

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 507**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2011 E 11151571 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2479263**

54 Título: **Fucosiltransferasas novedosas y sus aplicaciones**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2014

73 Titular/es:

**JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Maarweg 32
53619 Rhienbrettbach, DE**

72 Inventor/es:

**PARKOT, JULIA;
HÜFNER, ERIC;
JENNEWEIN, STEFAN;
ELLING, LOTHAR y
ENGELS, LEONIE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 439 507 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

Fucosiltransferasas novedosas y sus aplicaciones

5 La presente invención se refiere a una nueva fucosiltransferasa y sus aplicaciones.

Muchas (glico)proteínas, (glico)lípidos u oligosacáridos requieren la presencia de estructuras fucosiladas concretas, con el fin de exhibir una actividad biológica particular. Por ejemplo, muchos mecanismos de reconocimiento intercelular requieren un oligosacárido fucosilado: p. ej., con el fin de unirse mediante moléculas de adherencia celular, tales como la L-selectina, estructuras celulares específicas tienen que comprender carbohidratos fucosilados. Otro ejemplo de estructuras fucosiladas que tiene una función biológica son las estructuras que forman el sistema de grupos sanguíneos AB0. Por otra parte, las (glico)proteínas terapéuticas representan la clase de más rápido crecimiento de los reactivos farmacéuticos, por lo que sus propiedades farmacocinéticas y su estabilidad se atribuyen a sus glicanos.

15 Debido a su naturaleza compleja y propiedades químicas inherentes, la síntesis química de productos glicoconjugados es un gran desafío y se asocia con importantes dificultades. A diferencia de las proteínas y los ácidos nucleicos, para los que están disponibles en el mercado sintetizadores automáticos, los glicanos - y dejando solos los productos glicoconjugados - no pueden (todavía) ser sintetizados usando un sistema comercial general. Además del requerimiento de control de la estereoquímica, sigue siendo difícil la formación de vínculos específicos.

20 En vista de la complejidad asociada con la química o la síntesis enzimática/química combinada de los productos glicoconjugados, enfoques recientes han utilizado glicosiltransferasas para sintetizar enzimáticamente (glico)proteínas y (glico)lípidos que comprenden los residuos de oligosacáridos.

25 Las fucosiltransferasas, que pertenecen a la familia enzimática de las glicosiltransferasas, se expresan ampliamente en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias. Catalizan la transferencia de un residuo de fucosa de un donador, generalmente guanosina-difosfato fucosa (GDP-fucosa) a un aceptor, que incluye oligosacáridos, (glico)proteínas y (glico)lípidos. Los sustratos aceptores fucosilados de este modo están implicados en una variedad de procesos biológicos y patológicos.

30 Basándose en el sitio de la adición de fucosa, las fucosiltransferasas se clasifican en alfa-1,2 -, alfa-1,3/4- y O-fucosiltransferasas. Se han identificado varias alfa-1,2-fucosiltransferasas, p. ej., en las bacterias *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, en mamíferos, *Caenorhabditis elegans* y *Schistosoma mansoni*, así como en plantas. La mayoría de estas enzimas puede no expresarse ya sea en una forma activa en sistemas bacterianos, o puede no utilizar lactosa como aceptor.

35 Liu et al. ("Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences", MOLECULAR AND CELLULAR PROBES 21 (2007) 295-302) describen la secuenciación e identificación de agrupaciones de genes de antígeno O de serogrupos O117, O126, y O146 de *Escherichia coli*. Liu et al. también describen que el serogrupo O126 de *Escherichia coli* contiene naturalmente un gen que tiene una identidad de 42%/similitud de 57% con los genes de la glicosiltransferasa de *Salmonella enterica*.

45 Albermann et al. ("Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes", CARBOHYDRATE RESEARCH 334 (2001) 97-103) describen la síntesis del oligosacárido de la leche 2'-fucosil lactosa utilizando enzimas bacterianas recombinantes con secuencias específicas de *Helicobacter pylori*.

50 Del un modo similar, el documento EP 1 275 714 A1 describe procesos y células para la producción de un carbohidrato complejo que contiene fucosa, cuyas células incorporan fucosiltransferasa recombinante de *Bacteroides fragilis*.

55 En los mamíferos, la GDP-fucosa se sintetiza en el citoplasma a través síntesis *de novo* y la ruta salvaje. Con la síntesis *de novo*, la GDP-manosa se convierte en el GDP-fucosa a través de dos enzimas, mientras que la ruta salvaje utiliza la fucosa citosólica libre como sustrato. En la célula, la GDP-fucosa se concentra en vesículas y es reconocida por fucosiltransferasas como sustrato donador. Sin embargo, la expresión funcional heteróloga de las glicosiltransferasas eucarióticas, y en particular las fucosiltransferasas resultó difícil en sistemas de expresión procarióticos. Los oligosacáridos de mamíferos y en particular de seres humanos tales como los HMO no son conocidos a partir de fuentes procarióticas, haciendo así extremadamente improbable el descubrimiento de las glicosiltransferasas que elaboran estos oligosacáridos.

60 Puesto que la actividad biológica de muchos oligosacáridos, (glico)proteínas y (glico)lípidos comercialmente importantes depende de la presencia de determinados residuos de fucosa, existe una necesidad en el estado de la

técnica de sintetizar o producir de manera eficiente productos glicoconjugados que tengan el residuo o los residuos de oligosacárido deseados.

5 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar herramientas y métodos por medio de los cuales se puedan producir sustratos fucosilados de forma eficaz con ahorro de tiempo y coste, que produzca altas cantidades del sustrato deseado.

10 De acuerdo con la invención, este objeto se resuelve, entre otras cosas, por el uso de un polinucleótido recombinante o sintético, aislado que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- a) el SEC ID NO: 1 de la lista de secuencias adjunta;
- b) una secuencia de ácido nucleico complementaria al SEC ID NO: 1;
- 15 c) secuencias de ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácidos nucleicos definidas en a) y b) o sus cadenas complementarias.

El polinucleótido usado en la invención (véase el SEQ ID NO: 1) representa una fucosiltransferasa de la especie *Escherichia coli* serogrupo 0126.

20 La fucosiltransferasa tiene efectos sorprendentes ya que mediante su uso se pueden realizar reacciones que no son de origen natural en el organismo fuente: Dentro del alcance de la presente invención se ha encontrado que la alfa-1,2-fucosiltransferasa anteriormente identificada es capaz de utilizar lactosa como sustrato y es capaz de producir oligosacáridos fucosilados, en particular, 2'-fucosil lactosa. Hasta la fecha, no se ha demostrado que ninguna de las alfa-1,2-fucosiltransferasas conocidos aisladas de bacterias utilice la lactosa como sustrato natural para la producción de fucosil lactosa. Por lo tanto, la idoneidad de la fucosiltransferasa recientemente identificada que se va a utilizar para la producción de oligosacáridos fucosilados es altamente sorprendente, y, por lo tanto, su uso representa una excelente herramienta para producir fácilmente, eficazmente y con ahorro de coste, p. ej., oligosacáridos de leche humana (HMO), tales como fucosil lactosa. Hoy en día, se han caracterizado estructuralmente más de 80 compuestos pertenecientes a los HMO; representan una clase de oligosacáridos complejos que funcionan como prebióticos. Además, la homología estructural de los HMO con epítomos epiteliales explica las propiedades de protección contra los patógenos bacterianos. Dentro del tracto gastrointestinal de lactantes, los HMO fomentan selectivamente el crecimiento de cepas de bacterias seleccionadas y están, por lo tanto, cebando el desarrollo de una microbiota intestinal única en lactantes amamantados con leche materna.

35 Dado que, hasta ahora, la complejidad estructural de estos oligosacáridos ha impedido su producción sintética, la principal fuente de los HMO sigue siendo la leche humana. Por lo tanto, existe una necesidad de HMO obtenibles rápida y fácilmente, que puedan ser proporcionados mediante el uso de la -sorprendentemente adecuada - fucosiltransferasa presentada en la presente memoria.

40 De acuerdo con la presente invención, los términos "polinucleótido o polinucleótidos" se refieren generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. "Polinucleótido o polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN de cadena sencilla o doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla o doble, o regiones de cadena sencilla, doble y triple, ARN de cadena sencilla y doble, y ARN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser de cadena sencilla o, más típicamente, regiones de cadena doble, o de cadena triple, o una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble. Además, "polinucleótido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice a menudo es un oligonucleótido. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "polinucleótido o polinucleótidos" incluyen también ADN o ARN como se ha descrito anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o los ARN con estructuras modificadas para la estabilidad o por otras razones son "uno o varios polinucleótidos", para los que está dirigido ese término en la presente memoria. Por otra parte, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por citar sólo dos ejemplos, son polinucleótidos para los que se utiliza el término en la presente memoria. Se apreciará que se han realizado una gran variedad de modificaciones para ADN y ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. Los términos "polinucleótido o polinucleótidos", según se utiliza en la presente memoria abarca tales formas de polinucleótidos químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas. Además, "polinucleótido o polinucleótidos" también abarcan polinucleótidos cortos a menudo referidos como oligonucleótido u oligonucleótidos.

"Polipéptido o polipéptidos" se refieren a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido o polipéptidos" se refieren tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros y a cadenas más largas generalmente referidas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. "Polipéptido o polipéptidos" incluyen los modificados ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones post-traduccionales, así como mediante técnicas de modificación química. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación, y son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diverso grado en varios sitios en un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo terminales. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, selenoilación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por transferencia de ARN, tal como arginilación, y ubicuitinación. Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden resultar de procesos post-traduccionales naturales y pueden realizarse también por medio de métodos enteramente sintéticos.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural, es decir, si se produce en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en la presente memoria. Del mismo modo, una secuencia "sintética", ya que el término se usa en la presente memoria, significa cualquier secuencia que se ha generado sintéticamente y no se ha aislado directamente de una fuente natural. "Recombinante" significa ADN modificado genéticamente preparado mediante el trasplante o el corte y empalme de genes de una especie a las células de un organismo anfitrión de una especie diferente. Tal ADN se convierte en parte de la composición genética del anfitrión y se replica.

El término "polinucleótido que codifica un polipéptido" según se utiliza en la presente memoria abarca polinucleótidos que incluyen la secuencia que codifica el polipéptido de la invención, en particular una alfa-1,2-fucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en el SEC ID NO: 2. El término también abarca polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidos por un fago integrado o una secuencia de inserción o de edición) junto con regiones adicionales que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

"Variante o variantes", según se utiliza el término en la presente memoria, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente, pero conserva las propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar o no la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que se produzca naturalmente. Las variantes de origen no natural de polinucleótidos y polipéptidos pueden elaborarse mediante técnicas de mutagénesis, mediante síntesis directa, y mediante otros métodos recombinantes conocidos por los expertos en la técnica.

Los términos "alfa-1,2-fucosiltransferasa" o "fucosiltransferasa" o un ácido nucleico/polinucleótido que codifica una "alfa-1,2-fucosiltransferasa" o "fucosiltransferasa" se refieren a una glicosiltransferasa que cataliza la transferencia de fucosa desde un sustrato donador, por ejemplo, GDP-fucosa, a una molécula aceptora en una unión alfa-1,2. La molécula aceptora puede ser un carbohidrato, un oligosacárido, una proteína o glicoproteína, o un lípido o glicolípido, y puede ser, por ejemplo, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetil lactosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico, glucosa, lactosa o cualquier combinación de los mismos. Dentro del alcance de la presente invención, también están compuestos por esos términos variantes polimórficas de ácido nucleico/polinucleótido y polipéptido, alelos,

mutantes, y homólogos interespecie, que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60% de identidad de secuencia de aminoácido, 65 %, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferiblemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con respecto a un polipéptido codificado por el ácido nucleico del SEQ ID NO: 1, o la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.

Adicionalmente, el polipéptido alfa-1,2-fucosiltransferasa puede ser alterado por adiciones o deleciones de secuencias de péptidos con el fin de modificar su actividad. Por ejemplo, las secuencias de polipéptidos pueden fusionarse con el polipéptido alfa-1,2-fucosiltransferasa el fin de efectuar la actividad enzimática adicional. Alternativamente, los aminoácidos se pueden suprimir para eliminar o modificar la actividad de la proteína. La proteína puede modificarse para que carezca de actividad enzimática alfa-1,2-fucosiltransferasa pero todavía conserve su estructura tridimensional estructural. Tal modificación sería útil en el desarrollo de anticuerpos contra el polipéptido alfa-1,2-fucosiltransferasa.

Además, los productos génicos de alfa-1,2-fucosiltransferasa pueden incluir proteínas o polipéptidos que representan productos génicos funcionalmente equivalentes. Tal producto génico de alfa-1,2-fucosiltransferasa equivalente puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de gen de la alfa-1,2-fucosiltransferasa descrito anteriormente, pero que da como resultado un cambio silencioso, produciendo de este modo un producto génico de alfa-1,2-fucosiltransferasa funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; los aminoácidos neutros planares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina, y glutamina; los aminoácidos cargado positivamente (alcalinos) incluyen arginina, lisina, e histidina, y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Dentro del contexto de esta invención, "funcionalmente equivalente", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido capaz de exhibir una actividad *in vivo* sustancialmente similar a la del producto génico endógeno de la alfa-1,2-fucosiltransferasa codificada por la secuencia de gen de la alfa-1,2-fucosiltransferasa descrito anteriormente, como se juzga por cualquiera de una serie de criterios, incluyendo pero no limitados a la antigenicidad, es decir, la capacidad de unirse a un anticuerpo anti-alfa-1,2-fucosiltransferasa, la inmunogenicidad, es decir, la capacidad de generar un anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína o polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa, así como la actividad enzimática.

Están incluidos dentro del alcance de la invención proteínas, polipéptidos, y derivados (incluyendo fragmentos) de alfa-1,2-fucosiltransferasa que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción. Además, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia del polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa.

El polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de alfa-1,2-fucosiltransferasa y señales de control de la traducción y la transcripción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

"Oligosacáridos", según se utiliza el término en la presente memoria y como se entiende generalmente en el estado de la técnica, se refiere a un polímero de sacárido que contiene un número pequeño, típicamente de tres a diez, azúcares sencillos, es decir, monosacáridos.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se utiliza un vector, que contiene una secuencia de ácido nucleico como se indica más arriba que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa, en donde la secuencia de ácido nucleico está conectada operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula anfitriona transformada con el vector. En una realización particularmente preferida, el vector es un vector de expresión, y, de acuerdo con otro aspecto de la invención, el vector puede estar presente en la forma de un plásmido, cósmido, fago, liposoma, o virus.

Además, la invención se refiere a células anfitrionas, que contienen una secuencia que consiste en el polinucleótido de acuerdo con la invención y como se ha descrito anteriormente, en donde la secuencia es una secuencia foránea para la célula anfitriona y en donde la secuencia se integra en el genoma de la célula anfitriona. De este modo, "foránea para la célula anfitriona" significa, que la secuencia no es de origen natural en dicha célula anfitriona, es decir, la secuencia es heteróloga con respecto a la célula anfitriona. La secuencia heteróloga puede ser introducida de forma estable, p. ej., mediante transfección, transformación, o transducción, en el genoma de la célula anfitriona, en donde se pueden aplicar técnicas que dependerán de la secuencia se vaya a introducir en la célula anfitriona.

Varias técnicas son conocidas para una persona experta en la técnica y son descritas, p. ej., por Sambrook *et al.*, 1989, supra. Por lo tanto, la célula anfitriona en la que se ha introducido la secuencia heteróloga, producirá la proteína heteróloga codificada por el polinucleótido de acuerdo con la invención.

- 5 Para la producción recombinante, las células anfitrionas pueden modificarse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula anfitriona puede efectuarse mediante métodos descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *y col.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986), y Sambrook *et al.*, 1989, supra.
- 10 Por lo tanto, el polinucleótido de acuerdo con la invención, puede, por ejemplo, estar incluido en un vector que va a ser transformado/transfectado de manera estable en células anfitrionas. En el vector, el polinucleótido de la invención está bajo el control, p. ej., de un promotor inducible, de manera que la expresión del gen/polinucleótido puede estar dirigida específicamente, y, si se desea, el gen puede ser expresado en exceso de esa forma.
- 15 Se puede utilizar una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episomales y derivados de virus, p. ej., vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los
- 20 constructos de sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan así como generan expresión. Generalmente, se pueden utilizar cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un anfitrión para la expresión a ese respecto. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, las establecidas por Sambrook *y col.*, véase más arriba.
- 25

Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2;
- 30 b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicha variante alélica es codificada por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1;
- c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho ortólogo es codificado por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones
- 35 rigurosas con la cadena opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1; y
- (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho fragmento comprende al menos 10 aminoácidos contiguos, y donde dicho fragmento tiene una actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa.

- 40 El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones bajo las cuales una sonda hibridará con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 15 C más baja que el
- 45 punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica definida, pH, y concentración de ácido nucleico) a la que 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y SDS al 1%, incubando a 42 C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubando a 65 C, con lavado en 0,2 x SSC, y SDS al 0,1% a 65 C.

- 50 Asimismo, la invención se refiere a una célula anfitriona que contiene un vector como se ha definido anteriormente, o que contiene el polinucleótido de acuerdo con la invención como una secuencia heteróloga introducida en el genoma de la célula anfitriona, y, en particular, una célula anfitriona que se selecciona del grupo que consiste de hongos incluyendo levadura, bacterias, insectos, animales y células vegetales. Se prefiere particularmente que la célula anfitriona sea una célula *Escherichia coli*.

- 55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula anfitriona", actualmente se define como una célula que ha sido transformada o transfectada, o que es susceptible de transformación o transfección por una secuencia de polinucleótido exógena.

- 60 Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en el anfitrión para expresar la secuencia que codifica el gen de la alfa-1,2-fucosiltransferasa de la invención. Tales sistemas de expresión en el anfitrión representan vehículos por medio de los cuales puede producirse y posteriormente purificarse la secuencia codificante de interés, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con la secuencia

codificante de nucleótidos apropiada, exhibe el producto génico de la alfa-1,2-fucosiltransferasa de la invención *in situ*.

5 Se pueden encontrar varios sistemas de expresión y anfitriones adecuados, por ejemplo, en el documento WO/0026383 y el documento EP 1 243 647, que tratan de una alfa-1,2-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori*, a cuya publicación se hace referencia explícitamente.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, el ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa se adapta al uso del codón de la célula respectiva.

10 Como se ha mencionado anteriormente, la invención se refiere al uso de un polinucleótido, el vector, o del polipéptido descrito en la invención, respectivamente, para la producción de un oligosacárido fucosilado.

15 De este modo, según un aspecto de la utilización, la producción de dicho oligosacárido fucosilado se lleva a cabo por medio de una expresión heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,2-fucosiltransferasa.

De acuerdo con otro aspecto de la utilización, el oligosacárido fucosilado es un oligosacárido conocido de la leche humana, tal como 2'-fucosil lactosa.

20 La invención también se refiere a un método para la producción de oligosacáridos fucosilados que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa como se describe en la invención,
- 25 b. poner en contacto el polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa de la etapa a. con una mezcla que comprende un sustrato donador que comprende un residuo de fucosa, y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido en condiciones en las que el polipéptido cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donador al sustrato aceptor, produciendo de este modo un oligosacárido fucosilado.

30 De acuerdo con la invención, el método para la producción de oligosacáridos fucosilados se puede realizar en un sistema libre de células o en un sistema que contiene células. Los sustratos se dejan reaccionar con el polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa durante un tiempo suficiente y bajo condiciones suficientes para permitir la formación del producto enzimático. Se ha de entender, que estas condiciones pueden variar dependiendo de las cantidades y la pureza del sustrato y la enzima, ya sea el sistema un sistema libre de células o un sistema basado en células. Estas variables se ajustarán fácilmente por los expertos en la técnica.

35 En los sistemas libres de células, el polipéptido de acuerdo con la invención, el sustrato o los sustratos aceptores, el sustrato o los sustratos donadores y, según sea el caso, otros ingredientes de la mezcla de reacción, incluyendo otras glicosiltransferasas y enzimas accesorias se combinan mediante mezcla en un medio de reacción acuoso. Las enzimas pueden utilizarse libres en solución, o pueden estar unidas a, o inmovilizadas en, un soporte tal como un polímero y los sustratos se pueden añadir al soporte. El soporte puede ser, por ejemplo, empaquetado en una columna.

40 Las células que contienen los sistemas para la síntesis de oligosacáridos fucosilados pueden incluir células anfitrionas modificadas recombinantemente.

45 Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para la producción de oligosacáridos fucosilados que comprende las etapas de:

- 50 a. cultivar, en condiciones nutrientes adecuadas permisivas para la producción del oligosacárido fucosilado, y permisivas para la expresión de un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa, una célula anfitriona como se ha descrito anteriormente;
- b. proporcionar, de forma simultánea o después de la etapa a, un sustrato donador que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un oligosacárido, de manera que la alfa-1,2-fucosiltransferasa expresada en dicha célula anfitriona catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donador al sustrato aceptor, produciendo de este modo un oligosacárido fucosilado; y
- 55 c. aislar dicho oligosacárido fucosilado de la célula anfitriona o de su medio de crecimiento.

60 En el método de acuerdo con la invención, el sustrato donador puede ser GDP-fucosa. Se prefiere particularmente que el sustrato donador sea GDP-fucosa.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el sustrato aceptor se selecciona entre N-acetilglucosamina, N-acetil-lactosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico, glucosa, lactosa o cualquier combinación de los mismos. En particular, se prefiere la lactosa como sustrato aceptor.

El término "sustrato", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier material o combinaciones de diferentes materiales sobre los que puede actuar el polipéptido de la invención para dar lugar a los oligosacáridos fucosilados.

5 Los sustratos se dejan reaccionar con el polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa durante un tiempo suficiente y bajo condiciones suficientes para permitir la formación del producto enzimático. Estas condiciones variarán dependiendo de las cantidades y la pureza de la enzima y sustrato, ya sea sistema es un sistema libre de células o un sistema basado en células. Estas variables pueden ser ajustadas fácilmente por los expertos en la técnica.

10 De acuerdo con un aspecto del método de acuerdo con la invención, el sustrato donador se proporciona en la etapa b. habiéndolo producido dentro de la célula anfitriona. Al hacerlo, una enzima que convierte, p. ej., fucosa, que se va a añadir a la célula anfitriona, en GDP-fucosa se expresa simultáneamente en la célula anfitriona. Esta enzima puede ser, p. ej., un fucosa quinasa/fucosa-1-fosfato guanililtransferasa bifuncional, como Fkp de *Bacteroides fragilis*, o la combinación de una fucosa quinasa por separado, junto con una fucosa-1-fosfato guanililtransferasa por separado como se conocen de varias especies incluyendo *Homo sapiens*, *Sus scrofa* y *Rattus norvegicus*.

15 Alternativamente, en la etapa b., el sustrato donador se puede añadir al medio de cultivo/las células anfitrionas o ser producido por el propio metabolismo de las células.

20 En otra realización adicional, la invención se refiere a un método que comprende las siguientes etapas

- 25 a) cultivar, las células anfitrionas transformadas o transfectadas para que comprendan una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre i) el SEQ ID NO: 1 a partir de la lista de secuencias adjunta, ii) una secuencia de ácido nucleico complementaria al SEC ID NO: 1, y iii) secuencias de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácidos nucleicos definidas en i) y ii) o sus cadenas complementarias, en condiciones nutrientes adecuadas de manera que las secuencias de ácido nucleico seleccionadas de i), ii) y iii) están siendo expresadas como un péptido que tiene actividad alfa -1,2-fucosiltransferasa;
- 30 b) proporcionar, de forma simultánea o después de la etapa a, un sustrato donador que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un oligosacárido, de manera que la alfa-1,2-fucosiltransferasa expresada en dicha célula anfitriona cataliza la transferencia de un residuo de fucosa desde el sustrato donador al sustrato aceptor, produciendo de este modo un oligosacárido fucosilado; y
- c) aislar dicho oligosacárido fucosilado de la célula anfitriona o el medio de su crecimiento.

35 En los métodos de acuerdo con la invención, el péptido que se expresa en la célula anfitriona, presenta la actividad de la alfa-1,2-fucosiltransferasa y, por lo tanto, transfiere un residuo de fucosa de un donador, p. ej., guanosina-difosfato fucosa (GDP-fucosa), a un aceptor, que incluye oligosacáridos. De esa manera, el sustrato aceptor fucosilado de este modo puede ser utilizado como aditivo alimentario, para la administración de suplementos de comida para bebés, o en forma de un compuesto terapéuticamente o farmacéuticamente activo. Con los nuevos métodos, los productos fucosilados se pueden proporcionar fácilmente y de manera eficaz, sin la necesidad de procesos sintéticos complicados, que consumen tiempo y costosos.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "aislamiento" significa cosechar, recoger o separar del sistema de expresión génica el producto producido por la alfa-1,2-fucosiltransferasa de acuerdo con la invención.

45 Por consiguiente, la invención también describe el oligosacárido fucosilado obtenido por medio de los métodos de acuerdo con la invención, así como a la utilización de un polinucleótido, el vector o el polipéptido como se ha descrito anteriormente para la producción de oligosacáridos fucosilados.

50 De acuerdo con otra realización más, la producción de dicho oligosacárido fucosilado se lleva a cabo por medio de una expresión (en exceso) heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,2-fucosiltransferasa.

55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria generalmente tienen el mismo significado que entiende comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos anteriormente y a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para el ácido nucleico y la síntesis de péptidos. Generalmente, las reacciones enzimáticas y las etapas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

60 La invención también abarca fragmentos de las secuencias de polinucleótidos allí descritas.

Otras ventajas se deducen de la descripción de las realizaciones y los dibujos adjuntos.

No hace falta decir que las características mencionadas anteriormente y las características que todavía se tienen que explicar a continuación se pueden utilizar no sólo en las combinaciones indicadas respectivamente, sino también en otras combinaciones o por su cuenta, sin apartarse del alcance de la presente invención.

5 Varias realizaciones de la invención se ilustran en las figuras y se explican con más detalle en la siguiente descripción. En las figuras:

La Fig. 1A muestra el ADN y la secuencia de aminoácidos del gen que codifica la alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL de *E. coli* O126;

10 La Fig. 1B muestra el mapa vectorial de pET22bHIS6PropwbgL, es decir el gen de codón optimizado *wbgL* de *Escherichia coli* O126 que codifica la nueva alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL clonada en pET22b(+) (Novagen, Darmstadt, Alemania, a través de BamHI/XhoI) al que se añadieron previamente 18 pb que codifican una etiqueta de His N-terminal y 621 pb del propéptido de la lipasa de *Staphylococcus hyicus* a través de NdeI/BamHI (ver más abajo la descripción);

15 La Fig. 1C muestra el mapa vectorial de pACYC-wbgL, es decir el gen de codón optimizado *wbgL* de *Escherichia coli* O126 que codifica la nueva alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL clonada en pACYCDuet-1 (Novagen a través de NcoI/BamHI);

20 La Fig. 2 muestra el cromatograma de la purificación de WbgL mediante una columna de Sefarosa IMAC Ni²⁺NTA (azul: absorción a 280 nm, rojo: conductividad; las fracciones que contienen His₆-Propéptido-WbgL eluyendo de la columna se denominan reserva IMAC);

25 La Fig. 3 muestra el análisis de SDS-PAGE de la expresión de His₆-propéptido-WbgL en el extracto bruto y las fracciones insolubles de *E. coli* JM109 (DE3) pET22bHIS6PropwbgL, así como en las fracciones de lavado de la purificación de His₆-Propéptido-WbgL y de His₆-Propéptido-WbgL purificado;

30 La Fig. 4 muestra la detección de His₆-Propéptido-WbgL en una inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His₆ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) después de la incubación con sustrato DAB (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania);

35 La Fig. 5 muestra el ensayo fotométrico continuo de His₆-Propéptido-WbgL purificado con GDP-L-fucosa 0,4 mM y lactosa 5 mM en el que la actividad se puede detectar por la disminución de la absorción a 340 nm causada por la oxidación de NADH;

40 La Fig. 6 muestra la detección de la producción de 2'-fucosil lactosa a partir de la reacción de WbgL mediante HPAEC-PAD en el inicio de la reacción donde no está presente 2'-fucosil lactosa (A); y 2'-fucosil lactosa producida después de 1 hora de reacción de WbgL con PIB-beta-L-fucosa 2 mM y lactosa 5 mM (B);

45 La Fig. 7 muestra el análisis de la mezcla de reacción iniciada con GDP-fucosa 2 mM y lactosa 5 mM y WbgL mediante electroforesis capilar en el comienzo de la reacción donde solo se puede detectar GDP-L-fucosa (A); y después de 16 horas de reacción donde solo se puede detectar guanosina como producto de degradación de GDP liberado por la actividad de WbgL (B);

La Fig. 8 muestra la actividad relativa de WbgL a diferentes valores de pH (pH 6,8 a 8,4) en tampón Tris-HCl 50 mM;

50 La Fig. 9 muestra el aumento de la concentración de 2'-fucosil lactosa como se mide en una reacción de WbgL iniciada con de GDP-beta-L-fucosa 2 mM y lactosa 5 mM en diferentes momentos específicos durante 16 horas de proceso de reacción;

55 La Fig. 10 muestra un cromatograma de HPLC; separación mediante una columna Phenomenex Rezex RCM de Ca²⁺ con agua como eluyente (0,6 ml/min durante 30 minutos a 80°C) y detección mediante el detector del índice de refracción (Shimadzu, Alemania) (A), y el cromatograma de HPLC; separación mediante una columna Reprosil Carbohydrate, 5 µm, 250 x 4,6 mm, con acetonitrilo/agua (68: 32) como eluyente (1,4 ml/min durante 20 minutos a 35°C; detección mediante detector del índice refracción (Shimadzu, Alemania)) (B);

La Fig. 11 muestra el espectro de RMN de 2'-fucosil lactosa producido por WbgL.

Ejemplo

Clonación del gen

5 Para la expresión citoplásmica de la supuesta alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL se modificó el vector de expresión pET22b (+) (Novagen, Darmstadt, Alemania). Por lo tanto, la secuencia líder *pefB* que guía la expresión periplásmica en *E. coli* se cortó utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. La secuencia génica del propéptido (SEC ID NO: 3) de la lipasa de *S. hyicus* (Sauerzapfe, B., DJ Namdjou, et al. (2008): "Characterization of recombinant fusion constructs of human beta-1,4-galactosyltransferase 1 and the lipase pre-propeptide from Staphylococcus hyicus." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 50(2-4): 128-140) se amplificó a partir del plásmido pLGalT 38 utilizando los cebadores 5'-CATATGCACCACCACCA-CCACAATGATTCGACAACACAAACAACGAC-3' (SEC ID NO: 5) y 3'-GGATCCGT-ATGGTTTTTGTGCTCGCTTG-5' (SEC ID NO: 6), y se fusionó al vector pET22b modificado resultante en el vector pET22bHis6Prop. El vector resultante se digirió mediante *BamHI* y *XhoI*. El gen que codifica la supuesta alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL de *E. coli* O126 fue sintetizado por Genart (Regensburg, Alemania) incluyendo los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*. La ligación en el vector pET22bHis6Prop proporcionó el vector de expresión pETHIS6PropwbgL (ver la Fig. 1A), que produce His₆-Propéptido-WbgL (513 aminoácidos) en el citoplasma de *E. coli* después de la inducción con isopropiltiogalactósido (IPTG). Alternativamente, el gen *wbgL* se clonó a través de *NcoI/BamHI* en el vector pACYCDuet-1 (Novagen, Darmstadt, Alemania) después de la amplificación utilizando los cebadores 5'-GATCACCATGGGCAGCATTATTCGTCTGCAGGGTGGTC-3' (SEC ID NO: 7) y 5'-GATCAGGATCCTTAGCAGCTGCTATGTTTATCAACGTTGATCC-3' (SEC ID NO: 8), para producir el vector pACYC-wbgL (véase la Fig. 1B). Para la propagación de plásmidos se utilizaron *E. coli* Nova Blue (Novagen, Darmstadt, Alemania) o *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Darmstadt, Alemania) y para la expresión de His₆-Propéptido-WbgL *E. coli* JM109 (DE3) (Promega[®], Madison, USA).

25 Cultivo y expresión de fucosiltransferasas

Los transformantes se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml que contienen 20 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C y 130 rpm. Para la producción de proteína las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 5 L con 1000 ml de medio TB a 37°C y 80 rpm. La inducción del promotor *lacZ* se llevó a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración final 0,1 mM a los cultivos (DO₆₀₀= 0,6-0,8). Se continuó la incubación durante 20 h a 25°C y las células se recogieron por finalmente centrifugación.

Purificación de la enzima

35 Una suspensión celular al 40% (p/p) de células de *E. coli* en tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, se rompió mediante sonicación (4x15 s). Después de la centrifugación (15.000 rpm, 30 min) los sedimentos se reservaron para el análisis de la producción de cuerpos de inclusión mediante SDS-PAGE. El extracto bruto (15 ml) se cargó en una columna IMAC (0,8 cm² x 10 cm, 1,5 ml/min) utilizando sefarosa Ni²⁺-NTA (Qiagen[®], Hilden, Alemania), que se equilibró previamente con 100 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 (tampón A). Después de una etapa de lavado con tampón B que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 20 mM, las proteínas eluyeron con una concentración de imidazol 300 mM en tampón C (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 0,3 M e imidazol 300 mM). Se analizaron todas las fracciones para determinar la concentración de proteína y se analizaron para determinar la actividad enzimática. Todas las fracciones que contenían WbgL activa soluble de la elución con tampón C se combinaron y la solución resultante se denominó reserva IMAC (véase la Fig. 2).

45 SDS-PAGE y detección mediante transferencia Western

La expresión de His₆-Propéptido-WbgL se controló mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Por lo tanto el análisis de SDS-PAGE se realizó con geles de acrilamida al 10% moldeados de acuerdo con las instrucciones de molde del gel de Invitrogen[®] (Invitrogen[®], Paisley, Reino Unido). Las muestras de proteína (40 µg) se cargaron en cada ranura del gel. Se utilizó Prestained Protein Ladder PageRuler™ (Fermentas[®], Vilnius, Lituania) para la determinación de la masa molecular. Los geles de proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (véase la Fig. 3).

55 Se realizó una inmunotransferencia con anticuerpos específicos anti-Anticuerpo His₆ para detectar His₆-Prop-WbgL. Por lo tanto las muestras de restos de células de *E. coli* JM109 (DE3), el extracto bruto y fracciones IMAC de His₆-Propéptido-WbgL se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF mediante el protocolo de transferencia Western NuPAGE (BioRad, Munich, Alemania). Las membranas se bloquearon con BSA al 3% en tampón TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2). Para la unión específica se utilizó un anticuerpo monoclonal anti His₆ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Después de una etapa de lavado con tampón TBS que contenía Tween 20 al 0,1% las transferencias se incubaron con sustrato DAB (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y la reacción con HRP se detuvo mediante la eliminación de la solución y adición de agua destilada (véase la Fig. 4).

Análisis de actividad

Las actividades enzimáticas de His₆-Propéptido-WbgL en el extracto crudo y las fracciones IMAC se determinaron mediante un ensayo fotométrico y análisis HPAEC-PAD de 2'-fucosil lactosa.

El ensayo fotométrico se realizó mediante el sistema de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa para la detección del GDP liberado (Barratt, DH, L. Barber, et al. (2001). "Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea." *Plant Physiology* 127(2): 655-664.). La mezcla de reacción para el análisis de la placa de microtitulación contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, GDP-beta-L-fucosa 2 mM de, lactosa 5 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM, DTT 1 mM, NADH 0,25 mM, MnCl₂ 2 mM, 5 U de piruvato quinasa, y 5 U de lactato deshidrogenasa en un volumen total de 250 µl. La reacción se inició mediante la adición de 100 µl de solución enzimática y siguió a 340 nm a 30°C. Los experimentos de control para la detección de actividades colaterales se realizaron sin lactosa sustrato aceptor (véase la Fig. 5).

La actividad enzimática también se determinó mediante análisis HPAEC-PAD para la detección de 2'-fucosil lactosa. La solución de análisis contenía GDB-L-fucosa 2 mM, lactosa 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 con MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, 1 U de fosfatasa alcalina en un volumen total de 175 µl y se incubó a 30°C después de la adición de 175 µl de extracto bruto y solución de enzima purificada. La reacción se detuvo calentando durante 5 min a 95°C en diferentes momentos específicos, en los que la tasa de conversión fue lineal. Las muestras centrifugadas se analizaron mediante Dionex HPAEC-PAD (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) en la columna CarboPac PA1 utilizando el soporte lógico Chromeleon™ 6.40. La elución se llevó a cabo con NaOH 50 mM a 30°C (velocidad de flujo 1 ml/min, volumen de inyección 50 µl). La concentración del trisacárido de 2'-fucosil lactosa generado se determinó mediante una curva de calibración patrón con 2'-fucosil lactosa disponible comercialmente y se utilizó para el cálculo posterior de la actividad enzimática (véase la Fig. 6).

Para HPAEC-PAD y para los análisis fotométricos, 1 U de His₆-Propéptido-WbgL es la cantidad de enzima que produce 1 µmol de producto (GDP o 2'-fucosil lactosa) por minuto bajo condiciones de análisis convencionales.

Se analizó GDP-beta-L-fucosa y su consumo mediante electroforesis capilar en un aparato P/ACE MDQ de Beckman Coulter (Krefeld, Alemania), equipado con un detector de UV. Las muestras para la determinación del sustrato donador activado GDP-beta-L-fucosa se detuvieron calentando (95°C) durante 5 min y se centrifugaron durante 10 min a 15.000 rpm (Rotina 35R, Hettich, Tuttlingen, Alemania). La detección se completó en un capilar de sílice fusionada no tratada (DI 75 mm, 57 cm de longitud capilar total, 50 cm hasta el detector) con tampón de Na₂B₄O₇·x 10 H₂O 50 mM/ácido bórico 64 mM, pH 8,9. Las condiciones para la migración y la detección fueron 25 kV (23 mA) a 25,8°C y detección UV a 254 nm, respectivamente. Las muestras se inyectaron a presión (5,0 seg a 0,5 psi en la dirección hacia adelante) (véase la Fig. 7). Las identidades de GDP-beta-L-fucosa y la guanosina generada se confirmaron con sustratos disponibles en el mercado.

pH óptimo y dependencia de iones metálicos

Para estudiar el valor de pH óptimo para la actividad de His₆-Propéptido-WbgL recombinante, se realizaron análisis a diferentes valores de pH de un tampón Tris-HCl 50 mM que oscilan de pH 6,8 a 8,4. El valor óptimo de pH fue de 7,6 (véase la Fig. 8). La adición de iones metálicos Mn²⁺ a análisis convencionales permitieron investigar la dependencia de iones metálicos. Todas las muestras se analizaron por medio de HPAEC-PAD como se ha descrito anteriormente. Se demostró, que la enzima no era dependiente de los iones Mn²⁺.

Análisis cinético

Las constantes cinéticas de His₆-Propéptido-WbgL para el sustrato aceptor lactosa y el sustrato donador GDP-beta-L-fucosa derivaban del análisis de la velocidad inicial a concentraciones de sustrato variables utilizando el análisis fotométrico descrito anteriormente. GDP-beta-L-fucosa varió de 0,02 mM a 4 mM a una concentración constante de lactosa 10 mM y la lactosa se alteró de 0,05 a 40 mM a una concentración constante de GDP-beta-L-fucosa 2 mM. Todos los datos se determinaron mediante análisis de regresión no lineal de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el soporte lógico Sigma Plot 10 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Alemania).

Tabla 1: Constantes cinéticas de alfa-1,2-fucosiltransferasa recombinante His₆-Propéptido-WbgL

Sustrato	Valor Km [mM]	Vmax [mU/mg]	Vmax/Km [mU*mg ⁻¹ *mM ⁻¹]	R ²
Lactosa	5,3	170	32	0,9935
GDP-fucosa	0,27	167	618	0,9907

Estudios de espectro del sustrato aceptor

El espectro del sustrato His₆-Propéptido-WbgL recombinante se analizó mediante HPAEC-PAD de acuerdo con el análisis de actividad descrito anteriormente. En lugar de lactosa 5 mM se sometieron a ensayo diferentes sustratos aceptores para determinar la actividad relativa en comparación con la lactosa.

Tabla 2: Espectro aceptor de alfa-1,2-fucosiltransferasa His6-propéptido-WbgL

Sustrato	Actividad relativa [%]
Lactosa	100
Lactulosa	124
LacNAc Typ I	28
LacNAc Typ II	95
D-Galactosa	71
3-Fucosil lactosa	0
β-Bencil-Lactosa	50
D-GalNAc	0
D-GalNH ₂	0
LacDiNAc	0

Producción de compuestos fucosilados

Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) *lacZ* pDEST 14-fkp pCOLA-Lacy-fucP con pACYCDuet-1 que portan el gen de fucosiltransferasa apropiado. Las colonias se cultivaron en placas 2YT con los antibióticos apropiados. Se cultivaron 5 ml en cultivos durante la noche (2YT con antibióticos) de cada cepa y de cada uno de estos cultivos se inocularon 15 ml de medio mineral al 1%. Las células se cultivaron utilizando glicerol como fuente de carbono y a DO600 = 0,5 se indujeron con IPTG 0,1 mM y se añadieron lactosa 40 mM y fucosa 30 mM. Los cultivos se incubaron a 30°C y 120 rpm. La producción de 2'-fucosil lactosa se verificó mediante análisis HPLC. La comparación de la cantidad de 2'-fucosil lactosa (2'-FL) producida por medio de la expresión de FucT2 de *Helicobacter pylori* en comparación con la expresión de WbgL de *Escherichia coli* O126 se muestra en la siguiente tabla 1:

Tabla 3: Comparación de la cantidad de 2'-fucosil lactosa producida utilizando alfa-1,2-fucosiltransferasas FucT2 de *Helicobacter pylori* y WbgL de *Escherichia coli* O126

Fucosiltransferasa	Rendimiento 2'-ml [mM]
sin (control negativo)	0,00
FucT2 (<i>Helicobacter pylori</i>)	2,01
WbgL (<i>Escherichia coli</i> O126)	4,05

Como se puede observar a partir de la Tabla 1, la cantidad del producto fucosilado 2'-fucosil lactosa fue significativamente mayor cuando se utilizó la alfa-1,2-fucosiltransferasa de acuerdo con la invención, es decir WbgL de *Escherichia coli* O126, en comparación con la alfa-1,2-fucosiltransferasa FucT2 de *Helicobacter pylori*, que es el estado de la técnica.

Purificación del producto de fucosilación

La 2'-fucosil lactosa producida como se ha descrito anteriormente se purificó en varias etapas. La primera etapa fue la purificación mediante adsorción sobre carbón activado. El sobrenadante del cultivo de la etapa de producción se aplicó a un lecho de carbón activado. El flujo directo se recogió y se analizó, pero no se detectó 2'-fucosil lactosa restante. Para la eliminación de compuestos medios unidos inespecíficamente tales como por ejemplo, sales y aminoácidos el lecho se lavó con agua destilada (sin 2'-FL en el flujo directo). La 2'-FL y la lactosa restante y fucosa se hicieron eluir a continuación con etanol del 96%. El etanol se evaporó posteriormente en un evaporador rotativo y el residuo se filtró a través de módulo de flujo transversal de 10 kDa (Microdin Nadir, Alemania). Las sales restantes se separaron por electrodiálisis y, después de eso, las endotoxinas se retiraron por medio de filtración utilizando un módulo de flujo cruzado (de Pall, Alemania). A continuación, la 2'-FL se separó de la lactosa y la fucosa a escala de gramos utilizando material de cromatografía de penetración en gel Biogel P-2 (BioRad, Alemania) empaquetado en una columna de vidrio de 520 mm x 428 mm con fritas. La purificación de 2'-FL se controló por medio de

cromatografía de capa fina. Las fracciones que contenían sólo 2'-fucosil lactosa se combinaron y se secaron por congelación.

Confirmación de la identidad del producto

5

La 2'-fucosil lactosa purificada producida utilizando la fucosiltransferasa presentada en esta invención se analizó mediante RMN H1 (véase la Fig. 11). El espectro resultante concordaba con el espectro recibido para el patrón de 2'-FL (Dextra, Reading, Reino Unido). Además de eso, se aplicaron diferentes métodos de HPLC para verificar la identidad de la 2'-FL resultante. Se aplicó HPAEC-PAD como se ha descrito anteriormente. Otros métodos fueron la separación utilizando una columna Phenomenex Rezex RCM Ca²⁺ con agua como eluyente (0,6 ml/min durante 30 minutos a 80°C; detección mediante el detector de índice de refracción (Shimadzu, Alemania)) (véase la Fig. 10A) y separación utilizando Reprosil Carbohydrate, 5 m, 250 x 4,6 mm, con acetonitrilo/agua (68 : 32) como eluyente (1,4 ml/min durante 20 minutos a 35°C; detección mediante detector de índice de refracción (Shimadzu, Alemania)) (véase la Fig. 10B)

10

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Jennewein Biotechnoloie GmbH	
5	<120> Fucosil transferasas novedosas y sus aplicaciones	
	<130> 2827P104EP	
	<160> 8	
10	<170> PatentIn versión 3. 3	
	<210> 1	
	<211> 894	
15	<212> ADN	
	<213> Escherichia coli	
	<400> 1	
	at gagcat t a t t cgt ct gca gggg ggt ct g ggt aat cagc t g t t t cagt t t agct t t ggt	60
	t at gccct ga gcaaaat t aa t ggt acaccg ct gt at t t cg acat t agcca t t at gccgaa	120
	aacgat gat c at ggt ggt t a t cgt ct gaat aat ct gcaga t t ccggaaga at at ct gcag	180
	t at t at accc cgaaaat t aa t aat at t t at aaact gct gg t gcgt ggcag ccgt ct gt at	240
	ccggat at t t t ct gt t t ct gggct t t t gc aacgaat t t c at gcct at gg ct acgat t t t	300
	gaat at at t g cccagaaat g gaaaagcaaa aaat acat t g gct act ggca gagcgaacac	360
	t t t t t cat a aacat at t ct ggacct gaaa gaat t t t t a t t ccgaaaaa t gt gagcgaa	420
	caggcaaat c t gct ggcagc aaaaaat t ct g gaaagccaga gcagcct gag cat t cat at t	480
	cgt cgt ggcg at t at at t aa aaacaaaacc gcaacct ga cacat ggt gt t t gt agcct g	540
	gaat at t at a aaaaagccct gaacaaaat c cgcgat ct gg caat gat t cg t gat gt gt t t	600
	at ct t t agcg acgat at ct t ct ggt gcaaa gaaaat at t g aaacct gct gagcaaaaaa	660
	t at aat at t t at t at agcga agat ct gagc caagaagagg at ct gt ggct gat gagcct g	720
	gcaaat cat c at at t at t gc caat agcagc t t t agt t ggt ggggt gcat a t ct gggg agc	780
	agcgcaagcc agat t g t t at t t at ccgacc ccgt ggt at g at at t accc gaaaaacacc	840
	t at at cccga t t gt gaacca t t ggat caac gt t gat aaac at agcagct g ct aa	894
20	<210> 2	
	<211> 297	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
25	<400> 2	
	Met Ser Ile Ile Arg Leu G n G y G y Leu G y Asn G n Leu Phe G n	
	1 5 10 15	
	Phe Ser Phe G y Tyr Ala Leu Ser Lys Ile Asn G y Thr Pro Leu Tyr	
	20 25 30	
	Phe Asp Ile Ser His Tyr Ala G u Asn Asp Asp His G y G y Tyr Arg	
	35 40 45	

ES 2 439 507 T3

Leu Asn Asn Leu G n Ile Pro G u G u Tyr Leu G n Tyr Tyr Thr Pro
 50 55 60
 Lys Ile Asn Asn Ile Tyr Lys Leu Leu Val Arg G y Ser Arg Leu Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asp Ile Phe Leu Phe Leu G y Phe Cys Asn G u Phe His Ala Tyr
 85 90 95
 G y Tyr Asp Phe G u Tyr Ile Ala G n Lys Trp Lys Ser Lys Lys Tyr
 100 105 110
 Ile G y Tyr Trp G n Ser G u His Phe Phe His Lys His Ile Leu Asp
 115 120 125
 Leu Lys G u Phe Phe Ile Pro Lys Asn Val Ser G u G n Ala Asn Leu
 130 135 140
 Leu Ala Ala Lys Ile Leu G u Ser G n Ser Ser Leu Ser Ile His Ile
 145 150 155 160
 Arg Arg G y Asp Tyr Ile Lys Asn Lys Thr Ala Thr Leu Thr His G y
 165 170 175
 Val Cys Ser Leu G u Tyr Tyr Lys Lys Ala Leu Asn Lys Ile Arg Asp
 180 185 190
 Leu Ala Met Ile Arg Asp Val Phe Ile Phe Ser Asp Asp Ile Phe Trp
 195 200 205
 Cys Lys G u Asn Ile G u Thr Leu Leu Ser Lys Lys Tyr Asn Ile Tyr
 210 215 220
 Tyr Ser G u Asp Leu Ser G n G u G u Asp Leu Trp Leu Met Ser Leu
 225 230 235 240
 Ala Asn His His Ile Ile Ala Asn Ser Ser Phe Ser Trp Trp G y Ala
 245 250 255
 Tyr Leu G y Ser Ser Ala Ser G n Ile Val Ile Tyr Pro Thr Pro Trp
 260 265 270
 Tyr Asp Ile Thr Pro Lys Asn Thr Tyr Ile Pro Ile Val Asn His Trp
 275 280 285
 Ile Asn Val Asp Lys His Ser Ser Cys
 290 295

<210> 3
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus hyicus

ES 2 439 507 T3

<400> 3
atgcaccacc accaccacca caatgattcg acaacacaaa caacgacacc actggaagtc 60
gctcaaactg cgcagcaaga aacacataca catcaaacac ctgttacct attacctact 120
gcaacacctg aacatgttga tgactctaaa gaagcaacac ctttacctga aaaagcagag 180
tcacaaaaaa ccgaagtgac agttcaacct tcatcgcat a cacaggaagt acctgcgtta 240
cataaaaaaa cacagcaaca accggcgtat aaggataaaa cggtagcaga gtcaacgata 300
gcatcaaagt cggttgaatc aaataaagca acagaaaatg agatgtcacc tgttgaacat 360
catgcttcaa atgtgaaaa acgtgaagat agatggaga ctatgagac aacaccgcca 420
tcagtgacc gtgaatttag ccataaaatc atcaataatg cgcacgtaaa tccaaaaacg 480
gatggacaaa caaacgttaa tgttgatcag aaaacgatag acaccgtttc accgaaagat 540
gacagaatag atacggcgca accgaaacaa gtcgacgctc ctaaagaaaa tacaacggca 600
caaaataat ttacctcaca agcgagcgac aaaaaacat ac 642

5 <210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Staphylococcus hyicus

10 <220>
<221> RASGOS_MISC

<222> (2) .. (7)

15 <223> Etiqueta de His

<400> 4
Met His His His His His His Asn Asp Ser Thr Thr Gl n Thr Thr Thr
1 5 10 15
Pro Leu Gl u Val Ala Gl n Thr Ser Gl n Gl n Gl u Thr His Thr His Gl n
20 25 30
Thr Pro Val Thr Ser Leu His Thr Ala Thr Pro Gl u His Val Asp Asp
35 40 45
Ser Lys Gl u Ala Thr Pro Leu Pro Gl u Lys Ala Gl u Ser Pro Lys Thr
50 55 60
Gl u Val Thr Val Gl n Pro Ser Ser His Thr Gl n Gl u Val Pro Ala Leu
65 70 75 80
His Lys Lys Thr Gl n Gl n Gl n Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Thr Val Pro
85 90 95
Gl u Ser Thr Ile Ala Ser Lys Ser Val Gl u Ser Asn Lys Ala Thr Gl u
100 105 110
Asn Gl u Met Ser Pro Val Gl u His His Ala Ser Asn Val Gl u Lys Arg
115 120 125

ES 2 439 507 T3

G u Asp Arg Leu G u Thr Asn G u Thr Thr Pro Pro Ser Val Asp Arg
 130 135 140

G u Phe Ser His Lys Ile Ile Asn Asn Ala His Val Asn Pro Lys Thr
 145 150 155 160

Asp G y G n Thr Asn Val Asn Val Asp Thr Lys Thr Ile Asp Thr Val
 165 170 175

Ser Pro Lys Asp Asp Arg Ile Asp Thr Ala G n Pro Lys G n Val Asp
 180 185 190

Al a Pro Lys G u Asn Thr Thr Ala G n Asn Lys Phe Thr Ser G n Al a
 195 200 205

Ser Asp Lys Lys Pro Tyr
 210

- 5 <210> 5
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador directo del propéptio etiquetado con His de 207 aminoácidos de Staphylococcus hyicus
 <400> 5
 catatgcacc accaccacca ccacaatgat tcgacaacac aaacaacgac 50
- 15 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador directo del propéptido etiquetado con His de 207 aminoácidos de Staphylococcus hyicus
- 25 <400> 6
 ggatccgtat ggtttttgt cgctcgcttg 30
- 30 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Cebador directo para la clonación del gen de codón optimizado wbgL a través de NcoI en pACYCDuet - 1
 <400> 7
 gatccacatg gggcagcatt attcgtctgc aggggtggtc 38
- 40 <210> 8
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>

ES 2 439 507 T3

<223> Cebador inverso para la clonación del gen de codón optimizado wbgL a través de BamHI en pACYCDuet - 1

5 <400> 8
gat caggat c ct t agcagct gct at gttta tcaacgtga t cc

43

REIVINDICACIONES

1. Una célula anfitriona para la producción de un oligosacárido fucosilado, conteniendo la célula anfitriona una secuencia que consiste en un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en, a) el SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias adjunta, b) una secuencia de ácido nucleico complementaria al SEC ID NO: 1, o c) secuencias de ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus cadenas complementarias, en donde la secuencia es una secuencia foránea para la célula anfitriona y en donde la secuencia se integra en el genoma de la célula anfitriona, o que contiene un vector que comprende dicho polinucleótido, en donde la secuencia de ácido nucleico está conectada operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula anfitriona transformada con el vector.
2. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la célula anfitriona se selecciona del grupo que consiste en células de hongos, incluyendo levaduras, bacterias, insectos, animales y vegetales.
3. La célula anfitriona, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada porque** la célula anfitriona es una célula de *Escherichia coli*.
4. La célula anfitriona, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** el ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa se adapta al uso del codón de la célula respectiva.
5. El uso de un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- a) el SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias adjunta;
 - b) una secuencia de ácido nucleico complementaria al SEC ID NO: 1;
 - c) secuencias de ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus cadenas complementarias,
- o de un vector que contiene dicho polinucleótido,
- o de un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2;
 - b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicha variante alélica es codificada por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1;
 - c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho ortólogo es codificado por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena opuesta de la molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1; y
 - (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho fragmento comprende al menos 10 aminoácidos contiguos,
- para la producción de un oligosacárido fucosilado.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la producción de dicho oligosacárido fucosilado se lleva a cabo por medio de una expresión heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,2-fucosiltransferasa, en donde la secuencia es una secuencia foránea a la célula anfitriona.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, **caracterizado porque** el oligosacárido fucosilado es un oligosacárido conocido de la leche humana.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** el oligosacárido fucosilado es la 2'-fucosil lactosa.
9. Un método para la producción de oligosacáridos fucosilados que comprende las etapas de:
- a) proporcionar un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicha variante alélica es codificada por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1, c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho ortólogo es codificado por una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena opuesta de la molécula de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 1, y (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, en donde dicho fragmento comprende al menos 10 aminoácidos contiguos,
 - b) poner en contacto el polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa de la etapa a. con una mezcla que comprende un sustrato donador que comprende un residuo de fucosa, y un sustrato aceptor que comprende un

mono- u oligosacárido o en condiciones en las que el polipéptido cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donador al sustrato aceptor, produciendo de este modo un oligosacárido fucosilado.

- 5 10. Un método para la producción de oligosacáridos fucosilados que comprende las etapas de:
- 5 a) cultivar, en condiciones nutrientes adecuadas permisivas para la producción del oligosacárido fucosilado, y permisivas para la expresión de un polipéptido con actividad alfa-1,2-fucosiltransferasa, una célula anfitriona como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4;
- 10 b) proporcionar simultáneamente o posteriormente a la etapa a. un sustrato donador que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido, para que el polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donador al sustrato aceptor, produciendo de este modo un oligosacárido fucosilado; y
- 10 c) aislar dicho oligosacárido fucosilado de la célula anfitriona o de su medio de crecimiento.
- 15 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, **caracterizado porque** el sustrato donador es la GDP-fucosa.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** la GDP-fucosa es proporcionada por una enzima expresada de forma simultánea en la célula anfitriona o por el metabolismo de la célula anfitriona.

ES 2 439 507 T3

Secuencia del gen que codifica la alfa-1,2-fucosiltransferasa WbgL de *E. coli* O126 (SEQ ID NO: 1)

```
ATGAGCATTATTCGTCTGCAGGGTGGTCTGGGTAATCAGCTGTTTCAGTTTAGCTT
TGGTTATGCCCTGAGCAAAATTAATGGTACACCGCTGTATTCGACATTAGCCATT
ATGCCGAAAACGATGATCATGGTGGTTATCGTCTGAATAATCTGCAGATTCCGGA
AGAATATCTGCAGTATTATACCCCGAAAATTAATAATATTTATAAACTGCTGGTG
CGTGGCAGCCGTCTGTATCCGGATATTTTTCTGTTTCTGGGCTTTTGCAACGAATT
TCATGCCTATGGCTACGATTTTGAATATATTGCCAGAAAATGGAAAAGCAAAAAA
TACATTGGCTACTGGCAGAGCGAACACTTTTTTCATAAACATATTCTGGACCTGA
AAGAATTTTTTATCCGAAAAATGTGAGCGAACAGGCAAATCTGCTGGCAGCAAA
AATTCTGGAAAGCCAGAGCAGCCTGAGCATTTCATATTCGTCGTGGCGATTATATT
AAAAACAAAACCGCAACCCTGACACATGGTGTGGTAGCCTGGAATATTATAAAA
AAGCCCTGAACAAAATCCGCGATCTGGCAATGATTCGTGATGTGTTTATCTTTAG
CGACGATATCTTCTGGTGCAAAGAAAATATTGAAACCCTGCTGAGCAAAAAATAT
AATATTTATTATAGCGAAGATCTGAGCCAAGAAGAGGATCTGTGGCTGATGAGCC
TGGCAAATCATCATATTATTGCCAATAGCAGCTTTAGTTGGTGGGGTGCATATCT
GGGTAGCAGCGCAAGCCAGATTGTTATTTATCCGACCCCGTGGTATGATATTACC
CCGAAAAACACCTATATCCCGATTGTGAACCATTGGATCAACGTTGATAAACATA
GCAGCTGCTAA
```

Secuencia del polipéptido/proteína de WbgL (SEQ ID NO: 2)

```
MSIIRLQGGLGNQLFQFSFGYALSKINGTPLYFDISHYAENDDHGGYRLNNLQIPEEYL
QYYTPKINNIYKLLVIRGSRLYPDIFLFLGFCNEFHAYGYDFEYIAQKWKSKEYIGYW
QSEHFFHKHILDLKEFFIPKNVSEQANLLAAKILESQSSLSIHRRGDYIKNKTATLTHG
VCSLEYKALNKIRDLAMIRDVFIFSDIFWCKENIETLLSKYNIYSEDLSQEEDL
WLMSLANHHIIANSSFSWWGAYLGSSASQIVYPTPWYDITPKNTYIPVNHWINVDK
HSSC
```

Fig. 1A

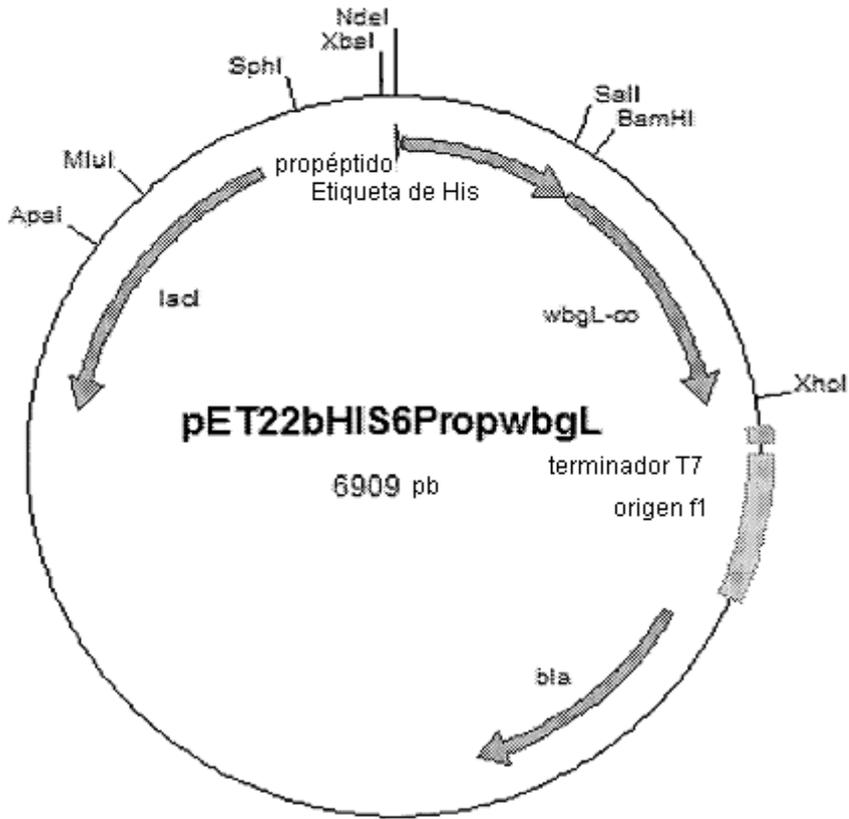


Fig. 1B

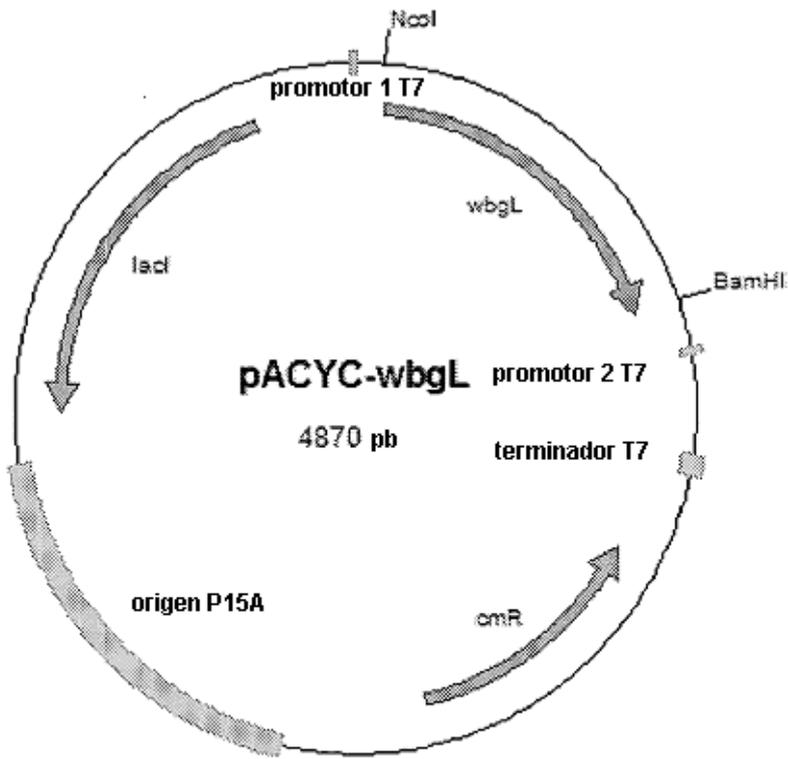


Fig. 1C

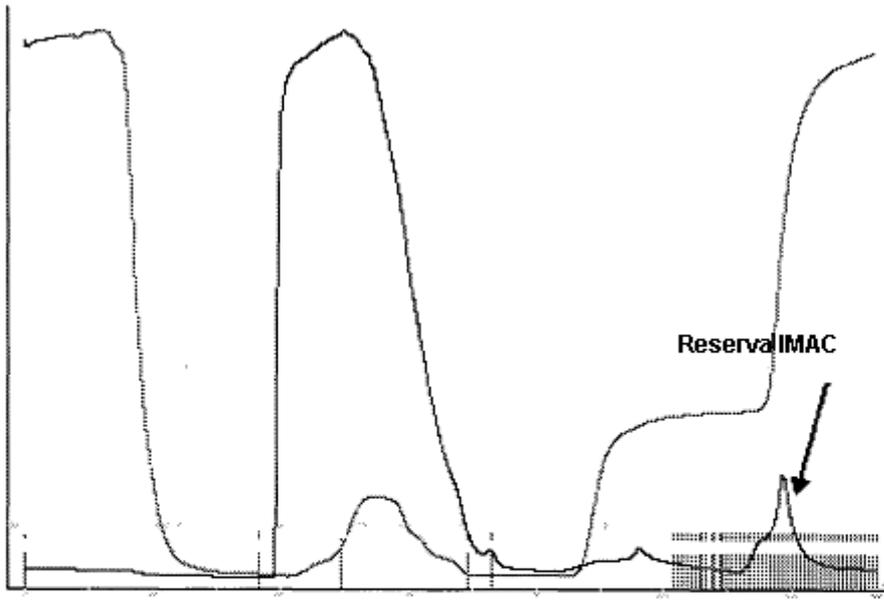
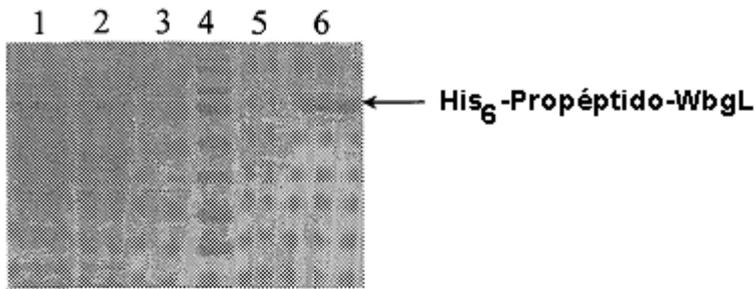
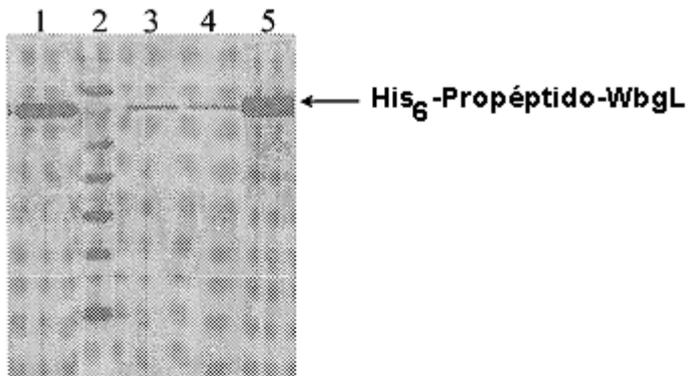


Fig. 2



- 1: *E. coli* JM109(DE3) pET22bHIS6PropepwbgL, fracción insoluble
- 2: *E. coli* JM109(DE3) pET22bHIS6PropepwbgL, extracto bruto
- 3 + 5: fracciones de lavado
- 4: Patrón de proteína PageRuler, Fermentas
- 5: His₆-Propéptido-WbgL purificado

Fig. 3



- 1: *E. coli* JM109(DE3) pET22bHIS6PropepwbgL, extracto bruto
- 2: Patrón de proteína
- 3 + 4: Reserva IMAC
- 5: *E. coli* JM109(DE3) pET22bHIS6PropepwbgL, fracción insoluble

Fig. 4

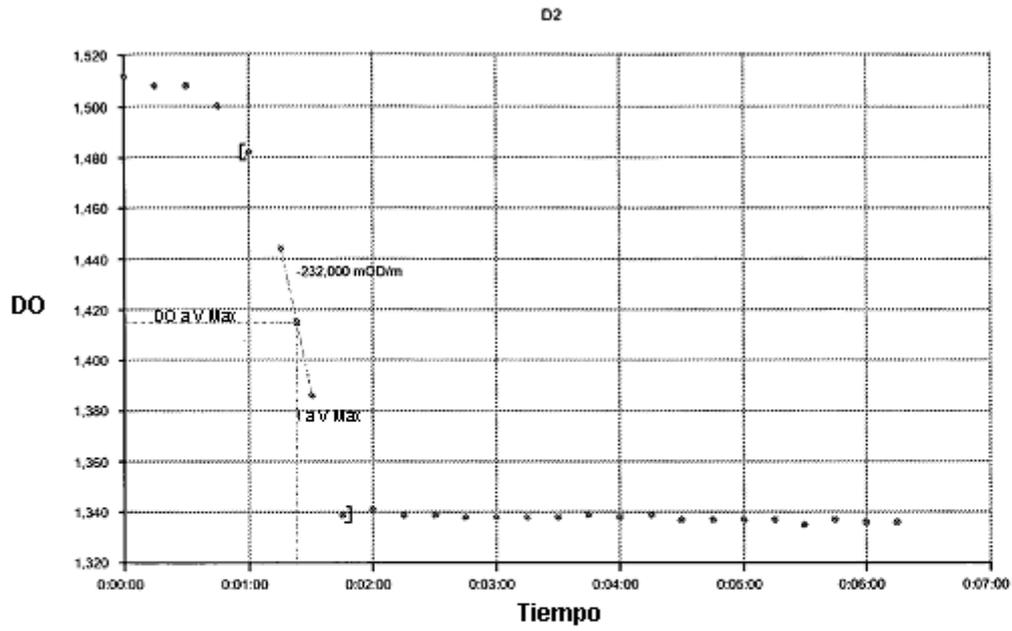


Fig. 5

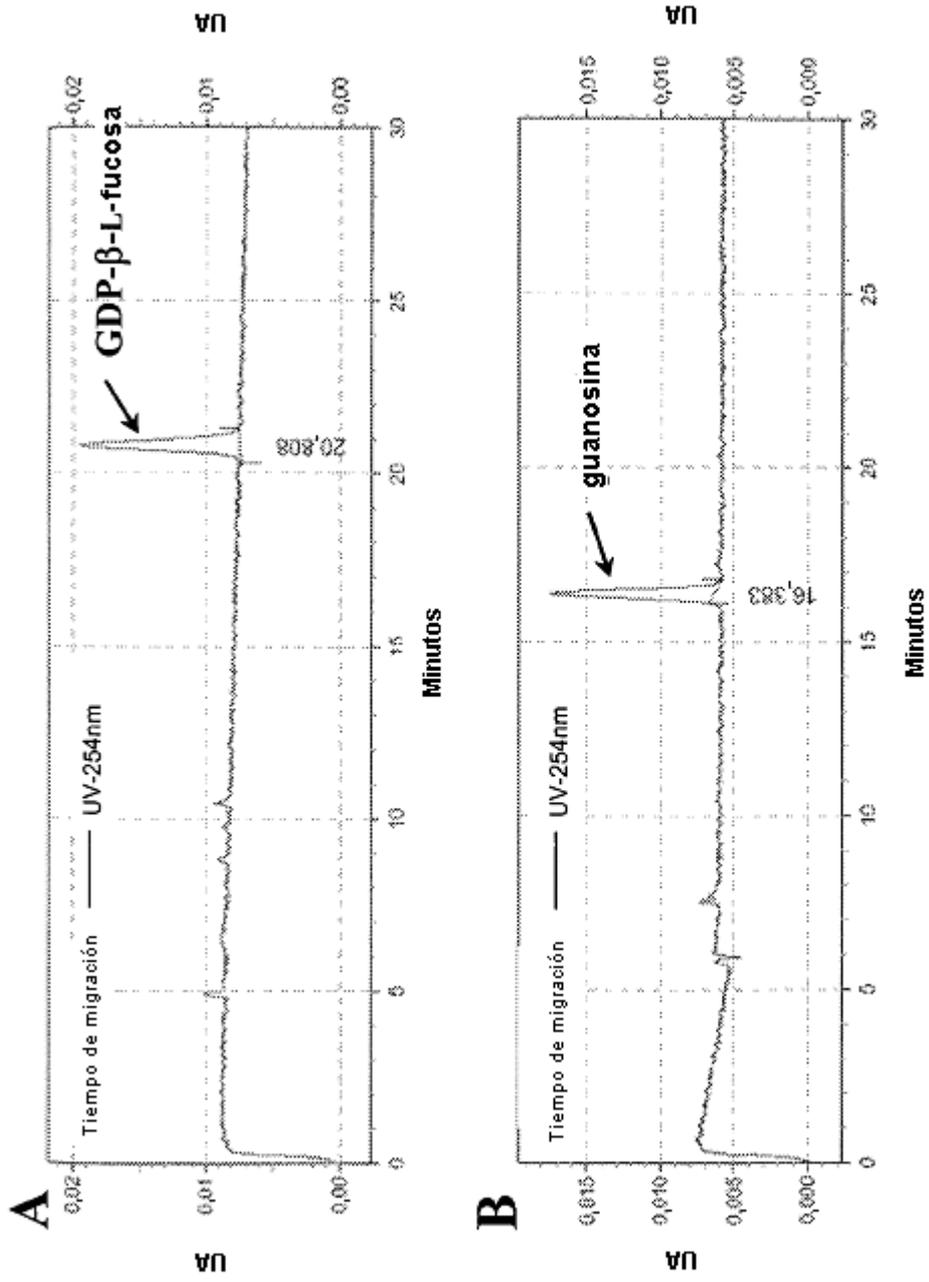


Fig. 7

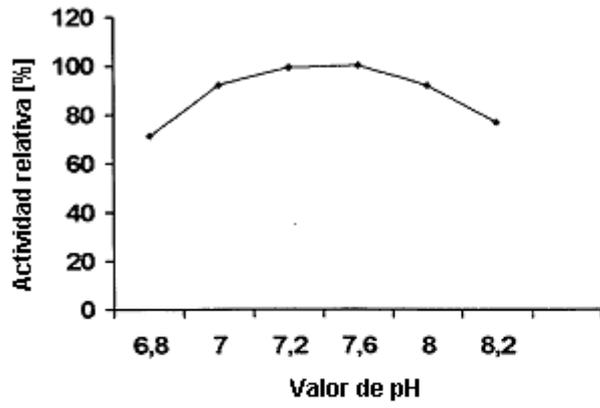


Fig. 8

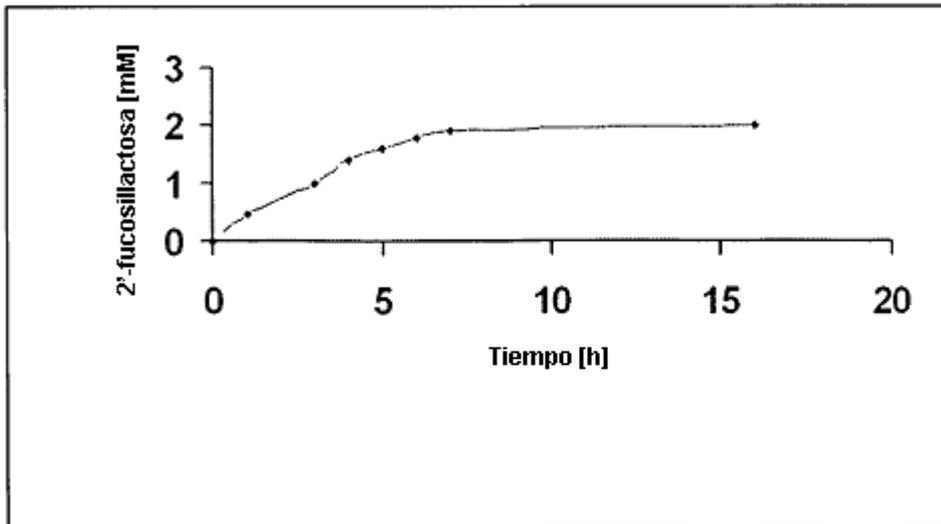


Fig. 9

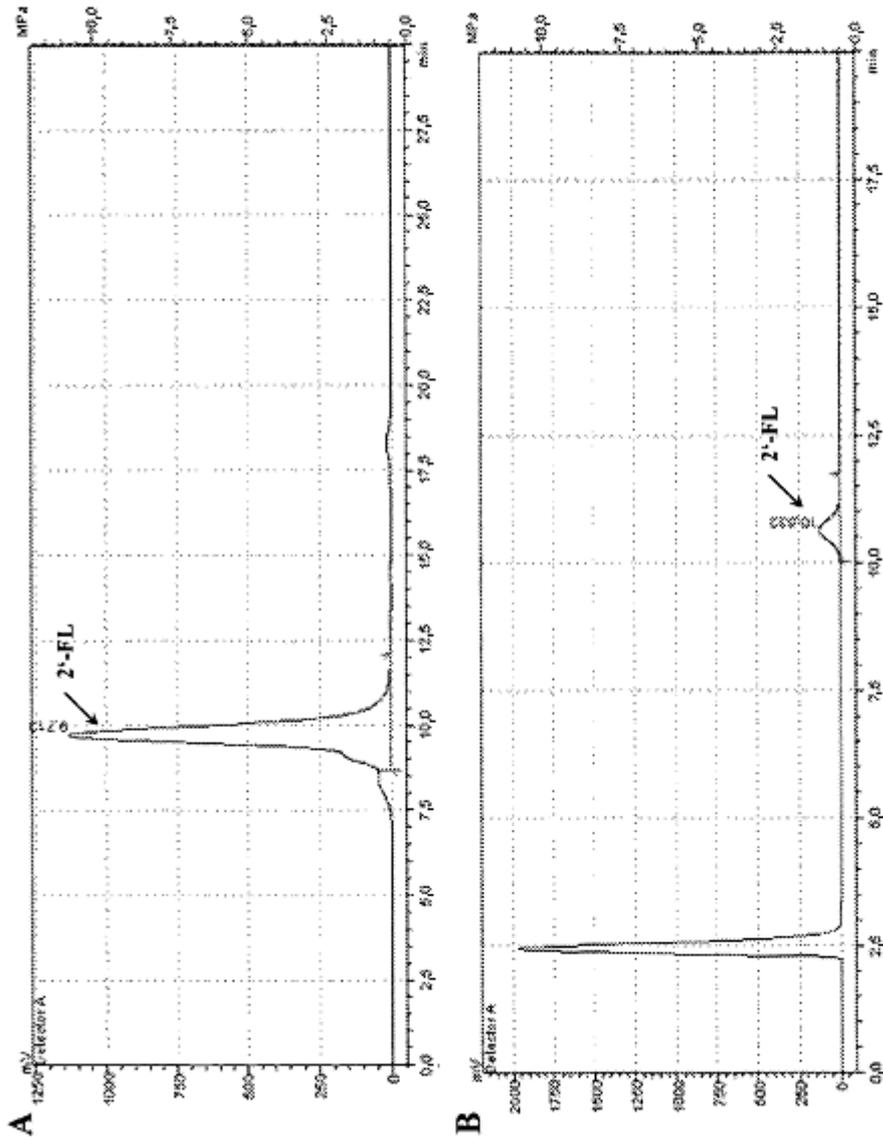


Fig. 10

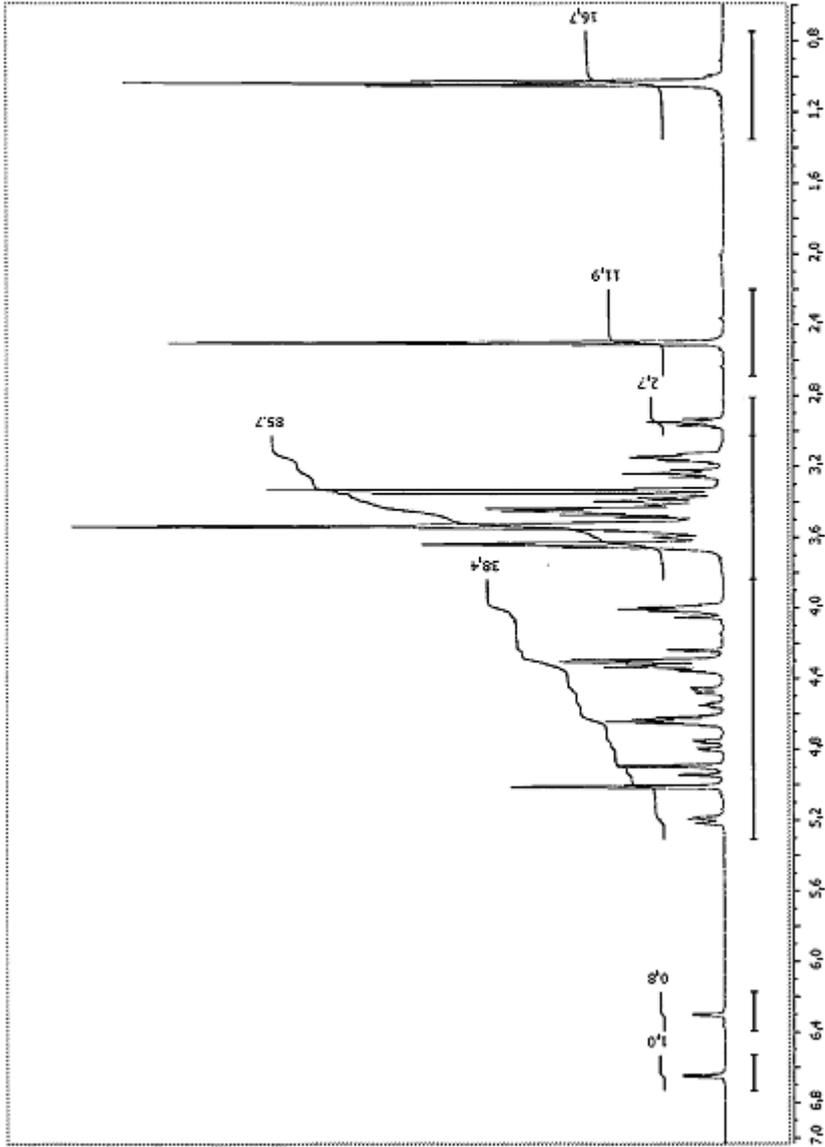


Fig. 11