 2-O-sulfato.
2. Mutante de enzima de 2-O-sulfatación según la reivindicación 1, en el que el residuo de aminoácido básico es un residuo de arginina o un residuo de lisina.
- 30
3. Método de producción de un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico, que comprende convertir un compuesto de heparosano en un compuesto de heparosano modificado en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico en presencia de un mutante de enzima de 2-O-sulfatación,
- 35 en el que el mutante de enzima de 2-O-sulfatación es el mutante de enzima de 2-O-sulfatación según la reivindicación 1 o 2.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el compuesto de heparosano es heparosano N-sulfatado, heparosano N-sulfatado epimerizado, heparosano N-sulfatado despolimerizado o heparosano N-sulfatado epimerizado despolimerizado.
- 40
5. Método según la reivindicación 3 o 4, en el que el compuesto de heparosano en el que se sulfata un grupo hidroxilo en la posición 2 de un residuo de ácido hexurónico se produce en presencia de un microorganismo transformado que produce el mutante de enzima de 2-O-sulfatación, o un extracto del mismo.
- 45
6. Método según la reivindicación 5, en el que el microorganismo transformado es una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.
- 50
7. Método según la reivindicación 6, en el que la bacteria que pertenece al género *Escherichia* es la *Escherichia coli*.
8. Método de producción de un heparán sulfato, que comprende someter el heparosano a un tratamiento que comprende (1) N-desacetilación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (2) despolimerización, (3) N-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina, (4) C5-epimerización de un residuo de ácido hexurónico, (5) 2-O-sulfatación de un residuo de ácido hexurónico, (6) 6-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina y (7) 3-O-sulfatación de un residuo de  $\alpha$ -D-glucosamina para producir un heparán sulfato,
- 55 en el que la 2-O-sulfatación del residuo de ácido hexurónico se realiza en presencia del mutante de enzima de 2-O-sulfatación según la reivindicación 1 o 2.
- 60

FIG. 1

