



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 393**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A23J 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03766005 .7**

96 Fecha de presentación : **23.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1539989**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Síntesis de oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas usando glicosiltransferasas bacterianas.**

30 Prioridad: **23.07.2002 US 398156 P**
08.11.2002 US 424894 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.10.2011

73 Titular/es: **BIOGENERIX AG.**
Janderstrasse 3
68199 Mannheim, ES
The Governors of the University of Alberta

72 Inventor/es: **Johnson, Karl, F.;**
Bezila, Daniel, James;
Simala-Grant, Joanne;
Taylor, Diane y
Rasko, David

74 Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 365 393 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

Síntesis de oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas usando glicosiltransferasas bacterianas

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de fucosiltransferasas de *Helicobacter pylori*. La invención proporciona también métodos para usar las fucosiltransferasas con el fin de sintetizar oligosacáridos, glicoproteínas, y glicolípidos.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Aunque en los últimos años se han realizado avances significativos en la química de carbohidratos, existen todavía dificultades sustanciales asociadas a la síntesis química de glicoconjugados, particularmente con la formación del enlace β -1,2-cis-manósido ubicuo que se encuentra en oligosacáridos de mamíferos. Por otra parte, en cada etapa de la síntesis *de novo* de un carbohidrato deben resolverse obstáculos regio- y estereo-químicos.

15

[0003] A la vista de las dificultades asociadas a la síntesis química de glicoconjugados, el uso de glicosiltransferasas para sintetizar enzimáticamente glicoproteínas y glicolípidos, que tengan fracciones de oligosacáridos deseadas, es un planteamiento prometedor para preparar dichos glicoconjugados. Las síntesis basadas en enzimas tienen las ventajas de la regioselectividad y la estereoselectividad y se pueden llevar a cabo usando sustratos no protegidos. Por otra parte, las glicosiltransferasas se han usado para modificar enzimáticamente fracciones de oligosacáridos y han demostrado ser muy eficaces para producir productos específicos con un buen control estereoquímico y regioquímico. Las glicosiltransferasas de interés incluyen fucosiltransferasas, sialiltransferasas, galactosiltransferasas, y N-acetilglucosaminiltransferasas. Para consultar una revisión general, véanse, Crout et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 98-111 (1998) y Arsequell, et al., *Tetrahedron: Assymetry* 10: 2839 (1997).

20

25

[0004] Muchas glicoproteínas y glicolípidos requieren la presencia de una glicofoma particular, o la ausencia de una glicofoma particular, con el fin de presentar una actividad biológica particular. Por ejemplo, muchas glicoproteínas y glicolípidos requieren la presencia de estructuras fucosiladas particulares para presentar actividad biológica. Los mecanismos de reconocimiento intercelular requieren frecuentemente un oligosacárido fucosilado. Por ejemplo, varias glicoproteínas que funcionan como moléculas de adhesión celular, incluyendo P-selectina, L-selectina, y E-selectina, se unen a estructuras de carbohidratos fucosiladas, específicas, de la superficie celular, tales como las estructuras de sialil Lewis-x y sialil Lewis-a. Adicionalmente, las estructuras de carbohidratos específicas que forman el sistema de grupos sanguíneos ABO están fucosiladas. Las estructuras de carbohidratos en cada uno de los tres grupos comparten una unidad Fuc α 1,2Gal β 1-disacárido. En estructuras del grupo sanguíneo O, este disacárido es la estructura terminal; mientras que la estructura del grupo sanguíneo A está formada por una α 1,3Gal1NAc transferasa que añade un residuo de GalNAc terminal al disacárido; y la estructura del grupo sanguíneo B está formada por una α 1,3 galactosiltransferasa que añade un residuo de galactosa terminal.

30

35

40

[0005] Las estructuras del grupo sanguíneo de Lewis se pueden someter también a fucosilación. Por ejemplo, las estructuras de Lewis-x y Lewis-a son respectivamente Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNac y Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNac. Ambas estructuras mencionadas se pueden además a sialilación (NeuAc α 2,3-) para formar las estructuras sialiladas correspondientes. Otras estructuras del grupo sanguíneo de Lewis de interés son las estructuras de Lewis-y y Lewis-b que son respectivamente Fuc α 1,2Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -OR y Fuc α 1,2Gal β 1,3(Fuc α 1,4)Glc-Nac-OR. Para obtener una descripción de las estructuras del ABO y las estructuras del grupo sanguíneo de Lewis y las enzimas involucradas en su síntesis, véanse, *Essentials of Glycobiology*, Varki et al. eds., Capítulo 16 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999).

45

50

[0006] Específicamente, se han usado fucosiltransferasas en rutas de síntesis para transferir un residuo de fucosa de guanosina-5'-difosfocosa a un hidroxilo específico de un aceptor sacárido. Se conoce una variedad de sustratos dadores y sustratos aceptores (véase Guo et al., *Applied Biochem. and Biotech.* 68: 1-20 (1997)). Por ejemplo, Ichikawa preparó sialil Lewis-x mediante un método que conlleva la fucosilación de lactosamina sialilada, con una fucosiltransferasa clonada (Ichikawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9283-9298 (1992)). Lowe ha descrito un método para expresar actividad de fucosilación no nativa en células, produciendo de este modo glicoproteínas fucosiladas en superficies celulares, etcétera (Patente U.S. No. 5.955.347).

55

[0007] De este modo, puesto que la actividad biológica de muchas glicoproteínas y glicolípidos producidos de manera recombinante y transgénica, comercialmente importantes, depende de la presencia de una glicofoma particular, o la ausencia de un glicofoma particular, existe una necesidad de un método eficaz para sintetizar enzimáticamente glicoconjugados que tengan las fracciones de oligosacáridos fucosiladas deseadas. Adicionalmente, existe una necesidad de producción eficaz de oligosacáridos fucosilados. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

60

Breve resumen de la invención

5 [0008] La presente invención proporciona proteínas y ácidos nucleicos de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*. Las proteínas α -1,3/4-fucosiltransferasa catalizan la transferencia de un residuo de fucosa desde un sustrato dador a un sustrato aceptor. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos de α -1,3/4-fucosiltransferasa con una secuencia de nucleótidos según la ID SEC N.º:1 que codifican proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa que transfieren fucosa a residuos de GlcNAc.

10 [0009] En otra realización, el ácido nucleico de α -1,3/4-fucosiltransferasa se presenta según la ID SEC N.º:1. La invención proporciona también secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa, que incluyen la ID SEC N.º:2, y que catalizan la transferencia de fucosa a un residuo de N-acetilglucosamina o a un residuo de glucosa. En un aspecto, la α -1,3/4-fucosiltransferasa codificada incluye también una etiqueta de aminoácidos.

15 [0010] En otra realización, la invención proporciona vectores de expresión que incluyen los ácidos nucleicos de α -1,3/4-fucosiltransferasa antes descritos, células hospedadoras que incluyen los vectores de expresión, y métodos para producir las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa usando las células hospedadoras cultivadas bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa.

20 [0011] En otra realización, la invención proporciona proteínas de fucosiltransferasa recombinantes que incluyen una secuencia de aminoácidos según la ID SEC N.º:2 en donde la fucosiltransferasa cataliza la transferencia de un residuo de fucosa desde un sustrato dador a N-acetilglucosamina. En un aspecto, las proteínas de fucosiltransferasa comprenden la ID SEC N.º:2. En otro aspecto, las proteínas de fucosiltransferasa incluyen también una etiqueta de aminoácidos.

25 [0012] La presente invención proporciona también métodos para usar la proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa anterior con el fin de producir oligosacáridos fucosilados. Los oligosacáridos fucosilados se pueden purificar adicionalmente. El sustrato aceptor puede ser N-acetilglucosamina. En una realización, el sustrato aceptor es Lacto-N-neo-Tetraosa (LNnT) y el producto fucosilado es Lacto-N-Fucopentaosa III (LNFP III). La α -1,3/4-fucosiltransferasa se puede usar en combinación con otras glicosiltransferasas para producir un oligosacárido fucosilado. Por ejemplo, usando lactosa como material de partida, se puede producir LNFP a través de la acción de una α -1,3/4-fucosiltransferasa que transfiere fucosa a N-acetilglucosamina, una β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa, y una β -1,4-galactosiltransferasa. La β -1,3-acetilglucosaminiltransferasa y la β -1,4-galactosiltransferasa pueden ser enzimas bacterianas y, en una realización preferida, son de *Neisseria gonococcus*.

35 [0013] En otra realización, la proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa de la presente invención se usa para producir glicolípidos fucosilados. El sustrato aceptor puede ser N-acetilglucosamina.

40 [0014] En otra realización, la presente invención proporciona un método para producir una glicoproteína fucosilada, combinando una α -1,3/4-fucosiltransferasa descrita en el presente documento con una glicoproteína que incluye un sustrato aceptor apropiado, bajo condiciones adecuadas para producir una glicoproteína fucosilada. El sustrato aceptor se puede seleccionar de entre Gal β 1-OR, Gal,3/4GlcNAc-OR, NeuAc α 2,3Gal β 1,3/4GlcNAc-OR, en donde R es un aminoácido, un sacárido, un oligosacárido, o un grupo aglicón que tiene por lo menos un átomo de carbono. El sustrato aceptor puede ser un residuo de N-acetilglucosamina. La α -1,3/4-fucosiltransferasa también puede incluir una etiqueta de aminoácidos.

Breve descripción de los dibujos

50 [0015] La figura 1 proporciona las secuencias de ácido nucleico (ID SEC N.º:1) y de aminoácidos (ID SEC N.º:2) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 1182B.

[0016] La figura 2 proporciona las secuencias de ácido nucleico (ID SEC N.º:3) y de aminoácidos (ID SEC N.º:4) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 1111A.

55 [0017] La figura 3 proporciona las secuencias de ácidos nucleicos (ID SEC N.º:5) y de aminoácidos (ID SEC N.º:6) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 1218B.

[0018] La figura 4 proporciona las secuencias de ácidos nucleicos (ID SEC N.º:7) y de aminoácidos (ID SEC N.º:8) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 19C2B.

60 [0019] La figura 5 proporciona las secuencias de ácido nucleico (ID SEC N.º:9) y de aminoácidos (ID SEC N.º:10) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 915A.

[0020] La figura 6 proporciona las secuencias de ácidos nucleicos (ID SEC N.º:11) y de aminoácidos (ID SEC N.º:12) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 26695A.

5 **[0021]** La figura 7 proporciona las secuencias de ácidos nucleicos (ID SEC N.º:13) y de aminoácidos (ID SEC N.º:14) de fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori*, 19C2A.

10 **[0022]** La figura 8 proporciona un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos 1182 futB (ID SEC N.º:15) y una secuencia consenso de la glicosiltransferasa familia 10 (ID SEC N.º:16), es decir, la familia de fucosiltransferasas. Los aminoácidos 23 a 305 de 1182 futB se muestran en la línea superior y representan la región más conservada de la proteína, es decir, el dominio catalítico de fucosiltransferasa.

15 **[0023]** La figura 9 proporciona un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos 1111 futA (ID SEC N.º:17) y una secuencia consenso de la glicosiltransferasa familia 10 (ID SEC N.º:18), es decir, la familia de fucosiltransferasas. Los aminoácidos 27 a 417 de 1182 futB se muestran en la línea superior y representan la región más conservada de la proteína, es decir, el dominio catalítico de fucosiltransferasa.

20 **[0024]** La figura 10 proporciona un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos 1218 futB (ID SEC N.º:19) y una secuencia consenso de la glicosiltransferasa familia 10 (ID SEC N.º:20), es decir, la familia de fucosiltransferasas. Los aminoácidos 23 a 399 de 1182 futB se muestran en la línea superior y representan la región más conservada de la proteína, es decir, el dominio catalítico de fucosiltransferasa.

25 **[0025]** La figura 11 proporciona un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos 19C2 futB (ID SEC N.º:21) y una secuencia consenso de la glicosiltransferasa familia 10 (ID SEC N.º:22), es decir, la familia de fucosiltransferasas. Los aminoácidos 23 a 377 de 1182 futB se muestran en la línea superior y representan la región más conservada de la proteína dada a conocer, es decir, el dominio catalítico de fucosiltransferasa.

30 **[0026]** La figura 12 proporciona un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de cepas de *H. pylori* 1182 FutB (ID SEC N.º:25), 1111 FutA (ID SEC N.º:23), 1218 FutB (ID SEC N.º:26), 19C2 FutB (ID SEC N.º:27), 915FutA (ID SEC N.º:10), 19C2 FutA (ID SEC N.º:14), y 26695 FutA (ID SEC N.º:24). La secuencia inferior es una secuencia consenso (ID SEC N.º:28 a 37).

35 **[0027]** La figura 13 proporciona un alineamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de cepas de *H. pylori* 1182 FutB (ID SEC N.º:1), 1111 FutA (ID SEC N.º:3), 1218 FutB (ID SEC N.º:5), 19C2 FutB (ID SEC N.º:7), 915FutA (ID SEC N.º:38), 19C2 FutA (ID SEC N.º:13), y 26695 FutA (ID SEC N.º:11). La secuencia inferior es una secuencia consenso (ID SEC N.º:39 a 74).

40 **[0028]** La figura 14 proporciona estructuras de oligosacáridos de Lacto-N-neo-Tetraosa (LNnT), un sustrato de las fucosiltransferasas de *H. pylori* y Lacto-N-Fucopentaosa III (LNFP III o LNFI), un producto de las fucosiltransferasas de *H. pylori*.

[0029] La figura 15 proporciona los resultados del análisis de la especificidad del aceptor para las fucosiltransferasas de *H. pylori*.

45 **[0030]** La figura 16 proporciona el rendimiento de la síntesis del LNFI usando las fucosiltransferasas de *H. pylori*. Se sometieron a prueba dos resinas de intercambio iónico: MR3 NH₄HCO₃ y la resina Dowex1/Dowex50.

50 **[0031]** La figura 17 prueba el uso de FutB α -1,3/4-fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 1182 para transferir fucosa a la glicoproteína asialiltransferina. El panel superior muestra el análisis GC/MS de transferrina sialilada. El panel inferior muestra el análisis GC/MS de transferrina sialilada que se ha asialilado enzimáticamente y a continuación fucosilado usando la FutB α -1,3/4-fucosiltransferasa de la cepa de *H. pylori* 1182. Explicación para las estructuras de azúcar: cuadrados rellenos-GlcNAc, círculos en blanco-manosa; rombos rellenos-galactosa; triángulos-fucosa; estrellas-ácido siálico.

Definiciones

55 **[0032]** A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen en general el mismo significado que el entendido comúnmente por aquellos con conocimientos habituales en la materia a la que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en el cultivo de células, la genética molecular, la química orgánica y la química y la hibridación de ácidos nucleicos, que se describen posteriormente, son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la materia. Para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos se usan técnicas convencionales. En general, se llevan a cabo reacciones enzimáticas y etapas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las técnicas y procedimientos se realizan en general según métodos convencionales en la materia y varias referencias generales (véase en general, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed.

(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que aparecen durante todo el documento presente. La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica, y síntesis orgánica, que se describen posteriormente, son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la materia. Para las síntesis químicas y los análisis químicos se usan técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas.

5

[0033] Los términos “ α -1,3/4-fucosiltransferasa o fucosiltransferasa” o un ácido nucleico que codifica una “ α -1,3/4-fucosiltransferasa o fucosiltransferasa” se refieren a ácidos nucleicos y polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico según la ID SEC N.º:1 ó una secuencia de aminoácidos de ID SEC N.º:2 ó tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene ID SEC N.º:1. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención incluyen moléculas tanto de origen natural como recombinantes.

10

[0034] Las enzimas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de la invención también se pueden reconocer por la presencia de dominios catalíticos altamente conservados que se encuentran en una familia de proteínas de fucosiltransferasa, glicosiltransferasa familia 10, véase, por ejemplo, gnl|CDD|16836 pfam00852, Glico_transf_10. En las figuras 8 a 11 se muestran alineamientos entre dominios catalíticos conservados de 1182 futB, 1111 futA, 1218 futB, y 19C2 futB y una secuencia consenso del dominio catalítico de miembros de la glicosiltransferasa familia 10.

15

[0035] Una fucosiltransferasa biológicamente activa según se describe en el presente documento es una fucosiltransferasa que cataliza la transferencia de fucosa desde un sustrato dador, por ejemplo, GDP-fucosa, a una molécula aceptora en un enlace α -1,3/4. La molécula aceptora puede ser o bien N-acetilglucosilamina (GlcNAc) o bien glucosa. Por ejemplo, fucosiltransferasas de las siguientes cepas de *H. pylori* transfieren fucosa a Glc-NAc: Cepa 915 FutA, Cepa 1111 FutA, Cepa 19C2 FutB, y Cepa 1182 FutB. El producto del gen FutA de la Cepa *H. pylori* 19C2 FutA transfiere fucosa a la glucosa reductora del aceptor de LNnT, tal como lo hacía el producto del gen FutB de la cepa *H. pylori* 1218, y una proteína de 26695 FutA novedosa. En realizaciones preferidas, la fucosiltransferasa transfiere fucosa exclusivamente a GlcNAc o exclusivamente a glucosa. La molécula aceptora puede ser un carbohidrato, un oligosacárido, un glicolípido, o una glicoproteína.

20

25

[0036] Las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* de la invención son útiles para transferir un sacárido desde un sustrato dador a un sustrato aceptor. La adición tiene lugar en general en el extremo no reductor de un oligosacárido o una fracción carbohidrato en una molécula. No obstante, en algunas realizaciones, el residuo de fucosa se adiciona a un residuo de glucosa reductor. Las biomoléculas, según se define en el presente documento, incluyen entre otras, moléculas biológicamente significativas tales como carbohidratos, oligosacáridos, proteínas (por ejemplo, glicoproteínas), y lípidos (por ejemplo, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y gangliósidos).

30

[0037] En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas:

35

Ara = arabinosilo;
 Fru = fructosilo;
 Fuc = fucosilo;
 Gal = galactosilo;
 GalNAc = N-acetilgalactosilamino;
 Glc = glucosilo;
 GlcNAc = N-acetilglucosilamino;
 Man = manosilo; y
 NeuAc = sialil (N-acetilneuraminil)
 FT ó Fut = fucosiltransferasa*
 ST = sialiltransferasa*
 GalT = galactosiltransferasa*

40

45

[0038] Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, sea o no realmente un azúcar reductor el sacárido del extremo reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en el presente documento con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha.

50

[0039] Todos los oligosacáridos descritos en el presente documento se describen con el nombre o la abreviatura correspondiente al sacárido no reductor (por ejemplo, Gal), seguido por la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace anular, la posición anular del sacárido reductor involucrado en el enlace, y a continuación el nombre o la abreviatura del sacárido reductor (por ejemplo, GlcNAc). El enlace entre dos azúcares se puede expresar, por ejemplo, como 2,3, 2 \rightarrow 3, o (2,3). Cada sacárido es una piranosa o furanosa.

55

[0040] La expresión “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia de los ácidos siálicos es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (abreviado frecuentemente como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el cual el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia de los ácidos siálicos es el ácido 2-ceto-3-desoxi-

60

nonulosónico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Se incluyen también ácidos siálicos 9-sustituídos, tales como 9-O-C₁-C₆ acil-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac ó 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-ácido-9-desoxi-Neu5Ac. Para obtener una revisión de la familia de los ácidos siálicos, véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se da a conocer en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de Octubre de 1992.

[0041] Un “sustrato aceptor” para una glicosiltransferasa es una fracción oligosacárido que puede actuar como aceptor para una glicosiltransferasa particular. Cuando el sustrato aceptor se hace entrar en contacto con la glicosiltransferasa y el sustrato dador de azúcar correspondientes, y otros componentes necesarios de la mezcla de la reacción, y la mezcla de la reacción se incuba durante un periodo de tiempo suficiente, la glicosiltransferasa transfiere residuos de azúcar desde el sustrato dador de azúcar al sustrato aceptor. Frecuentemente, el sustrato aceptor variará para tipos diferentes de una glicosiltransferasa particular.

[0042] Un “sustrato aceptor” para una fucosiltransferasa de *H. pylori* es una fracción oligosacárido que puede actuar como un aceptor para la fucosiltransferasa de *H. pylori*. Cuando el sustrato aceptor se hace entrar en contacto con la fucosiltransferasa de *H. pylori* y el sustrato dador de azúcar (por ejemplo, GDP-fucosa), y otros componentes necesarios de la mezcla de la reacción, y la mezcla de la reacción se incuba durante un periodo de tiempo suficiente, la fucosiltransferasa de *H. pylori* transfiere residuos de fucosa desde el GDP-fucosa al sustrato aceptor. Frecuentemente, el sustrato aceptor variará para tipos diferentes de una fucosiltransferasa particular. Por ejemplo, el sustrato aceptor para una galactósido 2-L-fucosiltransferasa de mamífero (α 1,2-fucosiltransferasa) incluirá un Gal β 1,4-GlcNAc-R en un extremo no reductor de un oligosacárido; esta fucosiltransferasa fija un residuo de fucosa al Gal a través de un enlace α 1,2. El Gal β 1,4-GlcNAc-R y Gal β 1,3-GlcNAc-R terminales y los análogos sialilados de los mismos son sustratos aceptores, respectivamente, para α 1,3 y α 1,4-fucosiltransferasas. No obstante, estas enzimas fijan el residuo de fucosa al residuo GlcNAc del sustrato aceptor. Por consiguiente, la expresión “sustrato aceptor” se considera contextualizada con la glicosiltransferasa particular de interés para una aplicación particular. La fucosiltransferasa de *H. pylori* descrita en el presente documento transferirá fucosa a sustratos aceptores sialilados o no sialilados. Alguna fucosiltransferasa de *H. pylori* descrita en el presente documento transferirá fucosa a residuos de glucosa.

[0043] Un “sustrato dador” para glicosiltransferasas es un azúcar nucleotídico activado. Dichos azúcares activados constan generalmente de derivados monofosfato de uridina, guanosina, y citidina de los azúcares (respectivamente UMP, GMP y CMP) o derivados difosfato de los azúcares (UDP, GDP y CDP, respectivamente) en los cuales el nucleósido monofosfato o difosfato sirve como grupo saliente. Por ejemplo, un sustrato dador para fucosiltransferasas es GDP-fucosa. Los sustratos dadores para sialiltransferasas, por ejemplo, son nucleótidos de azúcar activado que comprenden el ácido siálico deseado. Por ejemplo, en el caso de NeuAc, el azúcar activado es CMP-NeuAc.

[0044] Una “glicofoma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glicosilación sustancialmente uniforme” cuando está en relación con una especie de glicoproteína, se refiere al porcentaje de sustratos aceptores que son glicosilados por la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de la α 1,3 ó α 1,4 fucosiltransferasa indicada anteriormente, un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme existe si sustancialmente la totalidad (según se define posteriormente) del Gal β 1,4-GlcNAc-R y análogos sialilados o no sialilados del mismo están fucosilados en una composición que comprende la glicoproteína de interés. Aquellos expertos en la materia entenderán que el material de partida puede contener sustratos aceptores glicosilados (por ejemplo, sustratos de Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). De este modo, la cantidad calculada de glicosilación incluirá sustratos aceptores que están glicosilados por los métodos de la invención, así como aquellos sustratos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

[0045] El término “sustancialmente” en las definiciones anteriores de “sustancialmente uniforme” significa en general que por lo menos aproximadamente el 60%, por lo menos aproximadamente el 70%, por lo menos aproximadamente el 80%, o de forma más preferente por lo menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de los sustratos aceptores para una glicosiltransferasa particular están glicosilados (por ejemplo, sustratos de Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados).

[0046] La expresión “patrón de fucosilación sustancialmente idéntico” se refiere a un patrón de glicosilación de una glicoproteína producida por un método de la invención, que es por lo menos o aproximadamente un 80%, más preferentemente por lo menos aproximadamente un 90%, todavía más preferentemente por lo menos aproximadamente un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, o un 95% y todavía más preferentemente por lo menos aproximadamente un 96%, un 97%, un 98% o un 99% idéntico a la fucosilación de una glicoproteína conocida. “Patrón de fucosilación conocido” se refiere a un patrón de fucosilación de una glicoproteína conocida de cualquier fuente que tenga un nivel conocido cualquiera de fucosilación.

[0047] El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los

aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son posteriormente modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, aunque conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

[0048] “Proteína”, “polipéptido”, o “péptido” se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí a través de enlaces amida, haciéndose referencia alternativamente como polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, se puede usar o bien el isómero óptico L o bien el isómero óptico D. Adicionalmente, se incluyen también aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. En la presente invención también se pueden usar aminoácidos que no están codificados genéticamente. Además, en la invención también se pueden usar aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero o bien D o bien L. En general se prefieren los isómeros L. Adicionalmente, en la presente invención son también útiles otros peptidomiméticos. Para obtener una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

[0049] El término “recombinante” cuando se usa en referencia a una célula indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo, o expresa un péptido o proteína codificados por un ácido nucleico heterólogo. Las células recombinantes pueden contener genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener genes que se encuentran en la forma nativa de la célula en donde los genes se modifican y se vuelven a introducir en la célula por medios artificiales. El término abarca también células que contienen un ácido nucleico endógeno de la célula que ha sido modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen aquellas obtenidas por sustitución génica, mutación en puntos específicos, y técnicas relacionadas. Una “proteína recombinante” es aquella que se ha producido mediante una célula recombinante.

[0050] Una “proteína de fusión” se refiere a una proteína fucosiltransferasa de *H. pylori* que comprende secuencias de aminoácidos que se presentan de forma adicional a, en lugar de, que son menos que, y/o diferentes de las secuencias de aminoácidos que codifican la proteína de longitud completa original o nativa o subsecuencias de la misma.

[0051] Los componentes de las proteínas de fusión incluyen “enzimas accesorias” y/o “etiquetas de purificación o de aminoácidos”. Una “enzima accesoria” tal como se hace referencia en el presente documento, es una enzima que está involucrada en la catálisis de una reacción que, por ejemplo, forma un sustrato para una fucosiltransferasa. Una enzima accesoria, por ejemplo, puede catalizar la formación de un azúcar nucleotídico que se usa como fracción dadora por parte de una fucosiltransferasa, por ejemplo, GDP-fucosa. Una enzima accesoria puede ser también aquella que se usa en la generación de un trifosfato nucleotídico requerido para la formación de un azúcar nucleotídico, en la generación del azúcar que se incorpora al azúcar nucleotídico, por ejemplo, fucosa. La proteína de fusión recombinante de la invención se puede construir y expresar como una proteína de fusión con una “etiqueta de purificación” molecular en un extremo, que facilite la purificación de la proteína. Dichas etiquetas se pueden usar también para la inmovilización de una proteína de interés durante la reacción de glicosilación. Las etiquetas adecuadas incluyen “etiquetas epitópicas”, que son una secuencia proteica que es reconocida específicamente por un anticuerpo. Las etiquetas epitópicas se incorporan en general en proteínas de fusión para permitir el uso de un anticuerpo fácilmente disponible con el fin de detectar o aislar de manera inequívoca la proteína de fusión. Una “etiqueta FLAG” es una etiqueta epitópica usada comúnmente, reconocida específicamente por un anticuerpo anti-FLAG monoclonal, que consiste en la secuencia AspTyrLysAspAspAspLys (ID SEC N.º:75) o una variante sustancialmente idéntica de la misma. Aquellos expertos en la materia conocen otras etiquetas adecuadas, y las mismas incluyen, por ejemplo, una etiqueta de afinidad tal como un péptido de hexahistidina (ID SEC N.º: 76), que se unirá a iones metálicos tales como iones de níquel o cobalto. Las etiquetas de purificación incluyen también dominios de unión a maltosa y dominios de unión a almidón. Aquellos expertos en la materia conocen la purificación de proteínas de dominios de unión a maltosa. Los dominios de unión a almidón se describen en el documento WO 99/15636. En el documento USSN 60/468.374, presentado el 5 de Mayo de 2003, se describe la purificación por afinidad de una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a almidón usando una resina derivada de betaciclodextrina (BCD).

[0052] La expresión “dominio funcional” en referencia a glucosiltransferasa se refiere a un dominio de la glicosiltransferasa que confiere o modula una actividad de la enzima, por ejemplo, especificidad de sustrato aceptor, actividad catalítica, afinidad de unión, u otra actividad biológica o bioquímica. Los ejemplos de dominios funcionales de glicosiltransferasas incluyen, entre otros, el dominio catalítico.

[0053] La expresión “nivel de expresión” en referencia a una proteína se refiere a la cantidad de una proteína producida por una célula. La cantidad de proteína producida por una célula se puede medir mediante los ensayos y las unidades

de actividad descritos en el presente documento o que son conocidos para los expertos en la materia. Los expertos en la materia sabrán cómo medir y describir la cantidad de proteína producida por una célula usando respectivamente una variedad de ensayos y unidades. De este modo, la cuantificación y la descripción cuantitativa del nivel de expresión de una proteína, por ejemplo, una fucosiltransferasa de *H. pylori*, se puede someter a ensayo midiendo la actividad enzimática o las unidades usadas para describir la actividad, o la cantidad de proteína. La cantidad de proteína producida por una célula se puede determinar mediante ensayos conocidos convencionales, por ejemplo, el ensayo para proteínas de Bradford (1976), el kit de ensayo para proteínas con ácido bicinconínico de Pierce (Rockford, Illinois), o según se describe en la patente U.S. n.º. 5.641.668.

5
10 **[0054]** La expresión “actividad enzimática” se refiere a una actividad de una enzima y se puede medir a través de los ensayos y unidades descritos en el presente documento o conocidos para los expertos en la materia.

15 **[0055]** La expresión “actividad específica” tal como se usa en el presente documento se refiere a la actividad catalítica de una enzima, por ejemplo, una proteína fucosiltransferasa de *H. pylori* de la presente invención, y se puede expresar en unidades de actividad. Tal como se usa en el presente documento, una unidad de actividad cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto a una temperatura (por ejemplo, a 37°C) y un valor de pH (por ejemplo, con un pH 7,5) determinados. De este modo, 10 unidades de una enzima es una cantidad catalítica de esa enzima en la que 10 μmol de sustrato se convierten en 10 μmol de producto en un minuto a una temperatura de, por ejemplo, 37°C y un valor de pH de, por ejemplo, 7,5.

20 **[0056]** Un “dominio catalítico” se refiere a un dominio proteico, o una subsecuencia del mismo, que cataliza una reacción enzimática realizada por la enzima. Por ejemplo, un dominio catalítico de una fucosiltransferasa incluirá una subsecuencia de la fucosiltransferasa suficiente para transferir un residuo de fucosa desde un dador a un sacárido aceptor. Un dominio catalítico puede incluir una enzima completa, una subsecuencia de la misma, o puede incluir secuencias de aminoácidos adicionales que no están fijadas a la enzima, o una subsecuencia de las mismas tal como se hallan en la naturaleza. Las enzimas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de la invención también se pueden reconocer por la presencia de dominios catalíticos altamente conservados que se encuentran en una familia de proteínas de fucosiltransferasa, glicosiltransferasa familia 10, véase, por ejemplo, gn|CDD|16836 pfam00852, Glico_transf_10. En las figuras 8 a 11 se muestran alineamientos entre dominios catalíticos conservados de 1182 futB, 1111 futA, 1218 futB, y 19C2 futB y una secuencia consenso del dominio catalítico de miembros de la glicosiltransferasa familia 10. En cada una de las enzimas α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* enumeradas anteriormente, por ejemplo, 1182 futB, aminoácidos 23 a 305; 1111 futA, aminoácidos 27 a 304; 1218 futB, aminoácidos 23 a 305; y 19C2 futB aminoácidos 22 a 277 se encuentran regiones altamente conservadas, similares a una región de la secuencia consenso del dominio catalítico de la glicosiltransferasa familia 10 que comienza aproximadamente en el aminoácido 11 y finaliza en el aminoácido 301, y se cree que las mismas son los dominios catalíticos de la enzima. De este modo, en los métodos de la invención, por ejemplo, fucosilación de glicoproteínas, se pueden usar polipéptidos que comprenden los dominios catalíticos de fucosiltransferasa antes identificados. En los métodos de la invención, por ejemplo, producción de proteínas de fucosiltransferasa para la fucosilación de glicoproteínas, también se pueden usar ácidos nucleicos que codifican los dominios catalíticos de fucosiltransferasa antes identificados.

30
35
40 **[0057]** Una “subsecuencia” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que comprenden una parte de una secuencia mayor de ácidos nucleicos o aminoácidos (por ejemplo, proteína) respectivamente.

45 **[0058]** La expresión “ácido nucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma o bien monocatenaria o bien bicatenaria, y a no ser que se limite de otra manera, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A no ser que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos incluye la secuencia complementaria de la misma.

50 **[0059]** Un “casete de expresión recombinante” o simplemente “casete de expresión” es un constructo de ácidos nucleicos, generado de forma recombinante o sintética, con elementos de ácido nucleico que son capaces de influir en la expresión de un gen estructural en huéspedes compatibles con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen por lo menos promotores y, opcionalmente, señales de terminación de transcripción. Típicamente, el casete de expresión recombinante incluye un ácido nucleico a transcribir (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado), y un promotor. También se pueden usar, según se describe en el presente documento, factores adicionales necesarios o útiles en la consecución de la expresión. Por ejemplo, un casete de expresión también puede incluir secuencias nucleotídicas que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada desde la célula hospedadora. En un casete de expresión también se pueden incluir señales de terminación de transcripción, potenciadores, y otras secuencias de ácidos nucleicos que influyan en la expresión génica.

60 **[0060]** Un “secuencia heteróloga” o un “ácido nucleico heterólogo”, tal como se usa en el presente documento, es aquel que se origina de una fuente extraña para la célula hospedadora particular, o, si proviene de la misma fuente, está modificado con respecto a su forma original. De este modo, un gen glicoproteico heterólogo en una célula hospedadora eucariota incluye un gen codificador de glicoproteína que es endógeno con respecto a la célula hospedadora particular

que ha sido modificada. La modificación de la secuencia heteróloga se puede producir, por ejemplo, tratando el ADN con una enzima de restricción para generar un fragmento de ADN que es capaz de enlazarse operativamente al promotor. Para modificar una secuencia heteróloga son también útiles técnicas tales como la mutagénesis sitio-dirigida.

5 **[0061]** El término “aislado” se refiere a material que está exento, de manera sustancial o esencial, de componentes que interfieren con la actividad de una enzima. Para un sacárido, proteína, o ácido nucleico de la invención, el término “aislado” se refiere a material que está exento, de manera sustancial o esencial, de componentes que acompañan normalmente al material según se encuentra en su estado nativo. Típicamente, un sacárido, proteína, o ácido nucleico
10 aislado de la invención es por lo menos aproximadamente un 80% puro, habitualmente por lo menos aproximadamente un 90%, y preferentemente por lo menos aproximadamente un 95% puro según se mide mediante la intensidad de las bandas en un gel teñido con color plata u otro método para determinar la pureza. La pureza u homogeneidad se puede indicar mediante varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína o ácido nucleico en una muestra se puede resolver mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y a continuación la proteína o ácido nucleico se puede visualizar mediante tinción. Para ciertos fines, puede ser deseable una alta resolución de la proteína o ácido
15 nucleico, y se puede utilizar, por ejemplo, una HPLC o unos medios similares de purificación.

[0062] La expresión “enlazado operativamente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácidos nucleicos (tal como un promotor, una secuencia señal, o una agrupación de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos, en donde la secuencia de control de expresión afecta a la transcripción y/o producción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.
20

[0063] Los términos “idénticas” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener una máxima correspondencia, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.
25

[0064] La expresión “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tiene más de aproximadamente el 60% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, preferentemente el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% ó el 99% de identidad de residuos de aminoácidos o nucleótidos, cuando se comparan y alinean para obtener una máxima correspondencia, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 50 residuos, más preferentemente sobre una región de por lo menos aproximadamente 100 residuos, y de la forma más preferente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre por lo menos aproximadamente 150 residuos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las regiones codificantes.
30
35

[0065] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, en un ordenador se introducen secuencias de prueba y de referencia, se designan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se designan parámetros del programa del algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa.
40
45

[0066] Se puede efectuar un alineamiento óptimo de secuencias para su comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase *en general*, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubell et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).
50

[0067] Entre los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias se encuentran los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschuel et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para ejecutar análisis por BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo conlleva en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o bien coinciden con o bien cumplen con alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. A T se le hace referencia como el umbral de puntuación de palabras próximas (*neighborhood word*) (Altschul et al, *supra*). Estos aciertos de palabras próximas iniciales actúan como valores semillas para iniciar búsquedas con el fin de encontrar HSPs más largos que las contenga. A continuación, los aciertos de las
55
60

5 palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en la que se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativa. Se calculan puntuaciones acumulativas usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre que >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de las palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X con respecto a su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

15 **[0068]** Además de calcular el porcentaje de identidad de las secuencias, el algoritmo BLAST realiza también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferentemente menor que aproximadamente 0,01, y de la forma más preferente menor que aproximadamente 0,001.

25 **[0069]** Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o proteínas son sustancialmente idénticas es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico presente reactividad cruzada inmunológica con la proteína codificada por el segundo ácido nucleico, tal como se describe posteriormente. De este modo, una proteína es de forma típica sustancialmente idéntica a una segunda proteína, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí bajo condiciones estrictas, tal como se describe posteriormente.

30 **[0070]** La expresión “que se hibrida específicamente con” se refiere a la unión, dúplex, o hibridación de una molécula únicamente con una secuencia nucleotídica particular bajo condiciones estrictas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total) ADN o ARN.

35 **[0071]** La expresión “condiciones estrictas” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de las secuencias y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas mayores. En general, se seleccionan condiciones estrictas de forma que sean aproximadamente 15 °C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácidos nucleicos definidos) en la cual el 50 % de las sondas complementarias con la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. (Como las secuencias diana están en general presentes en exceso, en T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Típicamente, las condiciones estrictas serán aquellas en las que la concentración de sales es menor que aproximadamente 1,0 M de iones Na, típicamente de forma aproximada entre 0,01 y 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a un pH entre 7.0 y 8.3, y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, entre 10 y 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Se pueden lograr también condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es típicamente por lo menos dos veces la hibridación de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Las siguientes pueden ser condiciones de hibridación estrictas ejemplificativas: 50 % formamida, 5x SSC, y 1 % SDS, incubación a 42 °C, ó, 5x SSC, 1 % SDS, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2 x SSC y 0,1 % SDS a 65 °C. Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para una amplificación de bajo rigor, aunque las temperaturas de apareamiento pueden variar entre aproximadamente 32 y 48 °C dependiendo de la longitud de los cebadores. Para una amplificación PCR de alto rigor, es típica una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de apareamiento de alto rigor pueden estar comprendidas entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud de los cebadores y la especificidad. Las condiciones típicas de los ciclos para amplificaciones tanto de alto como de bajo rigor incluyen una fase de desnaturalización de entre 90 y 95 °C durante entre 30 y 120 segundos, una fase de apareamiento que dura entre 30 y 120 segundos, y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante entre 1 y 2 minutos. Los protocolos y las directrices para las reacciones de amplificación de bajo y alto rigor están disponibles, por ejemplo, en Innis, et al. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Application Academic Press, N.Y.

60 **[0072]** Las expresiones “se une específicamente a una proteína” o “específicamente inmunorreactivo con”, cuando se refieren a un anticuerpo se refieren a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. De este modo, bajo condiciones de

5 inmuensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen preferentemente a una proteína particular y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a una proteína bajo tales condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Se puede usar una variedad de formatos de inmuensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, de manera rutinaria se usan inmuensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos específicamente con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para obtener una descripción de formatos y condiciones de inmuensayos que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

10 **[0073]** “Variaciones modificadas de manera conservadora” de una secuencia polinucleotídica particular se refieren a aquellos polinucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el polinucleótido no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifica cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, y AGG codifican todos ellos el aminoácido arginina. De este modo, en cada posición en la que una arginina está especificada por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar la proteína codificada. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, las cuales constituyen una especie de “variaciones modificadas de manera conservadora”. Cada secuencia polinucleotídica descrita en el presente documento que codifica una proteína describe también cada variación silenciosa posible, excepto cuando se indique lo contrario. Los expertos reconocerán que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para la metionina, y UGG que es ordinariamente el único codón para el triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas convencionales. Por consiguiente, cada “variación silenciosa” de un ácido nucleico que codifica una proteína está implícita en cada secuencia descrita.

25 **[0074]** Además, los expertos reconocerán que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, adicionan o suprimen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos (típicamente menor que el 5 %, más típicamente menor que el 1 %) en una secuencia codificada son “variaciones modificadas de manera conservadora” cuando las alteraciones den como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

35 **[0075]** Los expertos apreciarán que muchas variaciones conservadoras de las proteínas de fusión y los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión generan productos esencialmente idénticos. Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, las “sustituciones silenciosas” (es decir, sustituciones de una secuencia de ácidos nucleicos que no dan como resultado una alteración de una proteína codificada) son una característica implícita de cada secuencia de ácidos nucleicos que codifica un aminoácido. Según se describe en el presente documento, las secuencias se optimizan preferentemente para la expresión en una célula hospedadora particular usada para producir las glicosiltransferasas quiméricas (por ejemplo, levadura, humana, y similares). De modo similar, las “sustituciones conservadoras de aminoácidos”, en uno o unos pocos aminoácidos de una secuencia de aminoácidos se sustituyen con aminoácidos diferentes con propiedades altamente similares (véase la sección de definiciones, *supra*), se identifican también fácilmente de manera que son altamente similares a una secuencia de aminoácidos en particular, o a una secuencia de ácidos nucleicos en particular que codifica un aminoácido. Dichas variaciones sustituidas de manera conservadora, de cualquier secuencia particular, son una característica de la presente invención. Véase también Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company. Adicionalmente, las sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, adicionan o suprimen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en una secuencia codificada son también “variaciones modificadas de manera conservadora”.

50 **[0076]** La puesta en práctica de esta invención puede conllevar la construcción de ácidos nucleicos recombinantes y la expresión de genes en células hospedadoras transfectadas. Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines con conocidas en la técnica. Los expertos conocen bien una amplia variedad de métodos de clonación y de amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes, tales como vectores de expresión. Se encuentran ejemplos de estas técnicas en instrucciones suficientes para la orientación de expertos a través de muchos ejercicios de clonación, en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); y *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1999 Supplement) (Ausubel). Las células hospedadoras adecuadas, para la expresión de las fucosiltransferasas de *H. pylori* recombinantes son conocidas para aquellos expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, células bacterianas, incluyendo *E. coli*. En la presente invención también se pueden usar células eucariotas, por ejemplo, células de insectos tales como la célula Sf 9 y células de levadura o fúngicas (por ejemplo, *Aspergillus niger* o levadura).

60 **[0077]** Se encuentran ejemplos de protocolos suficientes para la orientación de expertos a través de métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (PCR), la amplificación de Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa en Berger, Sambrook, y Ausubel, así

como Mullis et al. (1987) patente U.S. n.º 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem. 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4:560; y Barringer et al. (1990) Gene 89:117. En Wallace et al., Pat. U.S. n.º 5.426.039 se describen métodos mejorados de clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

[0078] La presente invención proporciona por primera vez α -1,3/4-fucosiltransferasas bacterianas, es decir, fucosiltransferasas de *H. pylori*, que transfieren fucosa desde un sustrato dador a un azúcar aceptor en una glicoproteína. Adicionalmente, las fucosiltransferasas son útiles para producir glicolípidos y oligosacáridos fucosilados.

[0079] Específicamente, se clonaron α -1,3/4-fucosiltransferasas de las siguientes cepas de *H. pylori* y las mismas se analizaron: 915A2, 1111A2, 19C2B1, 1182B3, 19C2A5, 26695, y 1218. Fucosiltransferasas de las siguientes cepas de *H. Pylori* transfirieron fucosa a Glc-NAc: 915A2, 1111A2, 19C2FutB, y 1182B3. El producto del gen FutA de la cepa de *H. pylori* 19C2A5 transfirió fucosa a la glucosa reductora del aceptor de LNnT, igual que lo hacía el producto del gen FutB de la cepa de *H. pylori* 1218. Se confirmó la capacidad del producto del gen FutA de la cepa de *H. pylori* 26695 de transferir fucosa a glucosa.

[0080] Una ventaja principal de las α -1,3/4 fucosiltransferasas de *H. pylori* con respecto a α -1,3/4-fucosiltransferasas de mamíferos es que la enzima de *H. pylori* parece no verse afectada por el estado de sialilación del aceptor. Adicionalmente, algunas de las fucosiltransferasas de *H. pylori* adicionan fucosa exclusivamente al residuo de N-acetilglucosamina (glcNAc) en azúcares aceptores que contienen residuos tanto de glucosa como glcNAc. Por contraposición, las α -1,3/4-fucosiltransferasas de mamíferos son sensibles al grado de sialilación del aceptor y algunas enzimas de mamíferos adicionan a residuos tanto de glucosa como glcNAc en el mismo aceptor. Adicionalmente, las enzimas expresadas bacterianamente ofrecen unos grandes ahorros en los costes con respecto a la expresión de productos de genes de mamíferos en sistemas con Sf9 ó CHO.

A. Clonación de proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori*

[0081] Los ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas, por ejemplo, α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori*, y los métodos de obtención de dichos ácidos nucleicos, son conocidos para aquellos expertos en la materia. Los ácidos nucleicos adecuados (por ejemplo, ADNc, genómicos, o subsecuencias (sondas)) se pueden clonar, o amplificar mediante métodos *in vitro* tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), o el sistema de replicación de secuencia autosostenida (SSR). Los expertos conocen bien una amplia variedad de metodologías de clonación y de amplificación *in vitro*. En Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning- A Laboratory Manual (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook *et al.*); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Cashion et al., patente U.S. número 5.017.478; y Carr, patente europea n.º 0.246.864, se encuentran ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para la orientación de expertos a través de muchos ejercicios de clonación.

[0082] Un ADN que codifica una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, o subsecuencias de la misma, se puede preparar por cualquier método adecuado descrito anteriormente, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas con enzimas de restricción. En una realización preferida, se aíslan ácidos nucleicos que codifican α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* mediante métodos de clonación rutinarios. Se puede usar una secuencia nucleotídica de una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* según se proporciona, por ejemplo, en GenBank u otra base de datos de secuencias (consúltase más arriba), para proporcionar sondas que se hibridan específicamente con un gen de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* en una muestra de ADN genómico, o con un ARNm, que codifica una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, en una muestra de ARN total (por ejemplo, en una transferencia Southern o Northern). Una vez que se ha identificado el ácido nucleico diana que codifica una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, el mismo se puede aislar según métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Volúmenes 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory; Berger y Kimmel (1987) Methods in Enzymology, Vol. 152: Guide to Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.; o Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Además, los ácidos nucleicos aislados se pueden escindir con enzimas de restricción para crear ácidos nucleicos que codifican la α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* de longitud completa, o subsecuencias de la misma, por ejemplo, que contienen subsecuencias que codifican por lo menos una subsecuencia de un dominio catalítico de una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*. Estos fragmentos enzimáticos de restricción, que

codifican una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* o subsecuencias de la misma, se pueden ligar a continuación, por ejemplo, para producir un ácido nucleico que codifica una proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*.

[0083] Un ácido nucleico que codifica una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, o una subsecuencia de la misma, se puede caracterizar realizando ensayos en relación con el producto expresado. Se pueden usar ensayos basados en la detección de las propiedades físicas, químicas, o inmunológicas de la proteína expresada. Por ejemplo, se puede identificar una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* clonada, mediante la capacidad de una proteína codificada por el ácido nucleico de catalizar la transferencia de un residuo de fucosa desde un sustrato dador a un sustrato aceptor. En un método, para detectar los productos de reacción se utiliza la electroforesis capilar. Este ensayo altamente sensible conlleva el uso de derivados o bien de sacárido o bien de disacárido aminofenil que se etiquetan con fluoresceína según se describe en Wakarchuk et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 (45):28271-276. Por ejemplo, para ensayos en relación con una enzima de *Neisseria IgtC*, se puede usar o bien FCHASE-AP-Lac o bien FCHASE-AP-Gal, mientras que para la enzima de *Neisseria IgtB* el FCHASE-AP-GlcNAc es un reactivo apropiado (*Id.*). Otros métodos para la detección de un producto de reacción fucosilado incluyen la cromatografía en capa fina y la GC/MS.

[0084] Además, un ácido nucleico que codifica una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, o una subsecuencia de la misma, se puede sintetizar químicamente. Los métodos adecuados incluyen el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862; y el método del soporte sólido de la patente U.S. n.º 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como molde. Los expertos reconocen que, aunque la síntesis química de ADN se ve limitada frecuentemente a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

[0085] Se pueden clonar ácidos nucleicos que codifican α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori*, o subsecuencias de las mismas, usando métodos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR). De este modo, por ejemplo, la secuencia o subsecuencia de ácidos nucleicos se amplifica por PCR, usando un cebador sentido que contiene un sitio enzimático de restricción (por ejemplo, *NdeI*) y un cebador antisentido que contiene otro sitio enzimático de restricción (por ejemplo, *HindIII*). Esto producirá un ácido nucleico que codifica las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* o subsecuencias deseadas y que tiene sitios enzimáticos de restricción terminales. A continuación, este ácido nucleico se puede ligar fácilmente en un vector que contiene un ácido nucleico que codifica la segunda molécula y que tiene los sitios enzimáticos de restricción correspondientes apropiados. Los cebadores de PCR adecuados se pueden determinar por parte de aquellos expertos en la materia usando la información de secuencias proporcionada en GenBank u otras fuentes. También se pueden adicionar sitios enzimáticos de restricción apropiados al ácido nucleico que codifica la proteína o subsecuencia de proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* mediante mutagénesis sitio-dirigida. El plásmido que contiene la secuencia o subsecuencia nucleotídica que codifica la α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* se escinde con la endonucleasa de restricción apropiada y a continuación se liga en un vector apropiado, para la amplificación y/o expresión según métodos convencionales. En Berger, Sambrook, y Ausubel, así como Mullis et al., (1987) patente U.S. n.º 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem. 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; y Barringer et al. (1990) Gene 89:117, se encuentran ejemplos de técnicas suficientes para la orientación de expertos a través de métodos de amplificación *in vitro*.

[0086] Otras propiedades físicas de una proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* clonada expresada a partir de un ácido nucleico particular, se pueden comparar con propiedades de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* conocidas para proporcionar otro método de identificación de secuencias o dominios adecuados de las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* que son determinantes de la especificidad del sustrato aceptor y/o la actividad catalítica. Alternativamente, se puede mutar un gen de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* putativo o gen de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* recombinante, y se puede establecer su papel como α -1,3/4-fucosiltransferasas, o el papel de secuencias o dominios particulares detectando una variación en la estructura de un carbohidrato producido normalmente por las α -1,3/4-fucosiltransferasas no mutadas, de origen natural, o de control.

[0087] Se pueden identificar dominios funcionales de α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* usando métodos convencionales para mutar o modificar las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* g y sometiendo a prueba las proteínas modificadas o mutadas en relación con actividades tales como actividad del sustrato aceptor y/o actividad catalítica, según se describe en el presente documento. Los dominios funcionales de las diversas α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* se pueden usar para construir ácidos nucleicos que codifican proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasas que comprenden los dominios funcionales de una o más α -1,3/4-fucosiltransferasa. A continuación, estas proteínas de fusión se pueden someter a prueba en relación con el sustrato del aceptor o la actividad catalítica deseados.

[0088] En un planteamiento ejemplificativo para la clonación de ácidos nucleicos que codifican proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa, las secuencias conocidas de ácidos nucleicos o aminoácidos de glicosiltransferasas clonadas se alinean y se comparan para determinar la cantidad de identidad de secuencia entre varias glicosiltransferasas. Esta información se puede usar para identificar y seleccionar dominios de proteínas que confieren o modulan actividades de glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad del sustrato aceptor y/o actividad catalítica basándose en la cantidad de identidad de secuencias entre las glicosiltransferasas de interés. Por ejemplo, se pueden usar dominios que tienen identidad de secuencias entre las fucosiltransferasas de interés, y que están asociados a una actividad conocida, para construir proteínas de fucosiltransferasa que contienen ese dominio, y que tienen la actividad asociada a ese dominio (por ejemplo, especificidad del sustrato aceptor y/o actividad catalítica).

B. Proteína de fusión que comprende enzimas accesorias involucradas en la formación de azúcares nucleotídicos

[0089] En algunas realizaciones, los polipéptidos de fusión de la invención incluyen, además del(de los) dominio(s) catalítico(s) de α -1,3/4-fucosiltransferasas y/u otros dominios funcionales, por lo menos un dominio catalítico de una enzima accesorias. Las enzimas accesorias se incluyen, por ejemplo, aquellas enzimas que están involucradas en la formación de un azúcar nucleotídico. La enzima accesorias puede estar involucrada en la fijación del azúcar a un nucleótido, o puede estar involucrada, por ejemplo, en la creación del azúcar o el nucleótido. En general, el azúcar nucleotídico es uno que se utiliza como dador de sacárido por parte del dominio catalítico de glicosiltransferasa del polipéptido de fusión particular. Las α -1,3/4-fucosiltransferasas utilizan GDP-fucosa como dador de azúcar. Por ejemplo, en el documento PCT/CA98/01180, USSN 09/211.691 presentado el 14 de diciembre de 1998 se encuentran ejemplos de proteínas de fusión que comprenden un dominio funcional de una glicosiltransferasa y una enzima accesorias y métodos para realizar dichas fusiones.

[0090] Las enzimas accesorias que están involucradas en la síntesis de azúcares nucleotídicos son bien conocidas para aquellos expertos en la materia. Para obtener una revisión de la síntesis de polisacáridos bacterianos y la nomenclatura de los genes, véase, por ejemplo, Reeves et al., Trends Microbiol. 4: 495-503 (1996). Los métodos antes descritos para obtener ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasa son también aplicables a la obtención de ácidos nucleicos que codifican enzimas involucradas en la formación de azúcares nucleotídicos. Por ejemplo, se puede usar uno de los ácidos nucleicos conocidos en la técnica, alguno de los cuales se enumeran posteriormente, directamente o como sonda para aislar un ácido nucleico correspondiente con respecto a otros organismos de interés.

[0091] Un ejemplo de un polipéptido de fusión proporcionado por la invención se usa para producir un oligosacárido soluble fucosilado. El azúcar nucleotídico dador para fucosiltransferasas es GDP-fucosa, que resulta relativamente caro de producir. Para reducir el coste de producción del oligosacárido fucosilado, la invención proporciona polipéptidos de fusión que pueden convertir la relativamente económica GDP-manosa en GDP-fucosa, y a continuación catalizar la transferencia de la fucosa a un sacárido aceptor. Estos polipéptidos de fusión incluyen un dominio catalítico de por lo menos una de entre una GDP-manosa deshidratasa, una GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa 3,5-epimerasa, o una GDP-4-ceto-6-desoxi-L-glucosa 4-reductasa. Cuando se proporciona cada una de estas actividades enzimáticas, se puede convertir GDP-manosa en GDP-fucosa.

[0092] Stevenson et al. (1996) J. Bacteriol. 178: 4885-4893 (n.º de Acceso de GenBank U38473) describe la secuencia nucleotídica de un agrupamiento de genes de *E. coli* que codifica enzimas sintetizadoras de GDP-fucosa. Se había publicado que este agrupamiento de genes incluía un marco de lectura abierto para GDP-manosa deshidratasa (nucleótidos 8633-9754; Stevenson et al., supra). Recientemente se descubrió que este agrupamiento de genes contiene también un marco de lectura abierto que codifica una enzima que tiene actividades tanto de epimerización 3,5 como 4-reductasa (véase la patente US de cesión conjunta n.º 6.500.661, publicada el 31 de diciembre de 2002), y por lo tanto es capaz de convertir el producto de la reacción de GDP-manosa deshidratasa (GDP-4-ceto-6-desoximanosa) en GDP-fucosa. Esta ORF, que se designa YEF B, se encuentra entre los nucleótidos 9757-10722. Antes del descubrimiento de que la YEF B codifica una enzima que tiene dos actividades, no se sabía si eran necesarias una o dos enzimas para la conversión de la GDP-4-ceto-6-desoximanosa en GDP-fucosa. La secuencia nucleotídica de un gen que codifica la enzima Fx humana se encuentra en el número de Acceso de GenBank U58766.

[0093] Se proporcionan también polipéptidos de fusión que incluyen un dominio catalítico de manosiltransferasa y un dominio catalítico de una GDP-Man pirofosforilasa (EC 2.7.7.22), que convierte Man-1-P en GDP-Man. Se conocen genes adecuados de muchos organismos, incluyendo *E. coli*: GenBank U13629, AB010294, D43637 D13231, Bastin et al., Gene 164: 17-23 (1995), Sugiyama et al., J. Bacteriol. 180:2775-2778 (1998), Sugiyama et al., Microbiology 140 (Pt 1): 59-71 (1994), Kido et al., J. Bacteriol. 177: 2178-2187 (1995); *Klebsiella pneumoniae*: GenBank AB010296, AB010295, Sugiyama et al., J. Bacteriol. 180: 2775-2778 (1998); *Salmonella enterica*: GenBank X56793 M29713, Stevenson et al., J. Bacteriol. 178: 4885-4893 (1996).

[0094] Los polipéptidos de fusión de la invención para la fucosilación de un aceptor de sacárido también pueden utilizar enzimas que proporcionan una vía menor o de "depuración" ("scavenge") para la formación de GDP-fucosa. En esta vía, fucosa libre es fosforilada por fucoquinasa para formar 1-fosfato de fucosa, que, junto con 5'-trifosfato de guanosina

(GTP), es usado por la GDP-fucosa pirofosforilasa para formar GDP-fucosa (Ginsburg et al., J. J. Biol. Chem., 236: 2389-2393 (1961) y Reitman, J. Biol. Chem., 255: 9900-9906 (1980)). Por consiguiente, un dominio catalítico de fucosiltransferasa se puede enlazar con un dominio catalítico de una GDP-fucosa pirofosforilasa, para lo cual se describen ácidos nucleicos adecuados en la solicitud de patente U.S. en tramitación con la presente, de cesión conjunta, n.º de serie 08/826.964, presentada el 9 de abril de 1997. Se describen ácidos nucleicos que codifican fucoquinasa para, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al. (1995) Science 269:496-512) y *E. coli* (Lu y Lin (1989) Nucleic Acids Res. 17: 4883-4884).

[0095] Son enzimas accesorias adicionales a partir de las cuales se puede obtener un dominio catalítico aquellas que están involucradas en la formación de reactivos consumidos en un ciclo de la glicosiltransferasa. Por ejemplo, cualquiera de las diversas fosfato quinasa es útil como enzima accesorio. La polifosfato quinasa (EC 2.7.4.1), por ejemplo, cataliza la formación de ATP; las nucleósido fosfato quinasa (EC 2.7.4.4) pueden formar los nucleósido difosfatos respectivos; creatina fosfato quinasa (ES 2.7.3.2); mioquinasa (EC 2.7.4.3); N-acetilglucosamina acetil quinasa (EC 2.7.1.59); acetil fosfato quinasa; y piruvato quinasa (EC 2.7.1.40).

C. Casetes de expresión y células hospedadoras para expresar proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* recombinantes

[0096] Las proteínas de fusión de la invención se pueden expresar en una variedad de células hospedadoras, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, y levadura. Las células hospedadoras son preferentemente microorganismos, tales como, por ejemplo, células de levadura, células bacterianas, o células fúngicas filamentosas. Entre los ejemplos de células hospedadoras adecuadas se incluyen, por ejemplo, *Azotobacter* sp. (por ejemplo, *A. vinelandii*), *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Erwinia* sp., *Escherichia* sp. (por ejemplo, *E. coli*), *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* y *Klebsiella* sp., entre muchas otras. Las células pueden ser de cualquiera de entre varios géneros, incluyendo *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), *Candida* (por ejemplo, *C. utilis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. versatilis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, y *C. humicola*), *Pichia* (por ejemplo, *P. farinosa* y *P. ohmen*), *Torulopsis* (por ejemplo, *T. candida*, *T. sphaerica*, *T. xylinus*, *T. famata*, y *T. versatilis*), *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. subglobosus*, *D. cantarellii*, *D. globosus*, *D. hansenii*, y *D. japonicus*), *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. rouxii* y *Z. bailii*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. marxianus*), *Hansenula* (por ejemplo, *H. anomala* y *H. jadonii*), y *Brettanomyces* (por ejemplo, *B. lambicus* y *B. anomalus*). Entre los ejemplos de bacterias útiles se incluyen, entre otras, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*.

[0097] Típicamente, el polinucleótido que codifica la proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa se sitúa bajo el control de un promotor que es funcional en la célula hospedadora deseada. Se conoce ampliamente una variedad extremadamente extensa de promotores, y los mismos se pueden usar en los vectores expresión de la invención, dependiendo de la aplicación particular. Comúnmente, el promotor seleccionado depende de la célula en la que va a estar activo el promotor. Opcionalmente también se incluyen otras secuencias de control de expresión tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de terminación de transcripción y similares. A los constructos que incluyen una o más de estas secuencias de control se les denomina "casetes de expresión". Por consiguiente, la invención proporciona casetes de expresión en los cuales se incorporan los ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión, para una expresión de alto nivel en una célula hospedadora deseada.

[0098] Las secuencias de control de expresión que son adecuadas para ser usada en una célula hospedadora particular se obtienen frecuentemente clonando un gen que se expresa en esa célula. Las secuencias de control procariontas usadas comúnmente, que se definen en el presente documento de manera que incluyen promotores para la iniciación de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitios de unión al ribosoma, incluyen promotores usados comúnmente tales como los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas) y lactosa (*lac*) (Change et al., Nature (1977) 198: 1056), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., Nucleic Acids Res. (1980) 8: 4057), el promotor *tac* (DeBoer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1983) 80:21-25); y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de unión al ribosoma de genes N (Shimatake et al., Nature (1981) 292: 128). El sistema promotor en particular no es crítico para la invención, puede usarse cualquier promotor disponible que funcione en procariontas.

[0099] Para la expresión de proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa en células procariontas que no sean *E. coli*, se requiere un promotor que funcione en la especie procarionta particular. Dichos promotores se pueden obtener a partir de genes que se han clonado desde la especie, o se pueden usar promotores heterólogos. Por ejemplo, el promotor híbrido *trp-lac* funciona en *Bacillus* además de la *E. coli*.

[0100] En los casetes de expresión de la invención se incluye adecuadamente un sitio de unión al ribosoma (RBS). Un RBS en *E. coli*, por ejemplo, consiste en una secuencia nucleotídica de entre 3 y 9 nucleótidos de longitud situada entre 3 y 11 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación (Shine y Dalgarno, Nature (1975) 254: 34; Steitz, In Biological regulation and development: Gene expression (ed. RF. Goldberger), vol. 1, p. 349, 1979, Plenum Publishing, NY).

5 **[0101]** Para la expresión de las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa en levadura, los promotores adecuados incluyen GAL1-10 (Johnson y Davies (1984) Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448) ADH2 (Russell et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:2674-2682), PHO5 (EMBO J. (1982) 6:675-680), y MF α (Herskowitz y Oshima (1982) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (eds. Strathern, Jones, y Broach) Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 181-209). Otro promotor adecuado para su uso en levadura es el promotor híbrido ADH2/GAPDH según se describe en Cousens et al., Gene 61:265-275 (1987). Para hongos filamentosos tales como, por ejemplo, cepas de los hongos *Aspergillus* (McKnight et al., patente U.S. n.º 4.935.349), los ejemplos de promotores útiles incluyen aquellos derivados de genes glicolíticos de *Aspergillus nidulans*, tales como el promotor ADH3 (McKnight et al., EMBO J. 4: 2093 2099 (1985)) y el promotor *tpiA*. Un ejemplo de un terminador adecuado es el terminador ADH3 (McKnight et al.).

10 **[0102]** En la presente invención se pueden usar promotores o bien constitutivos o bien regulados. Los promotores regulados pueden resultar ventajosos ya que las células hospedadoras se pueden hacer crecer hasta densidades elevadas antes de inducir la expresión de las proteínas de fusión. La expresión de alto nivel de proteínas heterólogas ralentiza el crecimiento celular en algunas situaciones. Un promotor inducible es un promotor que dirige la expresión de un gen donde el nivel de expresión es alterable por factores medioambientales o de desarrollo tales como, por ejemplo, la temperatura, el pH, las condiciones anaeróbicas o aeróbicas, la luz, factores de transcripción y agentes químicos. A dichos promotores se les hace referencia en el presente documento como promotores "inducibles", los cuales permiten que se controle la temporización de la expresión de la glicosiltransferasa o enzima involucrada en la síntesis de azúcares nucleotídicos. Para *E. coli* y otras células hospedadoras bacterianas, aquellos expertos en la materia conocen promotores inducibles. Los mismos incluyen, por ejemplo, el promotor *lac*, el promotor P_L del bacteriófago lambda, el promotor híbrido *trp-lac* (Amann et al. (1983) Gene 25: 167, de Boer et al., (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80: 21), y el promotor del bacteriófago T7 (Studier et al. (1986) J. Mol. Biol.; Tabor et al. (1985) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82: 1074-8). Estos promotores y su uso se describen en Sambrook et al., *supra*. Un promotor inducible particularmente preferido, para la expresión en procariontes es un promotor dual que incluye un componente de promotor *tac* enlazado con un componente de promotor obtenido a partir de un gen o genes que codifican enzimas involucrados en el metabolismo de la galactosa (por ejemplo, un promotor de un gen de UDP galactosa 4-epimerasa (*galE*)). El promotor dual *tac-gal* se describe en la publicación de solicitud de patente PCf n.º WO 98/20111.

30 **[0103]** A un constructo que incluye un polinucleótido de interés enlazado operativamente con señales de control de expresión génica que, cuando se sitúan en una célula hospedadora apropiada, impulsan la expresión del polinucleótido se le denomina "casete de expresión". Los casetes de expresión que codifican las proteínas de fusión de la invención se sitúan frecuentemente en vectores de expresión para su introducción en la célula hospedadora. Los vectores incluyen típicamente, además de un casete de expresión, una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique independientemente en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas. Alternativamente, el vector puede replicarse al llegar a integrarse en el complemento genómico de la célula hospedadora y al replicarse a medida que la célula experimenta la replicación de ADN. Un vector de expresión preferido, para la expresión de las enzimas, en células bacterianas es el pTGK, que incluye un promotor dual *tac-gal* y se describe en la publicación de solicitud de patente PCT n.º WO98/20111.

45 **[0104]** La construcción de constructos polinucleotídicos requiere generalmente el uso de vectores capaces de replicarse en bacterias. Hay disponible comercialmente una plétora de kits para la purificación de plásmidos de bacterias (véase, por ejemplo, EasyPrepJ, FlexiPrepJ, ambos de Pharmacia Biotech; StrataCleanJ, de Statagene; y, QIAexpress Expression System, Qiagen). A continuación, los plásmidos aislados y purificados se pueden manipular adicionalmente para producir otros plásmidos, y se pueden usar para transfectar células. También es posible la clonación en *Streptomyces* o *Bacillus*.

50 **[0105]** En los vectores de expresión usados para expresar los polinucleótidos de la invención se incorporan frecuentemente marcadores seleccionables. Estos genes pueden codificar un producto génico, tal como una proteína, necesario para la supervivencia o crecimiento de células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, tales como ampicilina, neomicina, kanamicina, cloranfenicol, o tetraciclina. Alternativamente, marcadores seleccionables pueden codificar proteínas que complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos. Frecuentemente, el vector tendrá un marcador seleccionable que es funcional en, por ejemplo, *E. coli*, u otras células en las que el vector se replica antes de ser introducido en la célula hospedadora. Aquellos expertos en la materia conocen varios marcadores seleccionables y los mismos se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *supra*.

60 **[0106]** La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente utiliza técnicas de ligación convencionales según se describe en las referencias antes citadas. Fragmentos de ADN o plásmidos aislados se escinden, personalizan, y se re-ligan en la forma deseada para generar los

plásmidos requeridos. Para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, los plásmidos se pueden analizar por técnicas convencionales tales como mediante digestión de endonucleasa de restricción, y/o secuenciación según métodos conocidos. Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines son conocidas en la técnica. Los expertos conocen ampliamente una extensa variedad de métodos de clonación y amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. En Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1998 Supplement) (Ausubel), se encuentran ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para la orientación de personas expertas, a través de muchos ejercicios de clonación.

[0107] En la técnica se conoce ampliamente una variedad de vectores comunes adecuados para ser usados con materiales de partida con el fin de construir los vectores de expresión de la invención. Para la clonación en bacterias, los vectores comunes incluyen vectores derivados de pBR322 tales como pBLUESCMTM, y vectores derivados del fago λ . En la levadura, los vectores incluyen plásmidos de integración de Levadura (por ejemplo, YIp5) y plásmidos de Replicación de Levadura (los plásmidos de la serie YRp) y pGPD-2. La expresión en células de mamíferos se puede lograr usando una variedad de plásmidos disponibles comúnmente, incluyendo pSV2, pBC12BI y p91023, así como vectores de virus líticos (por ejemplo, virus vaccinia, adeno virus, y baculovirus), vectores de virus episomales (por ejemplo, virus del papiloma bovino), y vectores retrovirales (por ejemplo, retrovirus murinos).

[0108] Los métodos para introducir los vectores de expresión en una célula hospedadora escogida no son particularmente críticos, y dichos métodos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, los vectores de expresión se pueden introducir en células procariotas, incluyendo *E. coli*, mediante transformación con cloruro de calcio, y en células eucariotas mediante tratamiento con fosfato de calcio o electroporación. Son también adecuados otros métodos de transformación.

[0109] Para potenciar la expresión se puede usar el acoplamiento traduccional. La estrategia usa un marco de lectura abierto, corto, situado aguas arriba, derivado de un gen altamente expresado nativo con respecto al sistema traduccional, que se sitúa aguas abajo del promotor, y un sitio de unión al ribosoma seguido, después de unos pocos codones de aminoácidos, por un codón de terminación. Justo antes del codón de terminación se encuentra un segundo sitio de unión al ribosoma, y después del codón de terminación se encuentra un codón de inicio para la iniciación de la traducción. El sistema disuelve la estructura secundaria en el ARN, permitiendo la iniciación eficaz de la traducción. Véase Squires, et. al. (1988), J. Biol. Chem. 263: 16297-16302.

[0110] Las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa se pueden expresar intracelularmente, o pueden ser secretadas desde la célula. La expresión intracelular da como resultado frecuentemente unos rendimientos elevados. Si fuera necesario, la cantidad de proteína de fusión activa, soluble, se puede incrementar para realizar procedimientos de replegamiento (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra.*; Marston et al., Bio/Technology (1984) 2: 800; Schoner et al., Bio/Technology (1985) 3:151). En realizaciones en las que las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa son secretadas desde la célula, o bien hacia el periplasma o bien hacia el medio extracelular, la secuencia de ADN se enlaza con una secuencia de péptido señal escindible. La secuencia señal dirige la translocación de la proteína de fusión a través de la membrana celular. Un ejemplo de un vector adecuado para ser usado en *E. coli* que contiene una unidad de promotor-secuencia señal es pTA1529, que tiene el promotor *phoA* de *E. coli* y una secuencia señal (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra.*; Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1985) 82: 7212; Talmadge et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 3988; Takahara et al., J. Biol. Chem. (1985) 260: 2670). En otra realización, las proteínas de fusión se fusionan con una subsecuencia de proteína A o seroalbúmina bovina (BSA), por ejemplo, para facilitar la purificación, la secreción, o la estabilidad.

[0111] Las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de la invención también se pueden enlazar adicionalmente con otras proteínas bacterianas. Este planteamiento da como resultado frecuentemente rendimientos elevados, debido a que secuencias de control procariotas normales dirigen la transcripción y la traducción. En *E. coli*, se usan frecuentemente fusiones *lacZ* para expresar proteínas heterólogas. Hay disponibles fácilmente vectores adecuados, tales como las series pUR, pEX, y pMR100 (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra.*). Para ciertas aplicaciones, puede resultar deseable escindir los aminoácidos de enzimas accesorias y/o que no son glicosiltransferasa con respecto a la proteína de fusión después de la purificación. Esto se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo escisión con bromuro de cianógeno, una proteasa, o con el Factor X_a (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra.*; Itakura et al., Science (1977) 198: 1056; Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1979) 76: 106; Nagai et al., Nature (1984) 309: 810; Sung et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1986) 83: 561). Se pueden obtener por ingeniería genética sitios de escisión en el gen para la proteína de fusión en el punto deseado de escisión.

[0112] En una única célula hospedadora se puede expresar más de una proteína recombinante, situando múltiples casetes de transcripción en un único vector de expresión, o utilizando diferentes marcadores seleccionables para cada uno de los vectores de expresión que se utilizan en la estrategia de clonación.

5 [0113] Un sistema adecuado para obtener proteínas recombinantes de *E. coli* que mantiene la integridad de sus extremos N-terminales ha sido descrito por Miller et al. *Biotechnology* 7:698-704 (1989). En este sistema, el gen de interés se produce como una fusión C-terminal con los primeros 76 residuos del gen de ubiquitina de levadura que contiene un sitio de escisión de peptidasa. La escisión en la unión de las dos fracciones da como resultado la producción de una proteína que tiene un residuo N-terminal auténtico intacto.

D. Purificación de proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa

10 [0114] Las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* de la presente invención se pueden expresar como proteínas intracelulares o como proteínas que son secretadas desde la célula, y pueden usarse en esta forma, en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, en los métodos de la presente invención se puede usar un extracto celular crudo que contiene la proteína de fucosiltransferasa de *H. pylori* secretada o intracelular expresada.

15 [0115] Alternativamente, las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* se pueden purificar según procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification.*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras con una homogeneidad de por lo menos aproximadamente entre el 70 y el 90 %, y las más preferidas son con una homogeneidad de entre el 98 y el 99 % o mayor. Las proteínas purificadas también se pueden usar, por ejemplo, como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

25 [0116] Para facilitar la purificación de las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* de la invención, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión pueden incluir también una secuencia codificante para un epítipo o "etiqueta" para la cual haya disponible un reactivo de unión por afinidad, es decir, una etiqueta de purificación. Entre los ejemplos de epítopos adecuados se incluyen los genes indicadores myc y V-5; hay disponibles comercialmente vectores de expresión útiles para la producción recombinante de proteínas de fusión que tienen estos epítopos (por ejemplo, los vectores pcDNA3.1/Myc-His y pcDNA3.1/V5-His de Invitrogen (Carlsbad CA) son adecuados para la expresión en células de mamíferos). Aquellos expertos en la materia conocen vectores de expresión adicionales adecuados para fijar una etiqueta a las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* de la invención, y sistemas de detección correspondientes, y hay comercialmente disponibles varios de ellos (por ejemplo, FLAG" (Kodak, Rochester NY). Otro ejemplo de una etiqueta adecuada es una secuencia de polihistidina, que es capaz de unirse a ligandos de afinidad de quelatos metálicos. Típicamente, se usan seis histidinas adyacentes (ID SEC N.º:76), aunque se puede usar un número mayor o menor de seis. Los ligandos adecuados de afinidad de quelatos metálicos que pueden servir como fracción de unión para una etiqueta de polihistidina incluyen el ácido nitrilo-tri-acético (NTA) (Hochuli, E. (1990) "Purification of recombinant proteins with metal chelating adsorbents" en *Genetic Engineering: Principles and Methods*, J.K.- Setlow, Ed., Plenum Press, NY; disponible comercialmente en Qiagen (Santa Clarita, CA)).

40 [0117] Las etiquetas de purificación incluyen también dominios de unión a maltosa y dominios de unión a almidón. Los expertos en la materia conocen la purificación de proteínas con dominios de unión a maltosa. Los dominios de unión a almidón se describen en el documento WO 99/15636. La purificación por afinidad de una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a almidón usando una resina derivada de betaciclodextrina (BCD) se describe en el documento USSN 60/468.374, presentado el 5 de mayo de 2003.

45 [0118] Aquellos expertos en la materia conocen otros haptenos que son adecuados para su uso como etiquetas, y los mismos se describen, por ejemplo, en el *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (6ª Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR). Por ejemplo, son útiles como haptenos el dinitrofenol (DNP), la digoxigenina, barbitúricos (véase, por ejemplo, la patente US n.º 5.414.085), y varios tipos de fluoróforos, así como lo son también los derivados de estos compuestos. Hay kits comercialmente disponibles para enlazar haptenos y otras fracciones a proteínas y otras moléculas. Por ejemplo, cuando el hapteno incluye un tiol, se puede usar un enlazador heterobifuncional tal como SMCC para fijar la etiqueta a residuos de lisina presentes en el reactivo de captura.

55 [0119] Los expertos reconocerán que se pueden realizar modificaciones en los dominios catalíticos o funcionales de α -1,3/4-fucosiltransferasa sin disminuir su actividad biológica. Se pueden realizar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación del dominio catalítico en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, la adición de codones en cualquiera de los extremos terminales del polinucleótido que codifica el dominio catalítico para proporcionar, por ejemplo, una metionina adicionada en el extremo terminal amino con el fin de proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) situados en cualquiera de los extremos terminales para crear sitios enzimáticos de restricción situados adecuadamente o codones de terminación o secuencias de purificación.

60

E. Usos de las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori*

[0120] La invención proporciona proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* y métodos de uso de las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* para sintetizar enzimáticamente glicoproteínas, glicolípidos, y fracciones de

oligosacáridos. Las reacciones de glicosiltransferasa de la invención tienen lugar en un medio de reacción que comprende por lo menos una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*, un sustrato aceptor, y un sustrato dador, y típicamente un catión metálico divalente soluble. En algunas realizaciones, también hay presentes enzimas accesorias y sustratos para la fracción catalítica de la enzima accesorias, de manera que las enzimas accesorias pueden sintetizar el sustrato dador para la α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori*.

[0121] Se conocen varios métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar glicoproteínas y glicolípidos que tienen fracciones de oligosacárido deseadas. Se describen métodos ejemplificativos, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito et al. (1993) Pure Appl. Chem. 65: 753, y las patentes US 5.352.670, 5.374.541, y 5.545.553.

[0122] Las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* preparadas tal como se describe en el presente documento se pueden usar en combinación con glicosiltransferasas adicionales. Por ejemplo, se puede usar una combinación de proteína de fusión de sialiltransferasa recombinante y una α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* recombinante. Efectuando dos reacciones de glicosiltransferasa secuencialmente en un único recipiente, se mejoran los rendimientos globales con respecto a procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Por otra parte, se reduce la limpieza y eliminación de disolventes y subproductos adicionales. De forma similar, las glicosiltransferasas recombinantes se pueden usar con una enzima accesorias recombinante, que puede estar presente o no como proteína de fusión. En otras realizaciones, en la misma célula se producen la α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* y glicosiltransferasas adicionales o enzimas accesorias, y las mismas se usan para sintetizar un producto final deseado.

[0123] Los productos generados mediante los anteriores procesos se pueden usar sin purificación. No obstante, se pueden usar técnicas bien conocidas, convencionales, por ejemplo, cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía de intercambio iónico, o filtración con membrana, para la recuperación de sacáridos glicosilados. Además, se puede usar, por ejemplo, la filtración con membrana, utilizando una membrana de nanofiltración o de osmosis inversa según se describe en la patente AU de cesión común n.º 735695. Como ejemplo adicional, para extraer proteínas se puede usar una filtración con membrana en la que las membranas tengan un valor de corte del peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 10.000 Daltons. Como ejemplo alternativo, a continuación se puede usar la nanofiltración u osmosis inversa para extraer sales. Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de osmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero retienen sales polivalentes y solutos no cargados mayores que entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1.000 Daltons, dependiendo de la membrana usada. De este modo, por ejemplo, los oligosacáridos producidos por las composiciones y métodos de la presente invención se pueden retener en la membrana y las sales contaminantes pasarán a través de ella.

F. Sustratos dadores y sustratos aceptores

[0124] Los sustratos dadores adecuados usados por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y otras glicosiltransferasas en los métodos de la invención incluyen, entre otros, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA, y ácido CMP-sialico. Guo et al., Applied Biochem. and Biotech. 68: 1-20 (1997)

[0125] Los sustratos aceptores adecuados usados por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y métodos de la invención incluyen, entre otros, polisacáridos, oligosacáridos, lípidos y glicolípidos. Por ejemplo, el oligosacárido LNnT se puede fucosilar para formar LNFIII. Las fucosiltransferasas descritas en el presente documento se pueden utilizar también en sistemas de múltiples enzimas para producir un producto deseado a partir de un material inicial adecuado. Por ejemplo, se preparó LNFIII en una escala multigramo a partir de lactosa usando las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* de la cepa 1182 descrita en el presente documento, en combinación con β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa (IgtA) de *Neisseria gonococcus* y β -1,4-galactosiltransferasa (IgtB) de *Neisseria gonococcus*.

[0126] Los sustratos aceptores adecuados usados por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención incluyen, entre otros, proteínas, lípidos, gangliósidos y otras estructuras biológicas (por ejemplo, células enteras) que pueden ser modificadas por los métodos de la invención. Las estructuras ejemplificativas, que se pueden modificar por los métodos de la invención, incluyen cualquiera de una serie de glicolípidos, glicoproteínas y estructuras de carbohidratos en células conocidas para aquellos expertos en la materia según se expone en la Tabla 1.

Tabla 1

<p><u>Hormonas y Factores de Crecimiento</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • G-CSF • GM-CSF • TPO • EPO • variantes de EPO • α-TNF • Leptina <p><u>Enzimas e Inhibidores</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • t-PA • variantes de t-PA • Uroquinasa • Factores VII, VIII, IX, X • • ADNasa • <u>Glucocerebrosidasa</u> • Hirudina • Antitripsina α1 • Antitrombina III <p><u>Citoquinas y Citoquinas</u></p> <p><u>Quiméricas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Interleucina-1 (IL-1), 1B, 2, 3, 4 • Interferón-α (IFN-α) • IFN-α-2b • IFN-β • IFN-γ • Toxina diftérica • quimérica-IL-2 	<p><u>Receptores y Receptores Quiméricos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • CD4 • Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) • Alfa-CD20 • MAb-CD20 • MAb-alfa-CD3 • MAb-receptor TNF • MAb-CD4 • PSGL-1 • MAb-PSGL-1 • Complemento • GlyCAM o su quimera • N-CAM o su quimera LFA-3 • CTLA-IV <p><u>Anticuerpos Monoclonales (Inmunoglobulinas)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • MAb-anti-RSV • MAb-anti-receptor IL-2 • MAb-anti-CEA • MAb-anti-receptor IIb/IIIa plaquetario • MAb-anti-EGF • MAb-anti-receptor Her-2 <p><u>Células</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Glóbulos rojos • Glóbulos blancos (por ejemplo, células T, células B, células dendríticas, macrófagos células NK, neutrófilos, monocitos y similares) • Células madre
--	---

5 **[0127]** Se describen ejemplos de sustratos aceptores adecuados, usados en reacciones catalizadas con fucosiltransferasa, y ejemplos de sustratos aceptores adecuados usados en reacciones catalizadas con sialiltransferasa en Guo et al., Applied Biochem. and Biotech. 68: 1-20 (1997), aunque sin limitarse a este último.

10 **[0128]** La presente invención proporciona proteínas de fucosiltransferasa (por ejemplo, fucosiltransferasas) de *H. pylori* que se seleccionan por su capacidad de producir glicoproteínas y glicolípidos que tienen fracciones oligosacárido deseadas. De manera similar, se escogen enzimas accesorias, si las mismas estuvieran presentes, basándose en un sustrato de azúcar activado deseado o en un azúcar que se encuentre en el oligosacárido del producto.

15 **[0129]** Se pueden identificar fácilmente proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* adecuadas haciendo reaccionar varias cantidades de una proteína de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* de interés (por ejemplo, entre 0,01 y 100 mU/mg de proteína) con una glicoproteína (por ejemplo, a entre 1 y 10 mg/ml) a la cual está enlazado un oligosacárido que tiene un sitio aceptor potencial para la glicosilación por la proteína de fusión de interés. Se comparan las capacidades de las proteínas de fusión de glicosiltransferasa recombinante de la presente invención de adicionar un residuo de azúcar en el sitio aceptor deseado, y se selecciona una proteína de fucosiltransferasa de *H. pylori* que tenga la propiedad deseada (por ejemplo, especificidad del sustrato aceptor o actividad catalítica).

20 **[0130]** En general, la eficacia de la síntesis enzimática de glicoproteínas y glicolípidos, que tengan fracciones de oligosacárido deseadas, se puede potenciar a través del uso de proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* producidas de manera recombinante, de la presente invención. Las técnicas recombinantes posibilitan la producción de las proteínas de α -1,3/4-fucosiltransferasa de *H. pylori* recombinantes en las cantidades elevadas que se necesitan para la modificación a gran escala de glicoproteínas y glicolípidos.

25 **[0131]** Las glicoproteínas y glicolípidos adecuados para su uso por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención pueden ser glicoproteínas y glicolípidos inmovilizados en un soporte sólido durante la reacción

de glicosilación. La expresión “soporte sólido” abarca también soportes semisólidos. Preferentemente, la glicoproteína o glicolípido diana se inmoviliza de manera reversible de modo que la glicoproteína o glicolípido respectivo se pueda liberar después de que se haya completado la reacción de glicosilación. Aquellos expertos en la materia conocen muchas matrices adecuadas. Se puede utilizar, por ejemplo, el intercambio iónico para inmovilizar temporalmente una glicoproteína o glicolípido en una resina apropiada mientras la reacción de glicosilación avanza. También se puede usar un ligando que se una específicamente a la glicoproteína o glicolípido de interés para una inmovilización basada en afinidad. Por ejemplo, son adecuados anticuerpos que se unen específicamente a una glicoproteína. Además, cuando la propia glicoproteína de interés sea un anticuerpo o contenga un fragmento del mismo, como resina de afinidad se puede usar la proteína A ó G. Son también adecuados colorantes y otras moléculas que se unen específicamente a una glicoproteína o glicolípido de interés.

[0132] La proteína de fusión recombinante de la invención se puede construir y expresar como una proteína de fusión con una “etiqueta” molecular en un extremo, lo cual facilita la purificación de la proteína, es decir, una etiqueta de purificación. Dichas etiquetas se pueden usar también para la inmovilización de una proteína de interés durante la reacción de glicosilación. Las etiquetas adecuadas incluyen “etiquetas epitópicas”, que son una secuencia proteica que es reconocida específicamente por un anticuerpo. Las etiquetas epitópicas se incorporan generalmente en proteínas de fusión para permitir el uso de un anticuerpo fácilmente disponible con el fin de detectar o aislar de manera inequívoca la proteína de fusión. Una “etiqueta FLAG” es una etiqueta epitópica usada comúnmente, reconocida específicamente por un anticuerpo anti-FLAG monoclonal, que consiste en la secuencia AspTyrLysAspAspAspLys (ID SEC N.º:75) o una variante de la misma sustancialmente idéntica. Una etiqueta mcy es otra etiqueta epitópica usada comúnmente. Aquellos expertos en la materia conocen otras etiquetas adecuadas, y las mismas incluyen, por ejemplo, una etiqueta de afinidad tal como un péptido de hexahistidina (ID SEC N.º:76), que se unirá a iones metálicos tales como iones de níquel o cobalto. Las etiquetas de purificación incluyen también dominios de unión a maltosa y dominios de unión a almidón. La purificación de proteínas con dominios de unión a maltosa es conocida por aquellos expertos en la materia. Los dominios de unión a almidón se describen en el documento WO 99/15636. La purificación por afinidad de una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a almidón usando una resina derivada de betaciclodextrina (BCD) se describe en el documento USSN 60/468.374, presentado el 5 de mayo de 2003.

[0133] Preferentemente, cuando la glicoproteína es una versión truncada de la glicoproteína de longitud completa, incluye preferentemente la subsecuencia biológicamente activa de la glicoproteína de longitud completa. Las subsecuencias biológicamente activas ejemplificativas incluyen, entre otros, sitios activos enzimáticos, sitios de unión a receptores, sitios de unión a ligandos, regiones determinantes de complementariedad de anticuerpos, y regiones antigénicas de antígenos.

[0134] En algunas realizaciones, las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la presente invención se usan para sintetizar enzimáticamente una glicoproteína o glicolípido que tiene un patrón de glicosilación sustancialmente uniforme. Las glicoproteínas y glicolípidos incluyen un sacárido u oligosacárido que está fijado a una proteína, glicoproteína, lípido, o glicolípido para el cual se desea una alteración de la glicoforma. El sacárido u oligosacárido incluye una estructura que puede funcionar como un sustrato aceptor para una glicosiltransferasa. Cuando el sustrato aceptor está glicosilado, se forma la fracción de oligosacárido deseada. La fracción de oligosacárido deseada es aquella que comunica la actividad biológica deseada a la glicoproteína o glicolípido al que está fijada. En las composiciones de la invención, el residuo de sacárido preseleccionado está enlazado con por lo menos aproximadamente el 30 % de los sitios aceptores potenciales de interés. Más preferentemente, el residuo de sacárido preseleccionado está enlazado con por lo menos aproximadamente el 50 % de los sustratos aceptores potenciales de interés, y todavía más preferentemente con por lo menos el 70 % de los sustratos aceptores potenciales de interés. En situaciones en las que la glicoproteína o glicolípido de partida presenta heterogeneidad en la fracción de oligosacárido de interés (por ejemplo, algunos de los oligosacáridos en la glicoproteína o glicolípido de partida ya tienen el residuo de sacárido preseleccionado fijado al sustrato aceptor de interés), los porcentajes mencionados incluyen dichos residuos de sacáridos fijados previamente.

[0135] El término “alterado” se refiere a la glicoproteína o glicolípido de interés que tiene un patrón de glicosilación que, después de la aplicación de las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención, es diferente con respecto al observado en la glicoproteína según ha sido producida de manera original. Un ejemplo de dichos glicoconjugados son glicoproteínas en las que las glicoformas de las glicoproteínas son diferentes de aquellas que se encuentran en la glicoproteína cuando la misma es producida por células del organismo del cual es nativo la glicoproteína. Se proporcionan también proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y métodos de uso de dichas proteínas de fusión para sintetizar enzimáticamente glicoproteínas y glicolípidos en los cuales el patrón de glicosilación de estos glicoconjugados está modificado en comparación con el patrón de glicosilación de los glicoconjugados según se producen de manera original por medio de una célula hospedadora, que puede ser de la misma especie o una especie diferente de las células a partir de las cuales se producen los glicoconjugados nativos.

[0136] Se pueden valorar diferencias en los patrones de glicosilación no solamente por análisis estructural de las glicoproteínas y glicolípidos, sino también por comparación de una o más actividades biológicas de los glicoconjugados. Por ejemplo, una glicoproteína que tenga una “glicoforma alterada” incluye aquella que presenta una mejora en una o

más actividades biológicas de la glicoproteína después de la reacción de glicosilación en comparación con la glicoproteína no modificada. Por ejemplo, un glicoconjugado alterado incluye aquel que, después de la aplicación de las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención, presenta una mayor afinidad de unión para un ligando o receptor de interés, una mayor semivida terapéutica, una antigenicidad reducida, y una focalización en tejidos específicos. La cantidad de mejora observada preferentemente es estadísticamente significativa, y más preferentemente es por lo menos de forma aproximada un 25 % de mejora, y todavía más preferentemente es por lo menos de forma aproximada un 50 %, un 60 %, un 70 %, y aún todavía más preferentemente es por lo menos es un 80 %.

G. Reacciones de fucosiltransferasa

[0137] Las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori*, los sustratos aceptores, los sustratos dadores y otros ingredientes de la mezcla de reacción, incluyendo otras glicosiltransferasas y enzimas accesorias, se combinan por mezcla en un medio de reacción acuoso. El medio en general tiene un valor de pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8,5. La selección de un medio se basa en la capacidad del medio de mantener el valor de pH en el nivel deseado. De este modo, en algunas realizaciones, el medio se tampona a un valor de pH de aproximadamente 7.5. Si no se usa un tampón, el pH del medio debería mantenerse a aproximadamente entre 5 y 8.5, dependiendo de la glicosiltransferasa particular usada. Para fucosiltransferasas, el intervalo de pH se mantiene preferentemente entre aproximadamente 6.0 y 8.0. Para sialiltransferasas, el intervalo está preferentemente entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 7.5.

[0138] Las cantidades o concentraciones de enzima se expresan en unidades de actividad, las cuales son una medida de la velocidad inicial de catálisis. Una unidad de actividad cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto a una temperatura (típicamente 37 °C) y un valor de pH (típicamente 7.5) determinados. De este modo, 10 unidades de una enzima es una cantidad catalítica de esa enzima en la que 10 μmol de sustrato se convierten en 10 μmol de producto en un minuto a una temperatura de 37 °C y un valor de pH de 7.5.

[0139] La mezcla de reacción puede incluir cationes metálicos divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}). El medio de reacción puede comprender también detergentes solubilizantes (por ejemplo, Triton o SDS) y disolventes orgánicos tales como metanol o etanol, si fuera necesario. Las enzimas se pueden utilizar libres en solución o pueden estar unidas a un soporte tal como un polímero. De este modo, la mezcla de reacción es sustancialmente homogénea en el comienzo, aunque, durante la reacción, puede formar algún precipitado.

[0140] La temperatura a la que se lleva a cabo un proceso anterior puede estar comprendida entre justo por encima de la congelación hasta la temperatura a la que se desnaturaliza la enzima más sensible. El intervalo de temperaturas está preferentemente entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 45 °C, y más preferentemente entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 37 °C.

[0141] La mezcla de reacción así formada se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para obtener el elevado rendimiento deseado de los productos oligosacáridos deseados, incluyendo determinantes presentes en grupos de oligosacáridos fijados a la glicoproteína a glicosilar. Para preparaciones de gran escala, frecuentemente la reacción se dejará avanzar durante entre aproximadamente 0,5 y 240 horas, y más típicamente entre aproximadamente 1 y 18 horas.

[0142] En realizaciones en las que se usa más de una glicosiltransferasa para obtener los productos oligosacáridos, al medio de reacción se le pueden adicionar las enzimas y reactivos para una segunda reacción de glicosiltransferasa una vez que casi se haya completado la primera reacción de glicosiltransferasa. Para algunas combinaciones de enzimas, las glicosiltransferasas y los sustratos correspondientes se pueden combinar en una única mezcla de reacción inicial; preferentemente, las enzimas en dichas reacciones simultáneas no forman un producto que no pueda servir como un aceptor para la otra enzima. Efectuando secuencialmente dos reacciones de glicosiltransferasa en un único recipiente, se mejoran los rendimientos globales con respecto a procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Por otra parte, se reduce la limpieza y eliminación de disolventes y subproductos adicionales. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la fucosiltransferasa y adicionalmente las glicosiltransferasas o enzimas accesorias se expresan en la misma célula hospedadora y el producto deseado se sintetiza dentro de la célula hospedadora.

[0143] Una o más de las reacciones de glicosiltransferasas se pueden llevar a cabo como parte de un ciclo de glicosiltransferasa. Se han descrito condiciones y descripciones preferidas de ciclos de glicosiltransferasa. En la patente U.S. n.º 5.374.541 y el documento WO 9425615 A se describe una serie de ciclos de glicosiltransferasa (por ejemplo, ciclos de sialiltransferasa, ciclos de galactosiltransferasa, y ciclos de fucosiltransferasa). Se describen otros ciclos de glicosiltransferasa en Ichikawa et al. J. Am. Chem. Soc. 114:9283 (1992), Wong et al. J. Org. Chem. 57: 4343 (1992), DeLuca et al., J. Am. Chem. Soc. 117:5869-5870 (1995), e Ichikawa et al. En Carbohydrates and Carbohydrate Polymers. Yaltami, ed. (ATL Press, 1993).

[0144] Otras glicosiltransferasas se pueden sustituir en ciclos de transferasa similares según se ha descrito detalladamente para las fucosiltransferasas y sialiltransferasas. En particular, la glicosiltransferasa puede ser también,

5 por ejemplo, glucosiltransferasas, por ejemplo, Alg8 (Stagljev et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:5977 (1994)) o Alg5 (Heesen et al. Eur. J. Biochem. 224:71 (1994)), N-acetilgalactosaminiltransferasas tales como, por ejemplo, $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferasa, $\beta(1,4)$ N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata et al. J. Biol. Chem. 267:12082-12089 (1992) y Smith et al. J. Biol. Chem. 269:15162 (1994)) y polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa et al. J. Biol. Chem. 268:12609 (1993)). Las N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.141, Hull et al., BBRC 176:608 (1991)), GnTII, y GnTIII (Ihara et al. J. Biochem. 113:692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al. J. Biol. Chem. 268: 15381 (1993)), N-acetilglucosaminiltransferasa con puentes de O (Bierhuizen et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:9326 (1992)), N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (Rajput et al. Biochem J. 285:985 (1992)), y hialuronano sintasa. Las manosiltransferasas adecuadas incluyen $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa, $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa, $\beta(1,4)$ manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1, y Pmt1.

15 **[0145]** Para los anteriores ciclos de glicosiltransferasa, las concentraciones o cantidades de los diversos reactivos usados en los procesos dependen de numerosos factores que incluyen condiciones de reacción tales como la temperatura y el valor de pH, y la elección y la cantidad de sacáridos aceptores a glicosilar. Debido a que el proceso de glicosilación permite una regeneración de nucleótidos de activación, azúcares dadores activados y depuración (*scavenging*) de PPI producida, en presencia de cantidades catalíticas de las enzimas, el proceso está limitado por las concentraciones o cantidades de los sustratos estequiométricos descritos anteriormente. El límite superior para las concentraciones de reactivos que se puede usar de acuerdo con el método de la presente invención queda determinado por la solubilidad de dichos reactivos.

20 **[0146]** Preferentemente, las concentraciones de nucleótidos de activación, dador de fosfato, el azúcar dador y las enzimas se seleccionan de tal manera que la glicosilación avanza hasta que se consume el aceptor.

25 **[0147]** Cada una de las enzimas está presente en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima en particular varía de acuerdo con la concentración del sustrato de esa enzima así como con las condiciones de reacción tales como la temperatura, el tiempo y el valor de pH. Aquellos expertos en la materia conocen bien medios para determinar la cantidad catalítica para una enzima determinada bajo concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas.

30 **[0148]** La reacción de fucosiltransferasa se puede llevar a cabo usando un oligosacárido o polisacárido como molécula aceptora. Los sustratos aceptores adecuados usados por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención incluyen, entre otros, polisacáridos, oligosacáridos, lípidos, y glicolípidos. Por ejemplo, el oligosacárido LNnT se puede fucosilar para formar LNFIII. Las fucosiltransferasas descritas en el presente documento también se pueden usar en sistemas de múltiples enzimas para producir un producto deseado a partir de un material inicial adecuado. Por ejemplo, se preparó LNFIII en una escala multigramo a partir de lactosa usando las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* de la cepa 1182 descrita en el presente documento, en combinación con β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa (1gtA) de *Neisseria gonococcus* y β -1,4-galactosiltransferasa (1gtB) de *Neisseria gonococcus*.

40 **[0149]** La proteína de fusión de fucosiltransferasa recombinante usada en los métodos de la invención se escoge basándose en su capacidad de fucosilar los sustratos aceptores de fucosiltransferasa de interés. Preferentemente, la fucosiltransferasa se somete a ensayo en relación con su idoneidad usando un sustrato aceptor de fucosiltransferasa que está fijado a un sacárido u oligosacárido soluble. El uso de un sustrato aceptor de sacárido u oligosacárido soluble en el ensayo para determinar la actividad fucosiltransferasa permite seleccionar una fucosiltransferasa que produce el producto oligosacárido deseado.

50 **[0150]** La reacción de fucosiltransferasa se puede llevar a cabo usando un lípido o glicolípidos como molécula aceptora. Muchos sacáridos requieren la presencia de estructuras fucosiladas particulares para presentar actividad biológica. Frecuentemente, los mecanismos de reconocimiento intercelular requieren un oligosacárido fucosilado. Por ejemplo, varias proteínas que funcionan como moléculas de adhesión celular, incluyendo P-selectina, E-selectina, se unen a estructuras de carbohidratos fucosiladas de superficie celular, específicas, por ejemplo, las estructuras de sialil Lewis x y sialil Lewis a. Adicionalmente, las estructuras de carbohidratos específicas que forman el sistema de grupos sanguíneos ABO están fucosiladas. Las estructuras de carbohidratos en cada uno de los tres grupos comparten una unidad Fuc α 1,2Gal β 1-disacárido. En estructuras del grupo sanguíneo O, este disacárido es la estructura terminal, la estructura del grupo A está formada por una α 1,3 GalNAc transferasa que adiciona un residuo GalNAc terminal al disacárido. La estructura del grupo B está formada por una α 1,3 galactosiltransferasa que adiciona un residuo de galactosa terminal. Las estructuras del grupo sanguíneo de Lewis están también fucosiladas. Por ejemplo, las estructuras de Lewis x y Lewis a son respectivamente Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc y Gal β 1,4(Fuc α 1,4)GlcNAc. Ambas estructuras mencionadas pueden estar además sialiladas (NeuAc α 2,3-) para formar las estructuras sialiladas correspondientes. Otras estructuras del grupo sanguíneo de Lewis de interés son las estructuras de Lewis y y b que son respectivamente Fuc α 1,2Ga β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -OR y Fuc α 1,2Ga β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc-OR. Para obtener una descripción de las estructuras de los grupos sanguíneos ABO y de Lewis y de las enzimas involucradas en su síntesis, véase, Essentials of Glycobiology, Varki et al. eds., Capítulo 16 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999).

5 **[0151]** La proteína de fusión de fucosiltransferasa recombinante usada en los métodos de la invención se escoge basándose en su capacidad de fucosilar los sustratos aceptores de fucosiltransferasa de interés. Preferentemente, la fucosiltransferasa se somete a ensayo en relación con su idoneidad usando un sustrato aceptor de fucosiltransferasa que está fijado a un lípido o glicolípido. El uso de un sustrato aceptor enlazado con glicolípido, en lugar de un sustrato aceptor que forma parte de un oligosacárido soluble, en el ensayo para determinar la actividad fucosiltransferasa permite seleccionar una fucosiltransferasa que produce el patrón de fucosilación seleccionado en el glicolípido.

10 **[0152]** Las fucosiltransferasas se han usado en rutas de síntesis para transferir una unidad de fucosa desde guanosina-5'-difosfocosa a un hidroxilo específico de un aceptor sacárido. Por ejemplo, Ichikawa preparó sialil Lewis-X por un método que conlleva la fucosilación de lactosamina sialilada con una fucosiltransferasa clonada (Ichikawa et al., J. Am. Chem. Soc. 114: 9283-9298 (1992)). Lowe ha descrito un método para expresar actividad de fucosilación no nativa en células, produciendo de este modo glicoproteínas fucosiladas, superficies celulares, etcétera (patente U.S. n.º 5.955.347).

15 **[0153]** En una realización, los métodos de la invención se llevan a la práctica haciendo entrar en contacto un sustrato, que tiene una fracción aceptora para una fucosiltransferasa, con una mezcla de reacción que incluye una fracción dadora de fucosa, una fucosiltransferasa, y otros reactivos requeridos para la actividad fucosiltransferasa. El sustrato se incuba en la mezcla de la reacción durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas, para transferir fucosa desde la fracción dadora de fucosa hacia la fracción aceptora de fucosiltransferasa. En realizaciones preferidas, la fucosiltransferasa cataliza la fucosilación de por lo menos el 60 % de las fraccionesceptoras respectivas de fucosiltransferasa en la composición.

25 **[0154]** La especificidad para un sustrato seleccionado es solamente el primer criterio que debería cumplir una fucosiltransferasa preferida. La fucosiltransferasa usada en el método de la invención también puede preferentemente someter a fucosilación de manera eficaz una variedad de sustratos, y soportar el aumento a escala de la reacción para permitir la fucosilación de por lo menos aproximadamente 500 mg de sustrato. Más preferentemente, la fucosiltransferasa soportará la escala de la reacción de fucosilación para permitir la síntesis de por lo menos aproximadamente 1 kg, y más preferentemente, por lo menos 10 kg de sustrato con requisitos de coste e infraestructura relativamente bajos.

30 **[0155]** Las fraccionesceptoras adecuadas para la fijación, catalizada con fucosiltransferasa, de un residuo de fucosa incluyen, entre otras, GlcNAc-OR, Gal β 1,3GlcNAc-OR, NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-OR, Gal β 1,4GlcNAc-OR y NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-OR, donde R es un aminoácido, un sacárido, un oligosacárido o un grupo aglicón que tiene por lo menos un átomo de carbono. R está enlazado con o forma parte de un sustrato. La fucosiltransferasa apropiada, para una reacción particular, se escoge basándose en el tipo de enlace fucosa que se desea (por ejemplo, α 2, α 3, ó α 4), el aceptor particular de interés, y la capacidad de la fucosiltransferasa de lograr el alto rendimiento deseado de fucosilación. Anteriormente se han descrito fucosiltransferasas adecuadas y sus propiedades.

40 **[0156]** Si una proporción suficiente de los oligosacáridos enlazados al sustrato, en una composición, no incluye una fracción aceptora de fucosiltransferasa, se puede sintetizar un aceptor adecuado. Por ejemplo, un método preferido para sintetizar un aceptor para una fucosiltransferasa conlleva el uso de una GlcNAc transferasa para fijar un residuo GlcNAc a una fracción aceptora de GlcNAc transferasa, que está presente en los oligosacáridos enlazados al sustrato. En realizaciones preferidas, se escoge una transferasa que tiene la capacidad de glicosilar una porción elevada de las fraccionesceptoras potenciales de interés. A continuación, el GlcNAc β -OR resultante se puede usar como aceptor para una fucosiltransferasa.

50 **[0157]** La fracción de GlcNAc β -OR resultante se puede someter a galactosilación antes de la reacción de la fucosiltransferasa, generando, por ejemplo, un residuo de Gal β 1,3GlcNAc-OR o Gal β 1,4GlcNAc-OR. En algunas realizaciones, las etapas de galactosilación y fucosilación se pueden llevar a cabo simultáneamente. Escogiendo una fucosiltransferasa que requiere el aceptor galactosilado, se forma únicamente el producto deseado. De este modo, este método conlleva:

55 (a) galactosilación de un compuesto de la fórmula GlcNAc β -OR con una galactosiltransferasa en presencia de una UDP-galactosa bajo condiciones suficientes para formar los compuestos Gal β 1,4GlcNAc β -OR o Gal β 1,3GlcNAc-OR; y
 (b) fucosilación del compuesto formado en (a) usando una fucosiltransferasa en presencia de GDP-fucosa bajo condiciones suficientes para formar un compuesto seleccionado de entre:

60 Fu α 1,2Gal β 1,4GlcNAc1 β -O1R;
 Fu α 1,2Gal β 1,3GlcNAc-OR;
 Fu α 1,2Gal β 1,4GlcNAc1 β -O1R;
 Fu α 1,2Gal β 1,3GalNAc-OR;
 Gal β 1,4(Fuc1, α 3)GlcNAc β -OR; o
 Gal β 1,3(Fu α 1,4)GlcNAc-OR.

5 **[0158]** Se pueden añadir residuos de fucosa adicionales a las estructuras anteriores incluyendo una fucosiltransferasa adicional, que tenga la actividad deseada. Por ejemplo, los métodos pueden formar determinantes de oligosacáridos tales como $\text{Fuca}1,2\text{Gal}\beta1,4(\text{Fuca}1,3)\text{GlcNAc}\beta\text{-OR}$ y $\text{Fuca}1,2\text{Gal}\beta1,3(\text{Fuca}1,4)\text{GlcNAc-OR}$. De este modo, en otra
10 realización preferida, el método incluye el uso de por lo menos dos fucosiltransferasas. Las múltiples fucosiltransferasas se usan o bien simultáneamente o bien secuencialmente. Cuando las fucosiltransferasas se usan secuencialmente, se prefiere en general que la glicoproteína no se purifique entre las múltiples etapas de fucosilación. Cuando las múltiples fucosiltransferasas se usan simultáneamente, la actividad enzimática se puede obtener a partir de dos enzimas independientes o, de manera alternativa, a partir de una única enzima que tenga más de una actividad fucosiltransferasa.

15 **[0159]** La reacción de fucosiltransferasa se puede llevar a cabo haciendo entrar en contacto proteína de fucosiltransferasa recombinante de la presente invención con una mezcla que incluye, por ejemplo, múltiples copias de una especie de glicoproteína, teniendo preferentemente una mayor parte de esta última uno o más grupos oligosacárido enlazados que incluyen un sustrato aceptor para una fucosiltransferasa; sustrato dador de fucosa; y otros reactivos requeridos para la actividad fucosiltransferasa. La glicoproteína se incubaba en la mezcla de la reacción durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas, para transferir fucosa desde un sustrato dador a un sustrato aceptor de fucosiltransferasa.

20 **[0160]** La proteína de fusión de fucosiltransferasa recombinante usada en los métodos de la invención se escoge basándose en su capacidad de fucosilación de los sustratos aceptores de fucosiltransferasa de interés. Preferentemente, la fucosiltransferasa se somete a ensayo en relación con su idoneidad usando un sustrato aceptor de fucosiltransferasa que está fijado a una glicoproteína. El uso de un sustrato aceptor enlazado a glicoproteína, en lugar de un sustrato aceptor que forma parte de un oligosacárido soluble, en el ensayo para determinar la actividad
25 fucosiltransferasa, permite seleccionar una fucosiltransferasa que produce el patrón de fucosilación seleccionado en la glicoproteína.

30 **[0161]** En una realización preferida, la proteína de fusión de fucosiltransferasa recombinante de la presente invención tiene un alto nivel de expresión en células y/o una alta actividad enzimática (por ejemplo, alta especificidad para un sustrato seleccionado y/o alta actividad catalítica). En otra realización preferida, la fucosiltransferasa es útil en un método para la fucosilación de una glicoproteína transgénica o recombinante comercialmente importante. La fucosiltransferasa usada en el método de la invención también puede preferentemente fucosilar de manera eficaz una variedad de glicoproteínas, y soportar el aumento a escala de la reacción para permitir la fucosilación de por lo menos aproximadamente 500 mg de la glicoproteína. Más preferentemente, la fucosiltransferasa soportará la escala de la
35 reacción de fucosilación para permitir la síntesis de por lo menos aproximadamente 1 kg, y más preferentemente, por lo menos 10 kg de glicoproteína recombinante con unos requisitos relativamente bajos de costes e infraestructura.

40 **[0162]** En una realización ejemplificativa, el método de la invención da como resultado la formación en una glicoproteína de por lo menos un ligando para una selectina. La confirmación de la formación de ligando se somete a ensayo de una manera operativa sondeando la capacidad de la glicoproteína de interactuar con una selectina. La interacción entre una glicoproteína y una selectina específica es medible a través de métodos con los que están familiarizados los habituales en la materia (véase, por ejemplo, Jutila et al., *J. Immunol.* 153: 3917-28 (1994); Edwards et al., *Cytometry* 43 (3): 211-6 (2001); Stahn et al., *Glycobiology* 8 : 311-319 (1998); Luo et al., *Cell Biochem* 80 (4):522-31 (2001); Dong et al., *J. Biomech.* 33 (1): 35-43 (2000); Jung et al., *J. Immunol.* 162 (11): 6755-62 (1999); Keramidaris et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 107(4): 734-8 (2001); Fieger et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1524(1): 75-85 (2001); Bruehl et al., *J. Biol. Chem.* 275(42): 32642-8 (2000); Tangemann et al., *J. Exp. Med.* 190(7): 935-42 (1999); Scalia et al., *Circ. Res.* 84(1): 93-102 (1999); Alon et al., *J. Cell Biol.* 138(5): 1169-80 (1997); Steegmaier et al., *Eur. J. Immunol.* 27(6): 1339-45 (1997); Stewart et al., *J. Med. Chem.* 44(6): 988-1002 (2001); Schurmann et al., *Gut* 36(3): 411-8 (1995); Burrows et al., *J. Clin. Pathol.* 47(10): 939-44 (1994)).

50 **[0163]** Los sustratos aceptores adecuados para la fijación, catalizada con fucosiltransferasa, de un residuo de fucosa incluyen, entre otros, GlcNAc-OR , $\text{Gal}\beta1,3\text{GlcNAc-OR}$, $\text{NeuAc}\alpha2,3\text{Gal}\beta1,3\text{GlcNAc-OR}$, $\text{Gal}\beta1,4\text{GlcNAc-OR}$ y $\text{NeuAc}\alpha2,3\text{Gal}\beta1,4\text{GlcNAc-OR}$, donde R es un aminoácido, un sacárido, un oligosacárido o un grupo aglicón que tiene por lo menos un átomo de carbono. R está enlazado a o forma parte de una glicoproteína. La fucosiltransferasa apropiada para una reacción particular se escoge basándose en el tipo de enlace fucosa que se desea (por ejemplo, $\alpha2$, $\alpha3$, ó $\alpha4$), el aceptor particular de interés, y la capacidad de la fucosiltransferasa de lograr el alto rendimiento deseado de fucosilación. Anteriormente se han descrito fucosiltransferasas adecuadas y sus propiedades.

60 **[0164]** Si una proporción suficiente de los oligosacáridos enlazados a glicoproteína en una composición no incluye un sustrato aceptor de fucosiltransferasa, se puede sintetizar un aceptor adecuado. Por ejemplo, un método preferido para sintetizar un aceptor para una fucosiltransferasa conlleva el uso de una GlcNAc transferasa para fijar un residuo GlcNAc a un sustrato aceptor de GlcNAc transferasa, que está presente en los oligosacáridos enlazados a proteína. En realizaciones preferidas, se escoge una transferasa que tiene la capacidad de glicosilar una porción elevada de los

sustratos aceptores potenciales de interés. A continuación, el GlcNAc β -OR resultante se puede usar como aceptor para una fucosiltransferasa.

[0165] La fracción de GlcNAc β -OR resultante se puede someter a galactosilación antes de la reacción de la fucosiltransferasa, generando, por ejemplo, un residuo de Gal β 1,3GlcNAc-OR o Gal β 1,4GlcNAc-OR. En algunas realizaciones, las etapas de galactosilación y fucosilación se pueden llevar a cabo simultáneamente. De este modo, este método conlleva:

(a) galactosilación de un compuesto de la fórmula GlcNAc β -OR con una galactosiltransferasa en presencia de una UDP-galactosa bajo condiciones suficientes para formar los compuestos Gal β 1,4GlcNAc β -OR o Gal β 1,3GlcNAc-OR; y

(b) fucosilación del compuesto formado en (a) usando una fucosiltransferasa en presencia de GDP-fucosa bajo condiciones suficientes para formar un compuesto seleccionado de entre:

Fuca1,2Gal β 1,4GlcNAc1 β -O1R;
 Fuca1,2Gal β 1,3GlcNAc-OR;
 Fuca1,2Gal β 1,4GlcNAc1 β -O1R;
 Fuca1,2Gal β 1,3GalNAc-OR;
 Gal β 1,4(Fuc1, α 3)GlcNAc β -OR; o
 Gal β 1,3(Fuca1,4)GlcNAc-OR.

[0166] Se pueden añadir residuos de fucosa adicionales a una glicoproteína fucosilada tratando el péptido fucosilado con una fucosiltransferasa, que tenga la actividad deseada. Por ejemplo, los métodos pueden formar determinantes de oligosacáridos tales como Fuca1,2Gal β 1,4(Fuca1,3)GlcNAc β -OR y Fuca1,2Gal β 1,3(Fuca1,4)GlcNAc-OR. De este modo, en otra realización preferida, el método incluye el uso de por lo menos dos fucosiltransferasas. Las múltiples fucosiltransferasas se usan o bien simultáneamente o bien secuencialmente. Cuando las fucosiltransferasas se usan secuencialmente, se prefiere en general que la glicoproteína no se purifique entre las múltiples etapas de fucosilación. Cuando las múltiples fucosiltransferasas se usan simultáneamente, la actividad enzimática se puede obtener a partir de dos enzimas independientes o, de manera alternativa, a partir de una única enzima que tenga más de una actividad fucosiltransferasa.

H. Síntesis de oligosacáridos con múltiples enzimas

[0167] Tal como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, se pueden usar dos o más enzimas para formar un oligosacárido o determinante de oligosacárido deseado en una glicoproteína o glicolípido. Por ejemplo, un determinante de oligosacárido particular podría requerir la adición de una galactosa, un ácido siálico, y una fucosa para presentar una actividad deseada. Por consiguiente, la invención proporciona métodos en los cuales se usan dos o más enzimas, por ejemplo, glicosiltransferasas, trans-sialidasas, o sulfotransferasas, para obtener una síntesis de alto rendimiento de un determinante de oligosacárido deseado.

[0168] En una realización preferida, se preparó LNFIII a partir de lactosa usando las α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* de la cepa 1182 descrita en el presente documento, en combinación con β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa (1gtA) de *Neisseria gonococcus* y β -1,4-galactosiltransferasa (1gtB) de *Neisseria gonococcus*. Aquellos expertos reconocerán que en esta realización de la invención se pueden usar otras enzimas de β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa y β -1,4-galactosiltransferasa.

[0169] En algunos casos, un oligosacárido enlazado a glicoproteína o glicolípido incluirá un sustrato aceptor para la glicosiltransferasa particular de interés al producirse la biosíntesis *in vivo* de la glicoproteína o glicolípido. Dichas glicoproteínas o glicolípidos se pueden someter a glicosilación usando las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención sin una modificación previa del patrón de glicosilación de la glicoproteína o glicolípido, respectivamente. No obstante, en otros casos, una glicoproteína o glicolípido de interés carecerá de un sustrato aceptor adecuado. En tales casos, los métodos de la invención se pueden usar para alterar el patrón de glicosilación de la glicoproteína o glicolípido de manera que los oligosacáridos enlazados a la glicoproteína o glicolípido incluyan entonces un sustrato aceptor para la fijación, catalizada con glicosiltransferasa, de una unidad de sacárido preseleccionado de interés para formar una fracción de oligosacárido deseada.

[0170] Los oligosacáridos enlazados a glicoproteína o glicolípido en primer lugar, opcionalmente, se pueden "recortar" ("*trimmed*"), o bien en su totalidad o bien en parte, para dejar al descubierto o bien un sustrato aceptor para la glicosiltransferasa o bien una fracción a la cual se pueden adicionar uno o más residuos apropiados para obtener un sustrato aceptor adecuado. Para las reacciones de fijación y recorte ("*trimming*") son útiles enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas. Por ejemplo, una glicoproteína que presenta oligosacáridos del tipo "altos en manosa" se pueden someter a recorte ("*trimming*") por medio de una manosidasa para obtener un sustrato aceptor que, al producirse la fijación de una o más unidades de sacárido preseleccionadas, forma el determinante de oligosacárido deseado.

5 [0171] Los métodos son también útiles para sintetizar una fracción de oligosacárido deseada en una proteína o lípido que, en su forma nativa, no está glicosilado. Un sustrato aceptor adecuado para la glicosiltransferasa correspondiente se puede fijar a dichas proteínas o lípidos antes de la glicosilación usando los métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, la patente US n.º 5.272.066 para consultar métodos de obtención de polipéptidos que tienen aceptores adecuados para la glicosilación.

10 [0172] De este modo, en algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para la sialilación *in vitro* de grupos de sacáridos presentes en un glicoconjugado que en primer lugar conlleva la modificación del glicoconjugado para crear un aceptor adecuado. Los siguientes son ejemplos de métodos preferidos de síntesis, con múltiples enzimas, de fracciones de oligosacáridos deseadas.

Fracciones de oligosacárido fucosiladas y sialiladas

15 [0173] Los determinantes de oligosacáridos que confieren una actividad biológica deseada sobre una glicoproteína con frecuencia se someten a sialilación además de someterse a fucosilación. Por consiguiente, la invención proporciona métodos en los que un oligosacárido enlazado a glicoproteína se somete a sialilación y fucosilación con altos rendimientos.

20 [0174] La sialilación se puede lograr usando o bien una trans-sialidasa o bien una sialiltransferasa, excepto cuando una fracción particular requiera un ácido siálico con enlace $\alpha 2,6$, en la cual se usa una sialiltransferasa. Anteriormente se han descrito ejemplos adecuados de cada tipo de enzima. Estos métodos conllevan la sialilación de un aceptor para una sialiltransferasa o una trans-sialidasa haciendo entrar en contacto el aceptor con la enzima apropiada en presencia de un sustrato dador apropiado. Para sialiltransferasas, el ácido CMP-siálico es un sustrato dador preferido. No obstante, las trans-sialidasas usan preferentemente un sustrato dador que incluye un grupo saliente al cual la trans-sialidasa no puede adicionar ácido siálico.

30 [0175] Los sustratos aceptores de interés incluyen, por ejemplo, Gal β -OR. En algunas realizaciones, los sustratos aceptores se hacen entrar en contacto con una sialiltransferasa en presencia de ácido CMP-siálico bajo condiciones en las que se transfiere ácido siálico al extremo no reductor del sustrato aceptor para formar el compuesto NeuAc $\alpha 2,3$ Gal β -OR o NeuAc $\alpha 2,6$ Gal β -OR. En esta fórmula, R es un aminoácido, un sacárido, un oligosacárido o un grupo aglicón que tiene por lo menos un átomo de carbono. R está enlazado con o es parte de una glicoproteína. También se puede usar una $\alpha 2,8$ -sialiltransferasa para fijar un segundo residuo de ácido siálico o múltiples residuos de ácido siálico a las estructuras anteriores.

35 [0176] Para obtener una fracción de oligosacárido que esté tanto sialilada como fucosilada, el aceptor sialilado se hace entrar en contacto con una fucosiltransferasa tal como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de sialiltransferasa y fucosiltransferasa se efectúan en general secuencialmente, puesto que la mayoría de las sialiltransferasas no están activas en un aceptor fucosilado. No obstante, FT VII actúa únicamente sobre un sustrato aceptor sialilado. Por lo tanto, FTVII se puede usar en una reacción simultánea con una sialiltransferasa.

40 [0177] Si la trans-sialidasa se usa para lograr la sialilación, las reacciones de fucosilación y sialilación se pueden efectuar o bien simultáneamente o bien secuencialmente, en cualquier orden. La proteína a modificar se incuba con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una trans-sialidasa, un sustrato dador de ácido siálico, una fucosiltransferasa (capaz de crear un enlace $\alpha 1,3$ ó $\alpha 1,4$), y un sustrato dador de fucosil adecuado (por ejemplo, GDP-fucosa).

Determinantes de oligosacáridos galactosilados, fucosilados y sialilados

50 [0178] La invención proporciona también métodos para sintetizar enzimáticamente fracciones de oligosacáridos que están galactosiladas, fucosiladas y sialiladas. En estos métodos se puede usar o bien una sialiltransferasa o bien una trans-sialidasa (para ácido siálico con enlace $\alpha 2,3$ únicamente).

55 [0179] La reacción de la trans-sialidasa conlleva la incubación de la proteína a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (gal $\beta 1,3$ ó gal $\beta 1,4$), un dador de galactosil adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa), una trans-sialidasa, un sustrato dador de ácido siálico adecuado, una fucosiltransferasa (capaz de crear un enlace $\alpha 1,3$ ó $\alpha 1,4$), un sustrato dador de fucosil adecuado (por ejemplo, GDP-fucosa), y un ión metálico divalente. Estas reacciones se pueden llevar a cabo de forma o bien secuencial o bien simultánea.

60 [0180] Si se usa una sialiltransferasa, el método conlleva la incubación de la proteína a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (gal $\beta 1,3$ ó gal $\beta 1,4$), un dador de galactosil adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa), una sialiltransferasa ($\alpha 2,3$ ó $\alpha 2,6$) y un sustrato dador de ácido siálico adecuado (por ejemplo, ácido CMP siálico). La reacción se deja avanzar sustancialmente hasta que se complete, y a continuación una fucosiltransferasa (capaz de crear un enlace $\alpha 1,3$ ó $\alpha 1,4$) y un sustrato dador de fucosil adecuado (por

ejemplo, GDP-fucosa). Si se usa una fucosiltransferasa que requiere un sustrato sialilado (por ejemplo, FT VII), las reacciones se pueden efectuar simultáneamente.

Reacciones de sialiltransferasa

5

[0181] Tal como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fucosiltransferasa de *H. pylori* y métodos para la fucosilación de una glicoproteína tras la sialilación de la glicoproteína. En una realización preferida, las proteínas de fusión y los métodos de la invención sintetizan glicoproteínas que tienen un patrón de sialilación sustancialmente uniforme. A continuación se efectúa la fucosilación de la glicoproteína sialilada, produciendo de este modo una población de glicoproteínas fucosiladas en las que los miembros tienen un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme.

10

[0182] La glicoproteína se puede hacer entrar en contacto con una sialiltransferasa y un sustrato dador de ácido siálico durante un tiempo suficiente y bajo condiciones de reacción apropiadas, para transferir ácido siálico desde el sustrato dador de ácido siálico hacia los grupos de sacáridos. Las sialiltransferasas comprenden una familia de glicosiltransferasas que transfieren ácido siálico desde el ácido CMP-siálico del sustrato dador a los sustratos de oligosacárido aceptores. En realizaciones preferidas, las sialiltransferasas son proteínas de fusión de sialiltransferasa recombinantes. En la solicitud provisional US n.º 60/035.710, presentada el 16 de enero de 1997, y la solicitud no provisional US n.º 09/007.741, presentada el 15 de enero de 1998, se describen reacciones de sialiltransferasa adecuadas.

15

20

[0183] En algunas realizaciones, las fracciones sacárido en una glicoproteína que tiene patrones de sialilación alterados por las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* de la presente invención tienen un porcentaje mayor de residuos de galactosa terminales sialilados que la glicoproteína no alterada. Preferentemente, más de aproximadamente el 80 % de los residuos de galactosa terminales presentes en los oligosacáridos enlazados a glicoproteína se someterán a sialilación siguiendo el uso de los métodos. Más preferentemente, el uso de las proteínas de fucosiltransferasa de *H. pylori* y los métodos de la invención darán como resultado más de aproximadamente el 90 % de sialilación, y aún más preferentemente más de aproximadamente el 95 % de sialilación de residuos de galactosa terminales. De la forma más preferente, esencialmente el 100 % de los residuos de galactosa terminales presentes en las glicoproteínas en la composición se someten a sialilación siguiendo la modificación que usa los métodos de la presente invención. Las proteínas de fusión y los métodos de la invención son capaces típicamente de lograr el nivel deseado de sialilación en aproximadamente 48 horas o menos, y más preferentemente en aproximadamente 24 horas o menos.

25

30

[0184] Se han documentado por lo menos 15 sialiltransferasas diferentes de mamíferos, y hasta la fecha se han clonado los ADNcs de trece de ellas (en relación con la nomenclatura sistemática que se usa en el presente documento, véase, Tsuji et al. (1996) *Glycobiology* 6: v-xiv). Estos ADNcs se pueden usar para producir las proteínas de fusión de sialiltransferasa recombinantes de la invención.

35

[0185] Preferentemente, para la glicosilación de carbohidratos de glicoproteínas con enlaces de N y/o enlaces de O, la sialiltransferasa transfiere ácido siálico hacia la secuencia terminal Gal β 1,4-OR o GalNAc-OR, donde R es un aminoácido, un sacárido, un oligosacárido o un grupo aglicón que tiene por lo menos un átomo de carbono y está enlazado con o forma parte de una glicoproteína. Gal β 1,4-GlcNAc es la penúltima secuencia más común que subyace tras el ácido siálico terminal en estructuras de carbohidratos completamente sialiladas. Por lo menos tres de las sialiltransferasas de mamífero clonadas cumplen este requisito de especificidad del aceptor, y se ha demostrado que cada una de ellas transfiere ácido siálico a grupos carbohidrato con enlaces de N y enlaces de O de glicoproteínas.

40

45

[0186] En algunas realizaciones, los métodos de sialilación de la invención presentan un aumento de la viabilidad comercial a través del uso de sialiltransferasas bacterianas, o bien producidas de manera recombinante o bien producidas en las células bacterianas nativas. Recientemente se ha informado sobre dos sialiltransferasas bacterianas; una ST6GallI de *Photobacterium damsela* (Yamamoto et al. (1996) *J. Biochem.* 120:104-110) y una ST3Gal V de *Neisseria meningitidis* (Gilbert et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276). Las dos enzimas bacterianas recientemente descritas transfieren ácido siálico a la secuencia de Gal β 1,4GlcNAc en sustratos de oligosacárido.

50

[0187] Una α 2,3-sialiltransferasa viral sobre la cual se ha comunicado recientemente resulta también adecuada para las pruebas y su uso posible en los métodos de sialilación de la invención (Sujino et al. (2000) *Glycobiology* B10:312-320). Esta enzima, v-ST3Gall, se obtuvo a partir de células infectadas con virus Mixoma y está relacionada aparentemente con la ST3GallIV de mamífero según se indica mediante comparación de las secuencias de aminoácidos respectivas. La v-ST3Gall cataliza la sialilación de aceptores de Tipo I (Gal β 1,3-GlcNAc β 1-R), Tipo II (Gal β 1,4GlcNAc- β 1-R) y III (Gal β 1,3GalNAc β 1-R). La enzima también puede transferir ácido siálico a sustratos aceptores fucosilados (por ejemplo, Lewis-x y Lewis-a).

55

60

[0188] Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los métodos reivindicados es la ST3Gal III, a la que se hace referencia también como α (2,3)sialiltransferasa (EC2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un glicósido Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3GalNAc o Gal β 1,4GlcNAc (véase, por ejemplo, Wen et al. (1992) *J. Biol.*

Chem. 267:21011; Van den Eijnden et al. (1991) J. Biol. Chem. 256: 3159). El ácido siálico se enlaza con un Gal con la formación de un enlace α entre los dos sacáridos. La unión (enlace) entre los sacáridos está entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar a partir de hígado de rata (Weinstein et al. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13845); las secuencias de ADN genómico (Kitagawa et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) y ADNc humano (Sasaki et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) son conocidas, lo cual facilita la producción de esta enzima mediante expresión recombinante. En una realización preferida, los métodos de sialilación reivindicados usa una ST3Gal III de rata.

[0189] Otras sialiltransferasas, incluyendo aquellas enumeradas anteriormente, son también útiles en un proceso económico y eficaz de gran escala para la sialilación de glicoproteínas importantes comercialmente. Tal como se ha descrito anteriormente, una prueba sencilla para hallar la utilidad de estas otras enzimas consiste en hacer reaccionar varias cantidades de cada enzima (entre 1 a 100 mU/mg de proteína) con una proteína glicoproteína fácilmente disponible tal como asialo- α -AGP (a entre 1 y 10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés de sialilar glicoproteínas. Los resultados se pueden comparar, por ejemplo, con una o ambas de entre una ST6Gall ó una ST3GallIII (por ejemplo, una enzima bovina o humana), dependiendo del enlace de ácido siálico particular que se desee. Alternativamente, para esta evaluación, en lugar de asialo- α AGP, se pueden usar otras glicoproteínas, u oligosacáridos con enlaces de N ó de O liberados enzimáticamente desde el esqueleto estructural peptídico, o se pueden usar sacáridos que sean producidos por otros métodos o purificados a partir de productos naturales tales como leche. No obstante, preferentemente, las sialiltransferasas se someten a ensayo usando un oligosacárido que está enlazado a una glicoproteína. Las sialiltransferasas que presentan una capacidad de, por ejemplo, sialilación de oligosacáridos con enlaces de N o con enlaces de O, de glicoproteínas, más eficaz que la ST6Gall son útiles en un proceso práctico a gran escala para la sialilación de glicoproteínas.

[0190] La invención proporciona también métodos de alteración del patrón de sialilación de una glicoproteína antes de la fucosilación adicionando ácido siálico en un enlace α 2,6Gal así como el enlace α 2,3Gal, que se encuentran ambos en oligosacáridos con enlaces de N, de glicoproteínas de plasma humano. En esta realización, las ST3Gal III y ST6Gall sialiltransferasas están presentes ambas en la reacción y proporcionan proteínas que tienen una relación reproducible de los enlaces formados en la reacción de resialilación. De este modo, una mezcla de las dos enzimas puede resultar valiosa si se desean ambos enlaces en el producto final.

[0191] En la glicoproteína a modificar por los métodos de sialilación descritos en el presente documento hay presente un sustrato aceptor para la sialiltransferasa. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores galactosilados tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), GalNAc-O-Ser, GalNAc-O-Thr, y otros aceptores conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Paulson et al. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5617-5624). Típicamente, los aceptores están incluidos en cadenas de oligosacáridos que están fijadas a residuos de asparagina, serina, o treonina presentes en una proteína.

Ejemplos

[0192] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, aunque no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Clonación de fucosiltransferasas de *Helicobacter pylori*.

[0193] Genes de fucosiltransferasa putativos de las siguientes cepas de *Helicobacter pylori* se amplificaron por PCR, clonados en vectores para su expresión en *E. coli*: cepa 915 FutA, cepa 1111 FutA, cepa 19C2 FutB, cepa 1182 FutB, cepa 19C2 FutA, cepa 26695 FutA, y cepa 1218 FutB. En las Figuras 1 a 7 se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos. En la figura 12 se proporciona un alineamiento de secuencias de aminoácidos; en la figura 13 se proporciona un alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos.

[0194] Las proteínas de fucosiltransferasa putativas se cribaron en busca de actividad α 1,3/4-fucosiltransferasa usando sustratos de LNnT y GDP-fucosa. En la Figura 14 se muestran las oligoestructuras de LNnT y un producto, LNFPIII.

[0195] Cultivos de cien mililitros de *E. coli* transformada con fucosiltransferasa de *H. pylori* se dejaron crecer hasta OD600 de 0,8 y se indujeron con IPTG, y fueron recolectados. Se crearon lisados celulares usando una prensa de French. Las enzimas de fucosiltransferasa se sometieron a prueba en relación con la actividad enzimática y la especificidad del aceptor usando el sustrato LNnT. Las reacciones contenían GDP-fucosa 3 mM, LNnT 3 mM, Tris 50 mM pH 7.5, MnCl₂ 20 mM, y lisado bacteriano 15 %. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante veinticuatro horas.

[0196] Los productos de la reacción se separaron usando el siguiente sistema de TLC-tampón: 7 IPA:2 H₂O:1 Ácido acético. Las muestras se metilaron, se hidrolizaron, se redujeron con borodeuteruro de sodio, se acetilaron y se analizaron por GC/MS junto con muestras de LNnT y LNF3. En la Figura 15 se muestran resultados. Un valor de Glc con respecto a Glc-NAc cercano a 1 favorece la fucosilación de Glc-NAc. Un valor de Glc con respecto a Glc-NAc cercano a 0 favorece la fucosilación de Glc. Fucosiltransferasas de las siguientes cepas de *H. pylori* transfirieron fucosa a Glc-NAc: cepa 915 FutA, cepa 1111 FutA, cepa 19C2 FutB, y cepa 1182 FutB. El producto del gen FutA de la cepa

19C2A de *H. pylori* transfirió fucosa a la glucosa reductora del aceptor de LNnT, igual que lo hizo el producto del gen FutB de la cepa 1218 FutB de *H. pylori*. Un producto del gen FutA novedoso de la cepa 26695 de *H. pylori* catalizó también la transferencia de fucosa a glucosa.

5 **Ejemplo 2: Producción de oligosacáridos usando fucosiltransferasas de *Helicobacter pylori***

10 [0197] Cultivos de un litro de *E. coli* que expresaban fucosiltransferasas de *H. pylori* se dejaron crecer, se indujeron y fueron recolectados. Los lisados se usaron para sintetizar LNFIll a partir de LNnT. Dos resinas diferentes de intercambio iónico se sometieron a prueba en relación con la purificación de LNFIll. Mezclas de la reacción se centrifugaron a 5.000 RPM durante treinta minutos. A continuación, las muestras se procesaron por ultrafiltración usando membranas de ultrafiltración de fibra hueca con un valor de corte del peso molecular de 10 kD. Se aplicó una cromatografía de intercambio iónico usando o bien 1 ml de resina por 1 ml de síntesis (70 %) en columna de NH₄HCO₃ MR3 o bien 2 ml de resina por 1 ml de síntesis (82 %) en columna Dowex1/Dowex50. Las muestras a continuación se pasaron en una columna de Exclusión de Tamaño P2 y a continuación se liofilizaron. En la Figura 16 se muestran los resultados. Los rendimientos usando la resina Dowex se aproximaron al 50 %, mientras que los rendimientos de la columna de NH₄HCO₃ MR3 se aproximaron al 70 %.

20 [0198] Se preparó LNFIll a partir de lactosa usando lisados de células de *E. coli* que expresaban α -1,3/4-fucosiltransferasas de *H. pylori* de la cepa 1182 descrita en el presente documento, en combinación con β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa (1gtA) de *Neisseria gonococcus* y β -1,4-galactosiltransferasa (1gtB) de *Neisseria gonococcus* en una escala multigramo. Aquellos expertos reconocerán que, en esta realización de la invención, se pueden usar otras enzimas de β -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa y β -1,4-galactosiltransferasa.

25 **Ejemplo 3: Producción de glicoproteínas usando fucosiltransferasas de *Helicobacter pylori***

30 [0199] Usando asialiltransferina como sustrato, se sometió a prueba la capacidad de la fucosiltransferasa de la cepa 1182B de *H. pylori* de adicionar fucosa a moléculas aceptoras en glicoproteína. La fucosiltransferasa de 1182B se produjo en células de *E. coli* según se ha descrito anteriormente. Las reacciones se llevaron a cabo en un tampón que contenía Tris 50 mM pH 7.5, MnCl₂ 20 mM, 200 μ g de asialiltransferina, y GDP-fucosa 5 mM. Las reacciones se iniciaron adicionando 15 % v/v del lisado bacteriano. La reacción se incubó durante la noche a 37 °C. Las muestras se analizaron usando GC/MS. En la Figura 17 se muestran los resultados.

35 [0200] Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos y que, considerando los mismos, los expertos en la materia sugerirán varias modificaciones o cambios.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de creación de una glicoforma sustancialmente uniforme de un oligosacárido fucosilado, comprendiendo el método: hacer entrar en contacto una α 1,3-fucosiltransferasa recombinante de la cepa 1182B de *Helicobacter pylori* con una mezcla que comprende un sustrato dador que comprende un residuo de fucosa, y un sustrato aceptor que comprende un azúcar u oligosacárido que comprende por lo menos un residuo de N-acetilglucosamina, bajo condiciones en las que la α 1,3-fucosiltransferasa cataliza la transferencia de fucosa preferentemente al residuo de N-acetilglucosamina, produciendo de este modo una glicoforma sustancialmente 10 uniforme de un oligosacárido fucosilado, en donde la α 1,3-fucosiltransferasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que tiene la secuencia de la Figura 1 ó tiene la secuencia de aminoácidos de la Figura 1 y en donde el sustrato aceptor es Lacto-N-neo-Tetraosa (LNnt).
- 15 2. Método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además una etapa de purificación del oligosacárido fucosilado.
3. Método de la reivindicación 1, en el que el sustrato dador es GDP-fucosa.
4. Método de la reivindicación 1, en el que la fucosiltransferasa comprende una etiqueta de aminoácidos.
- 20 5. Método de la reivindicación 1, en el que el sustrato aceptor se fija a una glicoproteína.
6. Método de la reivindicación 1, en el que el oligosacárido fucosilado es Lacto-N-Fucopentaosa III (LNFP III).
- 25 7. Método de la reivindicación 1, en el que la mezcla comprende además lactosa, una β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa, y una β -1,4-galactosiltransferasa.
8. Método de la reivindicación 7, en el que la β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa es una enzima bacteriana.
- 30 9. Método de la reivindicación 8, en el que la β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa es de *Neisseria gonococcus*.
10. Método de la reivindicación 7, en el que la β -1,4-galactosiltransferasa es una enzima bacteriana.
11. Método de la reivindicación 10, en el que la β -1,4-galactosiltransferasa es de *Neisseria gonococcus*.
- 35 12. Método de la reivindicación 7, en el que el oligosacárido fucosilado es Lacto-N-Fucopentaosa III (LNFP III).

FIGURA 1

Secuencia nucleotídica de fucosiltransferasa de la cepa 1182 FutB (ID SEC N.º:1)

atgtccaaccctattagacgcttatatagaagcgctccattgaaaaattacctctaaatctccccccccctaaaaatcgctg
 tggcgaatgggtggggagatgaagaggtgaagaattaaaaagaacattctttatttctcagtcagcattacacaatcacct
 ccacaaaacccaacgaaccctccgatctcgtcttggcagtcctattggatcagccagaaaatcttatcctatacaaacgcaa
 aaagagtgtttacaccgggtgaaaacgaatcgcctaattcaacctcttgattacgccataggcttgatgaattggatttagagat
 cgttatttaagaatgcctttatattatgatagactacaccataaagccgagagcgtgaatgacaccactcgccttacaactcaaac
 ctgacagcctttatgcttataaaaaacccctccatcatttaagaaaaccacccaatttatgcgcagtagtgaacaatgagagcg
 atccttgaaaagagggttgcgagttttagcagcaaccctaacgctcctaaaaggaatgcttctatgacgtttaaattctata
 gagccagttattgggggagggagcgtgaaaacaccttaggctataacattaaaaacaagagcgagtttaagccaatacaaat
 tcaatctgtgtttgaaaactcacaaggctatggctatgtaactgaaaaaatcattgacgctactttagccataaccattcctatttattg
 ggggagtcctagcgtggcacaagatttaaccctaagagtttgaatgittgtgatttaagattttgatgaagcgattgatcatgt
 gcgatactgcacacgacccaaacgcttatttagacatgctttatgaaaacccttaaacacccttgatgggaaagcttacttttac
 caaaattgagtttaaaaaaatcctagatttttaaacgatttagaaaacgacacgatttatcacgataaccctttattttatcgt
 gattgaaatgagccgtaataatctattgatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaatta
 tgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgatt
 gagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgagcggctctaca
 aaacgctcgccttattagaactctcctcaaacaccactttaaaatctatcgcaaagcttatcaaaaaccttacctttgtgcgtgc
 ggcgagaaagttgattaaaaaattgggttgtaa

Secuencia proteica de la cepa 1182 FutB (ID SEC N.º:2)

mfqplldayiesasiekitskppplkiavanwwgdeeeefkknilyfilsqhytithqnpnepsdlvfgspigsarkilsy
 qnakrvfytgenespnfnlfdyaigfdeldfrdrylrmplydrhhkaesvndttspyklkpdsllyalkkpsfhfkenhpnl
 cavvnesdplkrghfasfnpnapkrnafydvlnsiepvigggsvkntlgyiniknkseflsqyfnlcfensqgygyvte
 kiidayfshtipiywgspsvaqdfnpksfvnvcdfkdfeaidhvrylhthpnayldmlyenplntldgkayfyqnlsfki
 ldffktiendtiyhdnplfiyrdlnepilisiddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnydd
 lrnyddlrnyddlrnyddlrnyerllqnaspllelsqnttfkiyrkayqkslplraarkliklgl*

FIGURA 2

Fucosiltransferasa de la cepa 1111 FutA

Secuencia codificante de nucleótidos (ID SEC N.º:3)

atgtccaaccctattagatgcctttatagaaagcgtccattgaaaaatggcctctaaatctccccccctaaaaatcgtgtgg
cgaattggtggggagatgaagaaataaaaaattaaaaagagcgttctttatcctaagccagcattacacaatcacttaca
ccgaaacctgataaacctgcggacatcgtcttggtaacccctggatcagccagaaaaatctatcctatcaaacgcaaaaa
gggtgtttacaccggtgaaaatgaagtcctaactcaacctcttgattacccataggcttgatgaattggactttagagatcgt
tattgagaatgccttgtattatgcctattgcattataaagccgagcttgtaatgacaccactcgccttataaactccaacctgaca
gcctttatgcttaaaaaaacctcccatcttttaagaaaaccacccaattgtgcgagtagtgaataatgagagtatcctttg
aaaagaggggttgcgagcttgcgcaagcaaccctaacgctcctagaaggaacgcttttatgaggcttaaacgctattgagcc
agtgctgggggagggagcgtgaaaaacactttaggctataatgtcaaaaacaagagcaggttttaagccaatacaaatcaat
ctgtgtttgaaaacactcaaggctatggctatgtaactgaaaagatcattgacgcttattcagccataaccattcattttgagg
agtcccagcgtggcgaaaagatttaaccctaagagtttgaatgtccatgattcaacaactttgatgaagcgattgactatca
gatactgcacacgcacccaacgctatttagacatgacatgaaaacccttaaacactattgatggaaagcttactttacca
aaattgagitttaaaaaatcctagatttttaaacgattttagaaaacgacacgatctacacgataacccttcatttctatcgtg
attgaaatgagcctcagatctattgatggttgagggttaattatgatgattgagggttaattatgatgattgagggttaattatgat
gattgagggttaattatgagcgcctttacaaaacgcctcgcctttattagaactctctcaaacaccactttaaaatctatcgcaa
gcttatcaaaaatccttgccttgttgcgtgccataaggagatgggttaaaaagtaa

Secuencia proteica (ID SEC N.º:4)

mfqplldafiesaplkkwplnlpplkiavanwwgdeeikkfkksvlyfilsqhytitlhrnpdkpdivfgnplgsarkilsy
qnakrvfytgenevnpfnlfdyaigfdeldfrdrylmplyyaylyhkaelvndttspyklqpdsllyalkkpsghfkenhpn
lcavvnesdplkrqfasvasnprnafycaalnaiepvagggsvkntlgynvknkseflsqyfnlcfentqgygyvt
ekiidayfshtipiywgspsvakdfnpksfvnvhdnfnfdeaidyirylhthpnayldmhyenplntidgkayfyqnlfsk
kildffktiendtiyhdnpiyfirdlnepsvsidglrvnyddlrnyddlrnyddlrnyerllqnaspllelsqnttfkiyrka
yqkslpllrairrvvkk*

FIGURA 3

Secuencia nucleotídica de la cepa 1218 FutB (ID SEC N.º:5)

atgtccaaccctattagacgcttatatagaagcgttccattgaaaaattacctctaaatctcccccccctaaaaatcgctg
 tggcgaattggtggggagatgaagagggtgaagaattaaaaagaacattctttatttctcagtcagcattacacaatcacct
 ccacaaaacccaacgaaccctccgatctcgtctttggcagtcctattggatcagccagaaaatcttctatcaaaacgcaa
 aaagagtgttttacaccggtgaaaacgaatcgcttaattcaacctcttgattacgccataggctttgatgaattggatttagagat
 cgttattaagaatgccttatattatgatagactacaccataagccgagagcgtgaatgacaccacttcgccttacaactcaaac
 ctgacagcctttatgcttaaaaaaacctcccattttaaagaaaaccacccaattatgcgcagtagtgaacaatgagagcg
 atcctttgaaaagaggggttgcgagttttagcgcgcaaccctaacgctcctaaaaggaatgcttctatgacgcttaaatctata
 gagccagttattgggggagggagcgtgaaaaacactttaggctataacattaaaaacaagagcgcgattttaagccaatacaaat
 tcaatctgtgtttgaaaactcacaaggctatggctatgtaactgaaaaaatcattgacgcttacttagccataaccattctattattg
 ggggagtcctagcgtggcacaagatttaaccctaagagtttgtgaatggttgattttaagattttgatgaagcgattgatcatgt
 gcgatactgcacacgcacccaacgcttatttagacatgctttatgaaaaccttaaacaccttgatgggaaagcttactttac
 caaatttgagtttaaaaaatcctagatttttaaacgatcttagaaaacgacacgatttatcacgataacctttattttatcgt
 gattgaatgagccgtaatatctattgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatga
 tgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattga
 gggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatga
 gcgctcgccttattagaactctcctcaaacaccactttaaatctatcgcaaagcttatcaaaaatcctacctttgttgcgtcgg
 cgagaaagttgattaaaaaattgggtttaa

Proteína predicha cepa 1218 FutB (ID SEC N.º:6)

mfqplldayiesasiekitskspplkiavanwwgdeeveefkknilyfilsqhytitlhqnpnepsdlvfgspigsarkilsy
 qnakrvfytgenespnfnlfdyaigfdeldfrdrylrmplyydrllhkaesvndttspyklkpdsllyalkkpshhfkcnhpnl
 cavvnesdplkrqfasfvasnnpakrnafydaalnsiepviiggsvkntlgyniknkseflsqyknfclfensqgygyvte
 kiidayfshtipiylwgspsvaqdfnpksfvnvcdfkdfdeaidhvrylhthpnayldmlyenplntldgkayfyqnlfskki
 ldffktilendtiyhndpfifyrdneplisiddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlrnyddlr
 nyddlrnyddlrnyddlrnyerllqnaspllelsqnttfkiyrkayqkslplraarklikkgl*

FIGURA 4

Secuencia nucleotídica de la cepa 19C2 FutB
de fucosiltransferasa (ID SEC N.º:7)

atgtccaaccctattagacgcttatatagacagcaccggttagatgaaaccgattataagccccattaatatagccctagcg
aattggaggccttggataaaagagaaagcaaagggttagaaaaaattatcttacattcatttaagtcagcattacacaatcgc
tctccaccgaaaccctgataaacctcgggacatcggtttggtaaccccctggatcagccagaaaaatcctatcctatcaaacg
ctaaaagggtgtttacaccggtgaaaacgaagccctaattcaacctcttgattacgccataggcttgatgaattggactttaga
gacggtatttgagaatgcctttatattatgatagactacaccataaagccgagagcgtgaatgacaccaccgcacctacaagatt
aaatcgacagcctttatgcttataaaaagccctcccatctttaaagaaaaccaccacattatgcgcgctaatcaataatgaga
tcgacctttgaaaagagggttgcgagcttgcgcaagcaaccctaacgccctataaggaacgctttctatgaggctttaaattc
tattgagccagttactgggggaggagcgtgagaaacactttaggctataacgtcaaaaacaaaaacgaattttgagccaatac
aagtcaatctgtgctttgaaaacactcaaggctatggctatgttactgaaaaaatcattgacgcttactcagccacaccattcctat
ttattgggggggagtcctagcgtggcgaaagatttaacccc

Secuencia proteica de la cepa 19C2 FutB (ID SEC N.º:8)

mfqplldayidstrldetdykpplnialanwwpldkreskgfrkkfilhflsqhytialhrnpdkpadivfgnplgsarkilsy
qnakrvfytgenevnpfnlfdyaigfdeldfrdrylrmpllydrllhkaesvndttapykiksdslyalkkpshhfknhph
lcalinneidplkrghfasfnpnapimafyealnsiepvttgggsvmtlgynvknkneflsqyknlcfentqgygyvtek
iidayfshtipiywggvpsvakdfnp

FIGURA 5

Secuencia codificante de nucleótidos de fucosiltransferasa de la cepa 915 FutA (ID SEC N.º:9)

atggcctctaaatctccccctaaaaatcgctgtggcgaattggtggggagatgaagaaattaaaaattaaaaagagcgttct
ttattttatcctaagccagcattacacaatcactttacaccgaaacctgataaacctgcggacatcgtctttgtaacccccttgat
cagccagaaaaatcttatcctatcaaacgaaaaagggtgtttacaccggtgaaatgaagtcctaactcaacctcttgatta
cgccataggctt

Secuencia proteica de la cepa 915 FutA (ID SEC N.º:10)

maskspplkiavanwwgdecikfkksvlyfilsqhytitlhmpdkpadivfgnplgsarkilsyqnakrvfytgenevnpn
fnlfdyaigf

FIGURA 6

Secuencia codificante de nucleótidos de fucosiltransferasa de la cepa 26695 FutA (ID SEC N.º:11)

atgtccaaccctattagacgccttatagaaagcgctccattgaaaaatggcctctaatctccccccccccctaaaaatc
gctgtggcgaattggtggggagatgaagaaftaaagaattaaaaagagcgttctttatcctaagccaacgctacgcaatc
accctcaccaaaacccaatgaatcttcagatctagttttagcaatcctctggagcggctagaaaatttatcttataaaaacac
taaacgagtggtttacaccggtgaaaacgaatcacctaafttaacctcttgattacgccataggcttggatgaattggatttaataga
tcgttattgagaatgccttgtattatgccattgactataagccgagcttgttaatgacaccactgcgcctacaaaactcaaa
acaacagccttatgcttataaaaaacccctctcatctttaaagaaaaccaccctaatgtgcgcagtagtgaatgatgagagcg
atcttataaaaagaggggttgccagttttagcgcgcaacgctaacgctcctatgaggaaacgctttatgacgctctaaattccata
gagccagttactgggggaggaagtgtgagaacacttaggctataaggtggaacaaaagcagttttaaagccaatacaagt
tcaatctctgtttgaaaactcgcaaggttatggctatgaaccgaaaaaccttgatgcgtatttagccataccattcctattattg
ggggagtcccagcgtggcgaagatttaaccctaaaaagtttgaatgtgcatgattcaacaacttgatgaagcgattgattat
atcaataacctgcacacgcacccaacgcttatttagacatgctctatgaaaacccttaaacacccttgatgggaaagcttacttt
accaagattgagtttaaaaaaatcctagatttttaaacgatttagaaaacgatacattatcacaaattctcaacatcttcatg
tgggagtacgatctgcataagccgtagtatccattgatgattgagggtaattatgatgattgagggtaattatgaccggcttta
caaacgcttcgctttattagaactctctcaaacaccacttttaaacctatcgcaaaagcttatcaaaaatccttgccttgttgcgc
gcggtgagaaagttggttaaaaaattgggttgtaa

Secuencia codificante de proteínas Cepa 26695 FutA (ID SEC N.º:12)

mfqplldafiesasiekmaskspppplkiavanwwgdeeikfkksvlyfilsqryaitlhqnpnefsdlvsnplgaarkil
syqntkrvfytgenespnfnlfdyaigfdeldfndrylrmpllyahlhykaelvndttapyklkdnslyalkkpslhfkcnh
pnlcavvndesdllkrghasfvasnanapmrnafydaalsiepvttggsvrntlgkvgnkseflsqyknlfensqgygy
vtekildayfshtipiwygspsvakdfnpksfvnvhdnfnfdeaidyikylhthpnayldmlyenplntldgkayfyqdlf
kkildffktiendtiyhkfstsfmweydlhkplvsiddlrnydrllqnaspllelsqnttfkiyrkayqkslplrav
rklvkkgl*

FIGURA 7

Secuencia nucleotídica de fucosiltransferasa 19C2A (ID SEC N.º:13)

atgtccaacccttagacgcctttatagaaagtgctcaatt

Secuencia proteica predicha de 19C2A (ID SEC N.º:14)

mfqplldafiesapi

FIGURA 8

Secuencia proteica de la cepa 1182 FutB alineada con
pfam00852, Glico_transf_10, Glicosiltransferasa familia 10

Problema:	23	PPPLKIAVANWWGDEEVEEFKKNILYFILSQHYTTITLHQNPNEPSDLVFGS-PIGSARKI	81
Encontr.:	11	TVPLLLAIYTWWSLIEYKEWKKSPIYFIGSQAPQPPLR---ILLWTWPFNGNPLALSDCP	67
Problema:	82	LSYQNAKRVPFYTGEN---ESPNFNLF---DYAIGFDELDFRDRYLRMPLYDRLHHKAES	135
Encontr.:	68	LSYQNTARCRLTANRSPLESADAVLFHHRDLSKGFDDLPPSPRPPGQPWVWASMESPSNS	127
Problema:	136	-VNDTTSFYKLPDLSLYALKKPSHHFKENHPNLCVVNNEPDLKRGFASFVSNPN-AP	193
Encontr.:	128	GLNDLRDGYFNWTLNRYRADSADAFHPYGYLEPRLSQVVNAPLLSAKRKGAAWVSNCTR	187
Problema:	194	KRNAFYDVLNSIEPVIIGGSSVKNLTYGYNIKNKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGYVTEKIID	253
Encontr.:	188	KRERFYQLNKHLLQVDVGGRVANPLPLKVGCLVETLSQYKFYLAFENSQHYDYVTEKLWK	247
Problema:	254	-AYFSHTIPIYWGSPSVAQDFNP-KSFVNVCDFKDFDEAIDHVRYLHHTHPNAYL	305
Encontr.:	248	NALQAGTIPVVLGPRAVYEDFVPPKSFIVDDFKSPKELADYLLYLDTNPTAYS	301

FIGURA 10

Secuencia proteica de la cepa 1218 FutB alineada con pfam00852, Glico_transf_10, Glicosiltransferasa familia 10

Problema: 23	PPPLKIAVANWWGDEEVEEFKKNILYFILSQHYTITLHQNPNEPSDLVFGS-PIGSARKI	81
Encontr.: 11	TVPLLLAIYTWWSLIEYKEWKKSPIYFIGSQAPQPPLR---ILLWTWPFNGNPLALSDCP	67
Problema: 82	LSYQNAKRVFYTGGEN---ESPENFLF---DYAIGFDELDFRDRYLRLPLYDRLHHKAES	135
Encontr.: 68	LSYQNTARCRLTANRSPLESADAVLFHHRDLSKGFDDLPPSPRPPGQPVVWASMESPSNS	127
Problema: 136	-VNDTTSFYKLPDLSLYALKKPSHHFKENHPNLCAVVNNEPDLKRGFASFVSNPN-AP	193
Encontr.: 128	GLNDLRDGYFNWTLNRSRADSADAFHPYGYLEPRLSQVFNAPLLSAKRKGAAWVSNCTR	187
Problema: 194	KRNAFYDALNSIEPVIGGGSVKNTLGYNIKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGYVTEKIID	253
Encontr.: 188	KREFRYQLNKHQVDVGGGRVANPLPLKVGCLVETLSQYKPYLAFENSQHYDYVTEKLWK	247
Problema: 254	-AYFSHTIPIYWGSPSVAQDFNP-KSFVNVCDFKDFDEAIDHVRYLHHPNAYLDMLYEN	311
Encontr.: 248	NALQAGTIPVVLGPRAVYEDFVPPKSPFHVDDFKSPKELADYLLYLDTNPTAYS-----	301
Problema: 312	PLNTLDGKAYFYQNLSPFKILDFFKTIENDTIYHDNPFIFYRDLNEPLISIDDLRVNYD	371
Encontr.: 302	-----EYFEWRYDLRVRLPSWDALR--YD	323
Problema: 372	DLRVNYDDL RVNYDDL RVNYDDL RVNYD	399
Encontr.: 324	EGFCRVCRLQLQNPDRYKTYPNIAKWFQ	351

FIGURA 11

Secuencia proteica de la cepa 19C2 FutB alineada con
 pfam00852, Glico_transf_10, Glicosiltransferasa familia 10

Problema: 22	PPLNIALANWWPLDKRESKGRKKFILHFILSQHYTIALHRNPKPADIVFG-NPLGSAR	80
Encontr.: 12	VPLLLAIYTWWSL--IEYKEW-KKSPIYFIGSQAPQPLR---ILLWTWPFNGNPLALSD.	65
Problema: 81	KILSYQNAKRVFYGTGEN---EVPNPNLF---DYAIGFDELDFRDRYLRMPLYDRLHHKA	134
Encontr.: 66	CPLSYQNTARCRLTANRSPLESADAVLFHHRDLSKGFDDLPPSPRPPGQPWWASMESPS	125
Problema: 135	ES-VNDTTAPYKIKSDSLYALKKPSHHFKENIHPHLCALINNEIDPLKRGFASFVSNPN-	192
Encontr.: 126	NSGLNDLRDGYFNWTLSYRADSDAFHPYGYLEPRLSQVVNAPLLSAKRKGAAWVVSNCNT	185
Problema: 193	APIRNAFYEALNSIEPVTGGGSVRNTLGYNVKKNKNEFLSQYKFNLCFENTQGYGYVTEKI	252
Encontr.: 186	RSKRERFYKQLNKHQLQVDVGGGRVANPLPLKVGCLVETLSQYKFYLAFENSQHYDYVTEKL	245
Problema: 253	ID-AYFSHTIPIYWGGVPSVAKDFNP	277
Encontr.: 246	WKNALQAGTIPVVLGP-RAVYEDFVP	270

FIGURA 12

	1	50
1111FutA. pep	(1)	MFQPLLDAFIESAPIKKWPLN--LPPLKIAVANWWGDEEIKK---FKKSM
19C2A. pep	(1)	MFQPLLDAFIESAPI-----
915A. pepneose	(1)	-----MASK-SPPLKIAVANWWGDEEIKK---FKKSM
26695A. pep	(1)	MFQPLLDAFIESASIEKMAKSPPPPLKIAVANWWGDEEIKE---FKKSM
1182B. pep	(1)	MFQPLLDAYIESASIEKITSKS-PPPLKIAVANWWGDEEVBE---FKKMT
1218B. pep	(1)	MFQPLLDAYIESASIEKITSKS-PPPLKIAVANWWGDEEVBE---FKKMT
ORF19C2B. pep	(1)	MFQPLLDAYIDSTRLEDETDK---PPLNIALANWWPLDKRESKGFPRKFT
Consenso	(1)	MFQPLLDAFIESA IEK SK PPLKIAVANWWGDEEI FKK I
	51	100
1111FutA. pep	(46)	LYFILSQHYTITLHRNPDKPADIVFGNPLGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
19C2A. pep	(16)	-----
915A. pepneose	(29)	LYFILSQHYTITLHRNPDKPADIVFGNPLGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
26695A. pep	(48)	LYFILSQRYAITLHQPNNEFSDLVFSNPLGAARKILSYQNTKRVFYTGEN
1182B. pep	(47)	LYFILSQHYTITLHQPNNEPSDLVFGSPIGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
1218B. pep	(47)	LYFILSQHYTITLHQPNNEPSDLVFGSPIGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
ORF19C2B. pep	(48)	LHFILSQHYTITLHRNPDKPADIVFGNPLGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
Consenso	(51)	LYFILSQHYTTITLH NP PADIVFGNPLGSARKILSYQNAKRVFYTGEN
	101	150
1111FutA. pep	(96)	EVPNFNLFDYAIGFDELDFRDRYL RMPLYYAYLHYKAE LVNDT TSPYK LQ
19C2A. pep	(16)	-----
915A. pepneose	(79)	EVPNFNLFDYAIGF-----
26695A. pep	(98)	ESPNFNLFDYAIGFDELDFNDRYLRMPLYY AHLHYKAE LVNDT TAPYK LK
1182B. pep	(97)	ESPNFNLFDYAIGFDELDFRDRYL RMPLYYDR LHHKAE SVNDT TSPYK LK
1218B. pep	(97)	ESPNFNLFDYAIGFDELDFRDRYL RMPLYYDR LHHKAE SVNDT TSPYK LK
ORF19C2B. pep	(98)	EVPNFNLFDYAIGFDELDFRDRYL RMPLYYDR LHHKAE SVNDT TAPYK LK
Consenso	(101)	E PNFNLFDYAIGFDELDFRDRYL RMPLYY LHHKAE VNDT TSPYK LK
	151	200
1111FutA. pep	(146)	PDSLIALKPKSHHFKENHPNLCAVVNNE SDPLKRGFASFVASNPNAPRRN
19C2A. pep	(16)	-----
915A. pepneose	(93)	-----
26695A. pep	(148)	DNSLYALKPKSHHFKENHPNLCAVVNNE SDLLKRGFASFVASNANAPMRN
1182B. pep	(147)	PDSLIALKPKSHHFKENHPNLCAVVNNE SDPLKRGFASFVASNPNAPKRN
1218B. pep	(147)	PDSLIALKPKSHHFKENHPNLCAVVNNE SDPLKRGFASFVASNPNAPKRN
ORF19C2B. pep	(148)	SDSLIALKPKSHHFKENHPNLCAV L NNE IDPLKRGFASFVASNPNAPIRN
Consenso	(151)	DSLIALKPKSHHFKENHPNLCAVVNNE SDPLKRGFASFVASNPNAP RN
	201	250
1111FutA. pep	(196)	AFYEALNSIEPVAGGGSVKNTLGYNVK NKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY
19C2A. pep	(16)	-----
915A. pepneose	(93)	-----
26695A. pep	(198)	AFYDALNSIEPVTGGGSVRNTLGYKVG NKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY
1182B. pep	(197)	AFYDVLNSIEPVIGGGSVKNTLGYN IKNKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY
1218B. pep	(197)	AFYDALNSIEPVIGGGSVKNTLGYN IKNKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY
ORF19C2B. pep	(198)	AFYEALNSIEPVTGGGSVRNTLGYNVK NKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY
Consenso	(201)	AFYDALNSIEPV GGGSVKNTLGYNVK NKSEFLSQYKFNLCFENSQGYGY

FIGURA 13

	1	50
1111FutA	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGATGCCTTTATAGAAAAGCGCT-CCATTGAAAA
915A.cod (MWG)	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGATGCCTTTATAGAAAAGCGCTTCCATTGAAAA
19C2FutA.cod	(1)	ATGTTCCAACCCCTACTAGACGCCTTTATAGAAAAGTGCTCCAATT-----
26695A.cod	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGACGCCTTTATAGAAAAGCGCTTCCATTGAAAA
1182B	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGACGCCTTATATAGAAAAGCGCTTCCATTGAAAA
1218B.nuc	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGACGCCTTATATAGAAAAGCGCTTCCATTGAAAA
ORF19C2B	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGACGCCTTATATAGACAGCACCCGTTTAGATGA
Consenso	(1)	ATGTTCCAACCCCTATTAGACGCCTTTATAGAAAAGCGCTTCCATTGAAAA
	51	100
1111FutA	(50)	AATGGCCTCTAAATCTCCCCCCC-----TAAAAATCGCTGTGGCGAATT
915A.cod (MWG)	(51)	AATGGCCTCTAAATCTCCCCCCC-----TAAAAATCGCTGTGGCGAATT
19C2FutA.cod	(46)	-----
26695A.cod	(51)	AATGGCCTCTAAATCTCCCCCCCCCCCCCTAAAAATCGCTGTGGCGAATT
1182B	(51)	AATTACCTCTAAATCTCCCCCCCCCCC--TAAAAATCGCTGTGGCGAATT
1218B.nuc	(51)	AATTACCTCTAAATCTCCCCCCCCCCC--TAAAAATCGCTGTGGCGAATT
ORF19C2B	(51)	AACCGATTATAA-----GCCCCAT--TAAATATAGCCCTAGCGAATT
Consenso	(51)	AAT GCCTCTAAATCTCCCCCCC TAAAAATCGCTGTGGCGAATT
	101	150
1111FutA	(95)	GGTGG-----GGAGATGA-AGAAATTAATAAATTTAAAAAGAGCGTTCTT
915A.cod (MWG)	(95)	GGTGG-----GGAGATGA-AGAAATTAATAAATTTAAAAAGAGCGTTCTT
19C2FutA.cod	(46)	-----
26695A.cod	(101)	GGTGG-----GGAGATGA-AGAAATTAAGAATTTAAAAAGAGCGTTCTT
1182B	(98)	GGTGG-----GGAGATGA-AGAGGTTGAAGAATTTAAAAAGAACATTCTT
1218B.nuc	(98)	GGTGG-----GGAGATGA-AGAGGTTGAAGAATTTAAAAAGAACATTCTT
ORF19C2B	(92)	GGTGGCCTTTGGATAAAAGAGAAAGCAAAGGGTTTAGAAAAAATTTATC
Consenso	(101)	GGTGG GGAGATGA AGAAATTAAGAATTTAAAAAGA C TTCTT
	151	200
1111FutA	(139)	T---ATTTTATCCTAAGCCAGCATTACACAATCACCTTTACACCGAAACCC
915A.cod (MWG)	(139)	T---ATTTTATCCTAAGCCAGCATTACACAATCACCTTTACACCGAAACCC
19C2FutA.cod	(46)	-----
26695A.cod	(145)	T---ATTTTATCCTAAGCCAACGCTACGCAATCACCTTCCACCAAACCC
1182B	(142)	T---ATTTTATCTCAGTCAGCATTACACAATCACCTTCCACCAAACCC
1218B.nuc	(142)	T---ATTTTATCTCAGTCAGCATTACACAATCACCTTCCACCAAACCC
ORF19C2B	(142)	TTACATTCATTTTAAGTCAGCATTACACAATCGCTTCCACCGAAACCC
Consenso	(151)	T ATTTTAT CTAAG CAGCATTACACAATCAC CTCCACC AAACC
	201	250
1111FutA	(186)	TGATAAACCTGCGGACATCGTCTTTGGTAACCCCTTGGATCAGCCAGAA
915A.cod (MWG)	(186)	TGATAAACCTGCGGACATCGTCTTTGGTAACCCCTTGGATCAGCCAGAA
19C2FutA.cod	(46)	-----
26695A.cod	(192)	CAATGAATTTTCAGATCTAGTTTTTAGCAATCCTCTTGGAGCGGCTAGAA
1182B	(189)	CAACGAACCCCTCCGATCTCGTCTTTGGCAGTCCATTGGATCAGCCAGAA
1218B.nuc	(189)	CAACGAACCCCTCCGATCTCGTCTTTGGCAGTCCATTGGATCAGCCAGAA
ORF19C2B	(192)	TGATAAACCTGCGGACATCGTTTTTTGGTAACCCCTTGGATCAGCCAGAA
Consenso	(201)	AT AACCT C GA TCGTCTTTGG AA CC CTTGGATCAGCCAGAA

FIG. 13 (CONT)

		251		300
1111FutA	(236)	AAATCTTATCCTATCAAAACGCAAAAAGGGTGT	TTTACACCGGTGAAAAT	
915A.cod (MWG)	(236)	AAATCTTATCCTATCAAAACGCAAAAAGGGTGT	TTTACACCGGTGAAAAT	
19C2FutA.cod	(46)	-----	-----	
26695A.cod	(242)	AGATTTTATCCTTATCAAAACACTAAACGAGTGT	TTTACACCGGTGAAAAC	
1182B	(239)	AAATCTTATCCTATCAAAACGCAAAAAGAGTGT	TTTACACCGGTGAAAAC	
1218B.nuc	(239)	AAATCTTATCCTATCAAAACGCAAAAAGAGTGT	TTTACACCGGTGAAAAC	
ORF19C2B	(242)	AAATCCTATCCTATCAAAACGCTAAAAGGGTGT	TTTACACCGGTGAAAAC	
Consenso	(251)	AAATCTTATCCTATCAAAACGCAAAAAG	GTGTTTACACCGGTGAAAAC	
		301		350
1111FutA	(286)	GAAGTCCCTAACTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	-GATGAAT	
915A.cod (MWG)	(286)	GAAGTCCCTAACTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	TGATGA--	
19C2FutA.cod	(46)	-----	-----	
26695A.cod	(292)	GAATCACCTAATTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	-GATGAAT	
1182B	(289)	GAATCGCCTAATTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	-GATGAAT	
1218B.nuc	(289)	GAATCGCCTAATTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	-GATGAAT	
ORF19C2B	(292)	GAAGTCCCTAATTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	-GATGAAT	
Consenso	(301)	GAA CCTAATTTCAACCTCTTTGATTACGCCATAGGCTTT	GATGAAT	
		351		400
1111FutA	(335)	TGGACTTTAGAGATCGTTATTTGAGAATGCCTTTGTATTATGCCTATTTG		
915A.cod (MWG)	(334)	-----	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	-----	
26695A.cod	(341)	TGGATTTTAATGATCGTTATTTGAGAATGCCTTTGTATTATGCCATTG		
1182B	(338)	TGGATTTTAGAGATCGTTATTTAAGAATGCCTTTATATTATGATAGACTA		
1218B.nuc	(338)	TGGATTTTAGAGATCGTTATTTAAGAATGCCTTTATATTATGATAGACTA		
ORF19C2B	(341)	TGGACTTTAGAGATCGTTATTTGAGAATGCCTTTATATTATGATAGACTA		
Consenso	(351)	TGGA TTTAGAGATCGTTATTT AGAATGCCTTT TATTATG	T	
		401		450
1111FutA	(385)	CATTATAAAGCCGAGCTTGTTAATGACACCACTTCGCCTTATAAACTCCA		
915A.cod (MWG)	(334)	-----	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	-----	
26695A.cod	(391)	CACATAAAGCCGAGCTTGTTAATGACACCACTTCGCCTTATAAACTCAA		
1182B	(388)	CACCATAAAGCCGAGAGCGTGAATGACACCACTTCGCCTTACAACTCAA		
1218B.nuc	(388)	CACCATAAAGCCGAGAGCGTGAATGACACCACTTCGCCTTACAACTCAA		
ORF19C2B	(391)	CACCATAAAGCCGAGAGCGTGAATGACACCACTTCGCCTTACAAGATTAA		
Consenso	(401)	CAC ATAAAGCCGAG GT AATGACACCACT CGCCTTACAACTCAA		
		451		500
1111FutA	(435)	ACCTGACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAACCCTCCCATCATTTTAAAGAAA		
915A.cod (MWG)	(334)	-----	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	-----	
26695A.cod	(441)	AGACAACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAACCCTCTCATCATTTTAAAGAAA		
1182B	(438)	ACCTGACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAACCCTCCCATCATTTTAAAGAAA		
1218B.nuc	(438)	ACCTGACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAACCCTCCCATCATTTTAAAGAAA		
ORF19C2B	(441)	ATCTGACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAGCCCTCCCATCATTTTAAAGAAA		
Consenso	(451)	A CTGACAGCCTTTATGCTTTAAAAAAACCCTCCCATCATTTTAAAGAAA		

FIG.13 (CONT)

	501	550
1111FutA	(485) ACCACCCCAATTTGTGCGCAGTAGTGAAATAATGAGAGTGATCCTTTGAAA	
915A.cod (MWG)	(334) -----	
19C2FutA.cod	(46) -----	
26695A.cod	(491) ACCACCCTAATTTGTGCGCAGTAGTGAATGATGAGAGCGATCTTTAAAA	
1182B	(488) ACCACCCCAATTTATGCGCAGTAGTGAACAATGAGAGCGATCCTTTGAAA	
1218B.nuc	(488) ACCACCCCAATTTATGCGCAGTAGTGAACAATGAGAGCGATCCTTTGAAA	
ORF19C2B	(491) ACCACCACATTTATGCGCGCTAATCAATAATGAGATCGATCCTTTGAAA	
Consenso	(501) ACCACCC AATTT TGCGCAGTAGTGAA AATGAGAGCGATCCTTTGAAA	
	551	600
1111FutA	(535) AGAGGGTTTGCGAGCTTTGTCGCAAGCAACCCTAACGCTCCTAGAAGGAA	
915A.cod (MWG)	(334) -----	
19C2FutA.cod	(46) -----	
26695A.cod	(541) AGAGGGTTTGCCAGTTTGTAGCGAGCAACGCTAACGCTCCTATGAGGAA	
1182B	(538) AGAGGGTTTGCGAGTTTGTAGCGAGCAACCCTAACGCTCCTAAAAGGAA	
1218B.nuc	(538) AGAGGGTTTGCGAGTTTGTAGCGAGCAACCCTAACGCTCCTAAAAGGAA	
ORF19C2B	(541) AGAGGGTTTGCGAGCTTTGTCGCAAGCAACCCTAACGCCCTATAAGGAA	
Consenso	(551) AGAGGGTTTGCGAG TTTGT GC AGCAACCCTAACGCTCCTA AAGGAA	
	601	650
1111FutA	(585) CGCTTTTATGAGGCTTTAAACGCTATTGAGCCAGTTGCTGGGGGAGGGA	
915A.cod (MWG)	(334) -----	
19C2FutA.cod	(46) -----	
26695A.cod	(591) CGCTTTTATGACGCTCTAAATTCATAGAGCCAGTTACTGGGGGAGGAA	
1182B	(588) TGCTTCTATGACGTTTTAAATTCATAGAGCCAGTTATTGGGGGAGGGA	
1218B.nuc	(588) TGCTTCTATGACGTTTTAAATTCATAGAGCCAGTTATTGGGGGAGGGA	
ORF19C2B	(591) CGCTTCTATGAGGCTTTAAATTCATAGAGCCAGTTACTGGGGGAGGGA	
Consenso	(601) GCTTT TATGA GCTTTAAATTCAT GAGCCAGTTA TGGGGGAGGGA	
	651	700
1111FutA	(635) GCGTGAAAAACACTTTAGGCTATAATGTCAAAAAACAAGAGCGAGTTTTTA	
915A.cod (MWG)	(334) -----	
19C2FutA.cod	(46) -----	
26695A.cod	(641) GTGTGAGAAACACTTTAGGCTATAAGGTTGGAAACAAAAGCGAGTTTTTA	
1182B	(638) GCGTGAAAAACACTTTAGGCTATAACATTAAAAACAAGAGCGAGTTTTTA	
1218B.nuc	(638) GCGTGAAAAACACTTTAGGCTATAACATTAAAAACAAGAGCGAGTTTTTA	
ORF19C2B	(641) GCGTGAGAAACACTTTAGGCTATAACGTCAAAAAACAACGAATTTTTG	
Consenso	(651) GCGTGA AAACACTTTAGGCTATAA T AAAAAACA AGCGAGTTTTTA	
	701	750
1111FutA	(685) AGCCAATACAAATTCATCTGTGTTTTGAAAACACTCAAGGCTATGGCTA	
915A.cod (MWG)	(334) -----	
19C2FutA.cod	(46) -----	
26695A.cod	(691) AGCCAATACAAAGTTCAATCTGTGTTTTGAAAACACTCGCAAGGTTATGGCTA	
1182B	(688) AGCCAATACAAATTCATCTGTGTTTTGAAAACACTCACAAGGCTATGGCTA	
1218B.nuc	(688) AGCCAATACAAATTCATCTGTGTTTTGAAAACACTCACAAGGCTATGGCTA	
ORF19C2B	(691) AGCCAATACAAAGTTCAATCTGTGTTTTGAAAACACTCAAGGCTATGGCTA	
Consenso	(701) AGCCAATACAA TTCAATCTGTGTTTTGAAAAC C CAAGGCTATGGCTA	

FIG. 13 (CONT['])

		751	800
1111FutA	(735)	TGTA ^{..} ACTGAAAAGAT ^{..} CATTGACGCTTATTT ^{..} CAGCCATACCATTCCTATTT ^{..}	
915A. cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA. cod	(46)	-----	
26695A. cod	(741)	TGTAACCGAAAAAATCCTTGATGCGTATTTTAGCCATACCATTCCTATTT	
1182B	(738)	TGTA ^{..} ACTGAAA ^{..} AATCATTGACGCTTACTTTAGCCATACCATTCCTATTT	
1218B. nuc	(738)	TGTA ^{..} ACTGAAA ^{..} AATCATTGACGCTTACTTTAGCCATACCATTCCTATTT	
ORF19C2B	(741)	TGTTACTGAAA ^{..} AATCATTGACGCTTACTTCAGCCACACCATTCCTATTT	
Consenso	(751)	TGTA ^{..} ACTGAAA ^{..} AATCATTGACGCTTA TT AGCCATACCATTCCTATTT	
		801	850
1111FutA	(785)	ATTGGGGG--AGTCC-CAGCGTGGCGAAAGATTTAACCCTAAGAGTTTT	
915A. cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA. cod	(46)	-----	
26695A. cod	(791)	ATTGGGGG--AGTCC-CAGCGTGGCGAAAGATTTAACCCTAAAAGTTTT	
1182B	(788)	ATTGGGGG--AGTCC-TAGCGTGGCACAAGATTTAACCCTAAGAGTTTT	
1218B. nuc	(788)	ATTGGGGG--AGTCC-TAGCGTGGCACAAGATTTAACCCTAAGAGTTTT	
ORF19C2B	(791)	ATTGGGGGGGAGTCCCTAGCGTGGCGAAAGATTTAACCC-----	
Consenso	(801)	ATTGGGGG AGTCC AGCGTGGC AAGATTTAACCCTAA AGTTTT	
		851	900
1111FutA	(832)	GTGAATGTCCATGATTTCAACAACTTTGATGAAGCGATTGACTATATACAG	
915A. cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA. cod	(46)	-----	
26695A. cod	(838)	GTGAATGTGCATGATTTCAACAACTTTGATGAAGCGATTGATTATATCAAA	
1182B	(835)	GTGAATGTTTGTGATTTTAAAGATTTGATGAAGCGATTGATCATGTGCG	
1218B. nuc	(835)	GTGAATGTTTGTGATTTTAAAGATTTGATGAAGCGATTGATCATGTGCG	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(851)	GTGAATGT TGATTT AA A TTTGATGAAGCGATTGA AT T	
		901	950
1111FutA	(882)	ATACTTGCACACGCACCCAAACGCTTATTTAGACATGCACTATGAAAACC	
915A. cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA. cod	(46)	-----	
26695A. cod	(888)	ATACCTGCACACGCACCCAAACGCTTATTTAGACATGCTCTATGAAAACC	
1182B	(885)	ATACTTGCACACGCACCCAAACGCTTATTTAGACATGCTTTATGAAAACC	
1218B. nuc	(885)	ATACTTGCACACGCACCCAAACGCTTATTTAGACATGCTTTATGAAAACC	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(901)	ATAC TGCACACGCACCCAAACGCTTATTTAGACATGC TATGAAAACC	
		951	1000
1111FutA	(932)	CTTTAAACACTATTTGATGGGAAAGCTTACTTTTACCAAATTTGAGTTTT	
915A. cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA. cod	(46)	-----	
26695A. cod	(938)	CTTTAAACACCCTTGATGGGAAAGCTTACTTTTACCAAAGATTTGAGTTTT	
1182B	(935)	CTTTAAACACCCTTGATGGGAAAGCTTACTTTTACCAAATTTGAGTTTT	
1218B. nuc	(935)	CTTTAAACACCCTTGATGGGAAAGCTTACTTTTACCAAATTTGAGTTTT	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(951)	CTTTAAACAC TTGATGGGAAAGCTTACTTTTACCAA ATTTGAGTTTT	

FIG. 13 (CONT)

		1001		1050
1111FutA	(982)	AAAAAAATCCTAGATTTTTTTAAAACGATTTTAGAAAACGACACGATCTA		
915A.cod (MWG)	(334)	-----		
19C2FutA.cod	(46)	-----		
26695A.cod	(988)	AAAAAAATCCTAGATTTTTTTAAAACGATTTTAGAAAACGATACGATTTA		
1182B	(985)	AAAAAAATCCTAGATTTTTTTAAAACGATTTTAGAAAACGACACGATTTA		
1218B.nuc	(985)	AAAAAAATCCTAGATTTTTTTAAAACGATCTTAGAAAACGACACGATTTA		
ORF19C2B	(832)	-----		
Consenso	(1001)	AAAAAAATCCTAGATTTTTTTAAAACGAT TTAGAAAACGA ACGAT TA		
		1051		1100
1111FutA	(1032)	TCACGATAACCC-----TTTCATTTCTATCGTGATTTGAATGAGCCCTT		
915A.cod (MWG)	(334)	-----		
19C2FutA.cod	(46)	-----		
26695A.cod	(1038)	TCACAAATTCCTCAACATCTTTCATGTGGGAGTACGATCTGCATAAGCCGT		
1182B	(1035)	TCACGATAACCC-----TTTATTTTTATCGTGATTTGAATGAGCCGT		
1218B.nuc	(1035)	TCACGATAACCC-----TTTATTTTTATCGTGATTTGAATGAGCCGT		
ORF19C2B	(832)	-----		
Consenso	(1051)	TCAC A C C TTT AT T A GAT TG AT AGCC T		
		1101		1150
1111FutA	(1076)	CAGTATCTATTGATGGT---TTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTT		
915A.cod (MWG)	(334)	-----		
19C2FutA.cod	(46)	-----		
26695A.cod	(1088)	TAGTATCCATTGATGAT---TTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTT		
1182B	(1079)	TAATATCTATTGATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTT		
1218B.nuc	(1079)	TAATATCTATTGATGAT---TTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTT		
ORF19C2B	(832)	-----		
Consenso	(1101)	A TATC ATTGATG T TTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTT		
		1151		1200
1111FutA	(1123)	AATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGA		
915A.cod (MWG)	(334)	-----		
19C2FutA.cod	(46)	-----		
26695A.cod	(1135)	AATTATGACCGGCTTTTACAAAACGCTTCGCCTTTATTAGAACTCTCTCA		
1182B	(1129)	AATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGA		
1218B.nuc	(1126)	AATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGA		
ORF19C2B	(832)	-----		
Consenso	(1151)	AATTATGA T AA T TTT G T T A		
		1201		1250
1111FutA	(1173)	GCGCCTTTTACAAAACGCTTCGCCTTTATTAGAACTCTCTCAAAAACACCA		
915A.cod (MWG)	(334)	-----		
19C2FutA.cod	(46)	-----		
26695A.cod	(1185)	AAACACCCTTTTAAAATCTATCGCAAAGCTTATCAAAAATCCTTGCCCTT		
1182B	(1179)	TGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGA		
1218B.nuc	(1176)	TGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGA		
ORF19C2B	(832)	-----		
Consenso	(1201)	AA		

FIG. 13 (CONT)

		1251	1300
1111FutA	(1223)	CTTTTAAAATCTATCGCAAAGCTTATCAAAAATCCTTGCCTTTGTTGCGT	
915A.cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	
26695A.cod	(1235)	TGTTGCGCGCGGTGAGAAAGTTGGTTAAAAAATTGGGTTTGTA-----	
1182B	(1229)	GGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAAT	
1218B.nuc	(1226)	GGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAAT	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(1251)	T	T A A
		1301	1350
1111FutA	(1273)	GCCATAAGGAGATGGGTTAAAAAGTAA-----	
915A.cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	
26695A.cod	(1279)	-----	
1182B	(1279)	TATGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGAGCG	
1218B.nuc	(1276)	TGTGATGATTTGAGGGTTAATTATGATGATTTGAGGGTTAATTATGAGCG	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(1301)		
		1351	1400
1111FutA	(1300)	-----	
915A.cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	
26695A.cod	(1279)	-----	
1182B	(1329)	GCTCTTACAAAACGCCTCGCCTTTATTAGAACTCTCTCAAAACACCACTT	
1218B.nuc	(1326)	GCTCTTACAAAACGCCTCGCCTTTATTAGAACTCTCTCAAAACACCACTT	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(1351)		
		1401	1450
1111FutA	(1300)	-----	
915A.cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	
26695A.cod	(1279)	-----	
1182B	(1379)	TTAAAATCTATCGCAAAGCTTATCAAAAATCCTTACCTTTGTTGCGTGCG	
1218B.nuc	(1376)	TTAAAATCTATCGCAAAGCTTATCAAAAATCCTTACCTTTGTTGCGTGCG	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(1401)		
		1451	1483
1111FutA	(1300)	-----	
915A.cod (MWG)	(334)	-----	
19C2FutA.cod	(46)	-----	
26695A.cod	(1279)	-----	
1182B	(1429)	GCGAGAAAGTTGATTAAAAAATTGGGTTTGTA	
1218B.nuc	(1426)	GCGAGAAAGTTGATTAAAAAATTGGGTTTGTA	
ORF19C2B	(832)	-----	
Consenso	(1451)		

Estructuras de oligosacáridos

Lacto-N-neo-Tetraosa (LNnT)



Fig. 14

Lacto-N-Fucopentaosa III (LNFP III)



3

|

1 α Fucosa

Análisis de ligamiento por GC/MS

Las muestras se metilaron, se hidrolizaron, se redujeron con borodeuteruro de sodio, se acetilaron y se analizaron por GC/MS junto con muestras de LNF3 y LNF3.

- ➡ Un valor de Glc con respecto a Glc-NAc cercano a 1 favorece la fucosilación de Glc-NAc.
- ➡ Un valor de Glc con respecto a Glc-NAc cercano a 0 favorece la fucosilación de Glc.

FIG.15

Cepa de <i>H. Pylori</i>	Glc vs. Glc-NAC
915A2	0,982
19C2A5	0,040
1111A2	0,975
19C2B1	0,991
1182B3	0,983

Síntesis de LNFIII 1 Litro

FIG.16

Número de lote	Tipo de resina	Rendim. total	Porcentaj. recuper. real
1-02	Columna de MR3 NH ₄ HCO ₃ (1ml resina/ 1ml síntesis)	1.567 g	61%
2-02	Columna de MR3 NH ₄ HCO ₃ (1ml resina/ 1ml síntesis)	1.760 g	68%
3-02	Dowex1/Dowex 50 (2ml resina/ 1ml síntesis)	1.221 g	47%

FIG. 17

