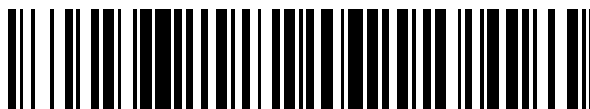


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 126**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2000** **E 09154489 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2062977**

54 Título: **Gen para la fucosiltransferasa**

30 Prioridad:

18.02.1999 AT 27099

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2014

73 Titular/es:

**ALTMANN, FRIEDRICH (100.0%)
INSTITUT FUR CHEMIE, UNIVERSITAT FUR
BODENKULTUR, MUTHGASSE 18
1190 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

ALTMANN, FRIEDRICH

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 444 126 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

Gen para la fucosiltransferasa.

- 5 La presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican para una fucosiltransferasa. La invención se refiere también a partes de la secuencia de dichos polinucleótidos así como a vectores que contienen dichos polinucleótidos, a células hospedadoras recombinantes y a plantas que han sido transfectadas por los polinucleótidos o por el ADN procedente de los mismos, así como a las glicoproteínas producidas en dicho sistema.
- 10 Las glicoproteínas presentan una multitud y complejidad de unidades de carbohidratos, cuya composición y disposición son características para organismos diferentes. Las unidades de oligosacárido de las glicoproteínas desempeñan una serie de funciones; así, por ejemplo, son importantes en la regulación del metabolismo, participan en la mediación de interacciones intercelulares, establecen los tiempos de circulación de proteínas en la circulación sanguínea y son decisivos para la detección de epítopes en las reacciones antígeno/anticuerpo.
- 15 La glicosilación de las glicoproteínas comienza en el retículo endoplásmico (RE), donde se unen los oligosacáridos o bien a las cadenas laterales de asparagina por enlaces N-glucosílicos o bien a las cadenas laterales de serina o treonina por enlaces O-glucosílicos. Los oligosacáridos con enlaces N-glucosílicos contienen un núcleo común de una unidad de pentasacárido constituida por tres radicales de manosa y dos radicales de N-acetilglucosamina. Para la modificación ulterior de las unidades de carbohidratos, las proteínas son transportadas por el RE al complejo de Golgi. La estructura de las unidades de oligosacárido con enlace N-glucosílico de las glicoproteínas es determinada por su conformación y la composición de las glicosiltransferasas de los compartimentos Golgi en los que son procesadas.
- 20 Se ha demostrado que en el complejo de Golgi de algunas células de plantas e insectos la unidad de pentasacárido del núcleo se encuentra substituida por xilosa y fucosa con enlace α -1,3 (P. Lerouge *et al.* 1998 Plant Mol. Biol. 38, 31-48; Rayon *et al.* 1998 L. Exp. Bot. 49, 1463-1472). El heptasacárido "MMXF³" resultante constituye el tipo del oligosacárido principal en las plantas (Kurosaka *et al.* 1991 J. Biol. Chem., 266, 4168-4172). Así, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, la β -fructosidasa de zanahorias y la lectina de *Erythrina cristagalli* así como la fosfolipasa A2 del veneno de las abejas melíferas o las glicoproteínas de la membrana neuronal de los embriones de insectos contienen radicales de α -1,3-fucosa, unidos al núcleo de glicano. Estas estructuras se denominan también N-glicanos complejos o N-glicanos deficientes en manosa o N-glicanos truncados. Además, los radicales α -manosilo pueden ser substituidos por GlcNAc, a los cuales están unidos galactosa y fucosa, produciendo una estructura que corresponde al epítipo humano Lewis a (Melo *et al.* 1997, FEBS Lett. 415, 186-191; Fitchette-Laine *et al.* 1997 Plant J. 12, 1411-1417).
- 30 Ni la xilosa ni la fucosa con enlace α -1,3 se encuentran en las glicoproteínas de mamíferos. Resulta que la α -1,3-fucosa del núcleo desempeña un papel importante en la detección de epítipes de anticuerpos dirigidos contra los oligosacáridos con enlace N de insectos (I.B.H. Wilson *et al.*, Glycobiology Vol. 8, n° 7, p. 651-661, 1998), disparando reacciones inmunes en el cuerpo humano o animal contra dichos oligosacáridos. Además, el radical α -1,3-fucosa parece ser una de las causas principales para la reactividad cruzada alérgica muy difundida entre los varios alérgenos de plantas y de insectos (Tretter *et al.*, Int. Arch. Allergy Immunol. 1993; 102:259-266) y se denomina también "determinante de carbohidrato de reacción cruzada" (CCD). En un estudio de los epítipes de tomates y polen de hierba se determinaron también radicales fucosa con enlace α -1,3 como determinante común, lo cual parece ser la causa de la frecuente aparición común de alergias de tomates y de polen de hierba en pacientes (Petersen *et al.* 1996, J. Allergy Clin. Immunol. Vol 98, 4; 805-814). Además, por la frecuente apariencia de las reacciones cruzadas inmunológicas, los CCDs ocultan los diagnósticos de alergias.
- 40 Dichas reacciones inmunológicas, que son desencadenadas por las proteínas de plantas en el cuerpo humano, representan el problema principal de la utilización médica de las proteínas humanas recombinantes, producidas en plantas. Para evitar dicho problema, habría que impedir la α -1,3-fucosilación del núcleo. En un estudio, se ha podido demostrar que los oligosacáridos que incluyen una L-galactosa en lugar de una L-fucosa (6-deoxi-L-galactosa) son no obstante completamente activos biológicamente (E. Zablackis *et al.* 1996, Science, Vol 272). Según otro estudio, se aisló una mutante de la planta *Arabidopsis thaliana*, a la que falta la N-acetilglucosaminiltransferasa I, que constituye la primera enzima en la biosíntesis de glicanos complejos. La biosíntesis de las glicoproteínas complejas en dicha mutante se encuentra por lo tanto perturbada. No obstante, dichas plantas mutadas son capaces de desarrollarse de forma normal en ciertas condiciones (A. Schaewen *et al.* 1993, Plant Physiol. 102; 1109-1118).
- 50 Para impedir selectivamente el enlace de la α -1,3-fucosa del núcleo en un oligosacárido, sin por ello intervenir también en otras etapas de la glicosilación, habría que eliminar sólo la enzima que es directamente responsable de dicha glicosilación específica, es decir, la α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo. Por primera vez, dicha transferasa se aisló y se caracterizó a partir de judías Mungo, y se descubrió que la actividad de dicha enzima es dependiente de la presencia de términos GlcNAc no reductores (Staudacher *et al.*, 1995, Glycoconjugate J. 12, 780-786). Dicha transferasa, que tiene lugar sólo en plantas e insectos, pero no en el ser humano u otros vertebrados habría que ser desactivada o inhibida selectivamente, con el fin de conseguir que las proteínas humanas que son producidas en
- 60
- 65

plantas o células de plantas o también en insectos o células de insectos ya no contienen, a diferencia de antes, dicho epítipo que dispara las reacciones inmunes.

El artículo de John M. Burke "Clearing the way for ribozymes" (Nature Biotechnology 15:414-415; 1997) se refiere al modo de funcionamiento general de ribozimas.

El artículo de Pooga *et al.* "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*" (Nature Biotechnology 16:857-861; 1998) se refiere a las moléculas de ANP de forma generalizada y específicamente a una molécula de ANP que es complementaria al ARNm humano del tipo de receptor de galanina 1.

La patente US nº 5.272.066 A se refiere a un procedimiento para la modificación de proteínas eucariotes y procariotes, con el fin de prolongar su circulación *in vivo*. En dicho procedimiento, se modifican los oligosacáridos ligados con la ayuda de diferentes enzimas, entre las cuales se encuentra también la GlcNac- α 1- $\rightarrow$ 3 (4)-fucosiltransferasa.

El documento EP 0 643 132 A1 se refiere a la clonación de una α -1,3-fucosiltransferasa aislada a partir de células humanas (THP-1). Las cadenas de carbohidratos descritas en dicho documento corresponden a los oligosacáridos humanos del tipo sialil Lewis x y sialil Lewis a. La especificidad de la enzima procedente de células humanas es completamente distinta a la de la fucosiltransferasa procedente de células de plantas.

Otras fucosiltransferasas animales se describen en Costache *et al.* (J. Biol. Chem. 272(47), (1997): 29721-29728).

Un objetivo de la presente invención es clonar y secuenciar el gen que codifica para una fucosiltransferasa vegetal, así como proporcionar un procedimiento para preparar glicoproteínas, que comprenden la α -1,3-fucosa del núcleo que normalmente tiene lugar.

El objetivo según la invención se alcanza por medio de un procedimiento para preparar glicoproteínas recombinantes, que comprende la producción de una glicoproteína recombinante en plantas o células de plantas, cuya producción de GlcNac- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida y cuya actividad de GlcNac- α -1,3-fucosiltransferasa está por debajo de un 50% de la actividad de GlcNac- α -1,3-fucosiltransferasa que tiene lugar en plantas o células de plantas naturales y la GlcNac- α -1,3-fucosiltransferasa es codificada por una molécula de ADN, que utiliza una secuencia según la SEC ID N°:1 (en la presente memoria se utilizó el código IUPAC, en el que "N" representa inosina) con un marco de lectura abierto desde el par de bases 211 hasta el par de bases 1740 o presenta una homología de por lo menos un 50% con respecto a la secuencia citada anteriormente o que se hibridiza con la secuencia citada anteriormente en condiciones rigurosas o comprende una secuencia que, como resultado del código genético, degenera en la secuencia de ADN citada anteriormente.

Dicha secuencia que nunca antes ha sido descrita resulta particularmente apta para cualquier experimento, análisis y procedimiento de preparación, etc., que se refieren a la actividad de la fucosiltransferasa de plantas. Para esto son de interés tanto la secuencia de ADN como la proteína para la que codifica dicha secuencia, utilizándose la secuencia de ADN, sin embargo, en particular para impedir la actividad de la fucosiltransferasa.

El marco de lectura abierto de la SEC ID No: 1 codifica para una proteína con 510 aminoácidos y un peso molecular teórico de 56,8 kDa, en el que se encuentra en la zona entre Asn36 y Gly54 probablemente una pieza transmembrana. El valor pl calculado de la proteína codificada de la secuencia según la SEC ID No: 1 es de 7,51.

La actividad de la fucosiltransferasa de plantas se detecta y se mide por medio de un método, en el que se adiciona la fucosiltransferasa a una muestra que comprende fucosa marcada y un aceptor (por ejemplo una glicoproteína) ligado a un soporte, por ejemplo Sefarosa. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se lava la muestra, y se mide el contenido en fucosa ligada. La actividad de la fucosiltransferasa se considera como positiva cuando la medición de la actividad es más alta en por lo menos un 10 a un 20%, en particular en por lo menos un 30 a un 50%, que la medición de la actividad del control negativo. Adicionalmente, la estructura de la glicoproteína puede verificarse mediante HPLC. Los protocolos de este tipo forman parte del estado de la técnica (Staudacher *et al.* 1998, Anal. Biochem. 246, 96-101; Staudacher *et al.* 1991, Eur. J. Biochem. 199, 745-751).

Por ejemplo, se adiciona fucosiltransferasa a una muestra que comprende fucosa marcada radiactivamente y un aceptor, por ejemplo GlcNac β 1-2Man α -1,3(GlcNac β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNac β 1-4GlcNac β 1-Asn. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se purifica la muestra por cromatografía de intercambio de aniones y se mide el contenido en fucosa ligada. La actividad puede calcularse a partir de la diferencia de la radiactividad medida de la muestra con aceptor y de la de un control negativo sin aceptor. La actividad de la fucosiltransferasa se considera ya como positiva cuando la radiactividad medida es más alta en por lo menos un 30-40% que la radiactividad medida del control negativo.

El apareamiento de dos moléculas ADN puede modificarse en función de la selección de la temperatura y de la

fuerza iónica de la muestra. Por condiciones rigurosas se entienden, según la invención, condiciones que permitan un enlace exacto, riguroso. Por ejemplo, las moléculas de ADN se hibridizan a 50°C en sulfato de sodio y dodecilo (SDS) al 7%, NaPO₄ (sic) 0,5 M, pH 7,0; EDTA 1 mM, y el producto resultante se lava con SDS al 1% a 42°C.

- 5 Por ejemplo, el programa FastDB del EMBL o el banco de datos SWISSPROT permite determinar si las secuencias presentan una homología de por lo menos un 50% con la SEC ID No: 1.

La secuencia de la molécula ADN codifica para una proteína con una actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa, en particular con una actividad de α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo. Tal como ya se ha descrito anteriormente, la α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo tiene lugar en plantas e insectos, pero no en el organismo humano, con lo cual es apta en particular dicha secuencia de ADN para ser utilizada en los análisis y experimentos específicos de la fucosiltransferasa así como en procedimientos de producción. Por una α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo se entiende en particular la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa unida a GDP-L-Fuc:Asn. Para los fines de la presente invención, por la denominación α -1,3-fucosiltransferasa se entiende por lo general en particular la α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo. Para la medición de la actividad descrita anteriormente, son aptos en particular los aceptores con un término GlcNAc no reductor. Entre los ejemplos de aceptores de este tipo se incluyen GlcNAc β 1-2Man α -1-3(GlcNAc β 1-2Man α -1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, GlcNAc β 1-2Man α -1-3(GlcNAc β 1-2Man α -1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α -1-6GlcNAc β 1-Asn y GlcNAc β 1-2Man α -3[Man α -1-3(Man α -1-6) Man α -1-6]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn. La medición de la insensibilidad a la N-glucosidasa F, lo cual puede detectarse por la espectrometría de masas, permite determinar si la fructosa está ligada.

Preferentemente, la molécula de ADN presenta una homología de por lo menos entre 70 y 80%, de forma particularmente preferida de por lo menos un 95%, con la secuencia según la SEC ID No: 1. Dicha secuencia codifica para una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa particularmente activa. Puesto que la secuencia de ADN puede estar modificada en mayor o menor grado según la planta o el insecto, una secuencia con una identidad de por ejemplo un 70% con la secuencia según la SEC ID No: 1, presenta también una actividad de fucosiltransferasa, que es suficiente para ser utilizada para análisis, experimentos o procedimientos de preparación, tal como se ha descrito anteriormente.

Se describe una molécula de ADN que comprende de 2.150 a 2.250, particularmente 2.198, pares de bases. Dicha molécula de ADN presenta de 100 a 300, preferentemente 210, pares de bases corriente arriba del codón de iniciación así como de 350 a 440, en particular 458, pares de bases corriente abajo del codón de terminación del marco de lectura abierto, en la que el extremo de la molécula de ADN presenta preferentemente una cola de 3'-poli(A). De esta manera, está asegurada una regulación perfecta al nivel de traducción, y se describe una molécula de ADN que codifica de forma particularmente eficaz y exenta de problemas para una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa activa.

Además, la presente invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia según la SEC ID No: 3 o una secuencia que presenta una homología de por lo menos un 85%, de forma particularmente preferida de por lo menos un 95%, especialmente de por lo menos un 99%, con la secuencia citada anteriormente, o hibridiza en condiciones rigurosas con la secuencia citada anteriormente o que, como resultado del código genético, está degenerada en la secuencia de ADN citada anteriormente. La homología se determina preferentemente mediante un programa que detecta inserciones y deleciones y no las incluye en el cálculo de la homología. Dicha secuencia de nucleótidos codifica para un motivo de péptido conservado, es decir, que la mayoría de las GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasas activas y funcionales comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la misma. Dicha secuencia puede presentar el mismo tamaño que la secuencia según la SEC ID No: 3 o, alternativamente, ser naturalmente también más larga. Dicha secuencia presenta una longitud menor que la secuencia que codifica para la proteína entera, siendo por lo tanto menos sensible a recombinaciones, deleciones u otras mutaciones. Debido al motivo conservado y a su mayor estabilidad, dicha secuencia es particularmente apta para las pruebas de detección de secuencias.

La SEC ID No: 3 presenta la secuencia siguiente: 5'-gaagccctgaagcactacaaatttagcttagcggttgaaattcgaatg aggaagattatgaactgaaaaattctccaatccctgtgtctggaactgtccct-3'.

Se divulga una molécula de ADN que comprende una parte de la secuencia de una de las moléculas de ADN citadas anteriormente y presenta un tamaño de 20 a 200, preferentemente 30 a 50, pares de bases. La molécula de ADN puede utilizarse por ejemplo para unirse como sonda a secuencias complementarias de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasas, con lo cual dichas secuencias pueden ser seleccionadas a partir de una muestra. Esto permite seleccionar, aislar y caracterizar otras GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasas a partir de una amplia gama de plantas e insectos. Pueden utilizarse cualquier parte de la secuencia o también varias partes diferentes de la secuencia, en particular una parte del motivo conservado ya descrito anteriormente.

Resulta particularmente ventajoso que una de las moléculas de ADN citadas anteriormente esté asociada de forma covalente a una sustancia de marcaje. Como sustancia de marcaje es apto cualquier marcador convencional, por ejemplo marcadores fluorescentes, luminiscentes, radiactivos, marcajes no isotópicos, tales como biotina, etc. Esto

produce reactivos que son útiles para la detección, selección y cuantificación de moléculas de ADN apropiadas en muestras de tejidos sólidas (por ejemplo de plantas) o también en muestras líquidas por medio de métodos de hibridización.

Además, se divulga un vector biológicamente funcional, que comprende una de las moléculas de ADN citadas anteriormente o parte de las distintas longitudes del mismo, que comprende por lo menos 20 pares de base. Para la transfección en células hospedadoras se necesita un vector independiente, capaz de multiplicación, en el que pueda utilizarse un vector apropiado según la célula hospedadora, el mecanismo de transfección, la función y tamaño de la molécula de ADN. Puesto que se conocen un gran número de vectores diferentes, su enumeración superaría los límites de la presente solicitud de patente, por lo cual se omitirá dicha lista aquí, en particular porque los vectores son bien conocidos por los expertos en la materia (para los vectores y cualquier técnica o término conocidos por los expertos en la materia, ver también Sambrook Maniatis). Idealmente, el vector presenta un bajo peso molecular y debería contener genes seleccionables, con el fin de producir un fenotipo fácilmente detectable en una célula, permitiendo una selección fácil de células hospedadoras que contienen vectores y de las que son libres de vectores. Para obtener un alto rendimiento en ADN y los productos de genes correspondientes, el vector debería contener un fuerte promotor así como un "enhancer", señales de amplificación de genes y secuencias de regulador. Para una replicación autónoma del vector, se necesita además un origen de replicación. Los puntos de poliadenilación son responsables para un procesamiento correcto del ARNm y las señales de "splicing" para el de los transcritos de ARN. Si los vectores utilizados son fagos, virus o partículas de virus, las señales de empaquetamiento controlan el empaquetamiento del ADN vectorial. Por ejemplo, para la transcripción en plantas son aptos plásmidos Ti y para la transcripción en células de insectos son aptos los baculovirus y en los de insectos son aptos los transposones, tales como el elemento P.

Si el vector descrito anteriormente se infiltra en una planta o en una célula de plantas, se consigue una inhibición postranscripcional de la expresión génica del gen de α -1,3-fucosiltransferasa endógeno por transcripción de un transgen homólogo al mismo o a partes del mismo en la orientación "sentido". Para dicha técnica "sentido", ver además las publicaciones Baulcombe 1996, *Plant Mol. Biol.* 9:373-382 y Brigneti *et al.* 1998, *EMBO J.* 17:6739-6746. Esta estrategia de "gene silencing" representa una opción eficaz para inhibir la expresión del gen de α -1,3-fucosiltransferasa, ver también Waterhouse *et al.* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13959-13964.

Además, la divulgación se refiere a un vector biológicamente funcional, que comprende una molécula de ADN según una de las formas de realización descritas anteriormente en una orientación inversa al promotor. Si dicho vector se transfecta en una célula hospedadora, se lee un "ARNm antisentido" que es complementario al ARNm de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y forma un complejo con el mismo. Dicho enlace obstaculiza o bien el procesamiento correcto, el transporte, estabilidad o bien la traducción por formación de un aducto con ribosomas y con esto la expresión génica normal de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa.

Aunque toda la secuencia de la molécula ADN podría incorporarse en el vector, partes de la secuencia pueden ser más ventajosas para fines determinadas, debido a su menor tamaño. Lo importante del aspecto "sentido" es por ejemplo que la molécula de ADN sea lo suficientemente grande como para formar un ARN "antisentido" lo suficientemente grande que forma un enlace con el ARN de la transferasa. Por ejemplo, una molécula de ARN adecuada comprende 50 a 200 nucleótidos, puesto que muchas moléculas de ARN "antisentido" conocidas, que tienen lugar naturalmente, comprenden unos 100 nucleótidos.

Para una inhibición particularmente eficaz de la expresión de una α -1,3-fucosiltransferasa activa, resulta apta una combinación de la técnica "sentido" y de la técnica "antisentido" (Waterhouse *et al.* 1998, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95:13959-13964).

De forma ventajosa, se utilizan moléculas de ARN de rápida hibridización. La eficacia de las moléculas ARN "antisentido" que presentan un tamaño de más de 50 nucleótidos depende de la cinética de formación de aductos in vitro. Así, por ejemplo, las moléculas de ARN "antisentido" de rápida formación de aductos presentan una mayor inhibición de la expresión de proteínas que las moléculas de ARN de lenta hibridización (Wagner *et al.* 1994, *Annu. Rev. Microbiol.*, 48:713-742; Rittner *et al.* 1993, *Nucl. Acids Res.*, 21:1381-1387). Las moléculas de ARN "antisentido" de este tipo de rápida hibridización incluyen en particular un gran número de bases externas (extremos libres y secuencias de unión), un gran número de subdominios estructurales (componentes) así como un bajo grado de bucles (Patzel *et al.* 1998; *Nature Biotechnology*, 16; 64-68). Las estructuras secundarias hipotéticas de la molécula de ARN "antisentido" pueden determinarse utilizando, por ejemplo, un programa de software, según el cual se realiza la selección de una secuencia de ADN/ARN "antisentido" adecuada.

Pueden incorporarse en el vector regiones distintas de la secuencia de la molécula de ADN. Una posibilidad consiste por ejemplo en incorporar en el vector sólo la parte que es responsable para la formación de aductos de las ribosomas. Un bloqueo en esta parte del ARNm es suficiente para parar la traducción entera. Una eficacia particularmente alta de las moléculas "antisentido" se obtiene también para las regiones 5' y 3' sin traducir del gen.

Una denominada molécula de ADN puede presentar una secuencia, que comprende una mutación por delección,

inserción y/o sustitución. El número de los nucleótidos así mutados es variable y se extiende de un solo nucleótido a varios nucleótidos mutados por delección, inserción o sustitución. También resulta posible que el marco de lectura quede trasladado como resultado de la mutación. Lo importante de un gen "knockout" de este tipo es solamente que la expresión de una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa esté perturbada, impidiendo la formación de una enzima activa, funcional. El lugar de dicha mutación es variable mientras se impida la expresión de una proteína enzimáticamente activa. Preferentemente, la mutación se encuentra en la zona catalítica de la enzima situada en la zona C terminal. Los procedimientos para introducir mutaciones en las secuencias de ADN es bien conocido por los expertos en la materia, de modo que aquí no es necesaria una discusión detallada de las varias posibilidades de mutagénesis. Aquí pueden utilizarse tanto las mutagénesis al azar como en particular las mutagenesis selectivas, por ejemplo la "site-directed mutagenesis", la mutagénesis controlada por oligonucleótidos o las mutagenesis con la ayuda de enzimas de restricción.

También se describe una molécula de ADN, que codifica para una ribozima que presenta dos secciones de la secuencia con por lo menos de 10 a 15 pares de bases cada una, que son complementarias a las secciones de la secuencia de una molécula de ADN, tal como se ha descrito anteriormente, tal como se ha descrito anteriormente, con lo cual la ribozima formará un complejo y cortará el ARNm transcrito por una molécula de ADN de una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa natural. La ribozima reconoce la ARNm de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa por el apareamiento de bases con el ARNm. A continuación, la ribozima corta y destruye la ARN de una forma específica para la secuencia, antes de que se someta la enzima a una traducción. Tras ser disociada del sustrato cortado, la ribozima hibridiza repetidas veces con moléculas de ARN y actúa como endonucleasa específica. Por lo general, es posible preparar ribozimas específicamente para inactivar un ARNm determinado, incluso cuando no se conoce toda la secuencia de ADN que codifica para la proteína. Las ribozimas son particularmente eficaces cuando las ribosomas se deslizan lentamente por el ARNm. En este caso, resulta más fácil para la ribozima encontrar un sitio en el ARNm que es libre de ribosomas. Por este motivo, los mutantes de ribosomas lentos son aptos también como sistema para ribosomas (J. Burke, 1997, Nature Biotechnology; 15, 414-415). Dicha molécula de ADN es particularmente apto para inhibir o impedir la expresión de una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa de plantas.

Otra opción es utilizar una forma modificada de una ribozima, es decir, una minizima. Minizimas son eficaces en particular para cortar moléculas de ARNm de mayor tamaño. Una minizima es una ribozima cabeza de martillo que, en lugar del Stem/Loop II, presenta un "linker" de oligonucleótido corto. Son particularmente eficaces las minizimas diméricas (Kuwabara *et al.* 1998, Nature Biotechnology, 16; 961-965).

Por ello, se describe un vector biológicamente funcional que comprende una de las moléculas de ADN (mutación o molécula de ADN de ribozima) citadas por último. Lo que se ha expuesto anteriormente referente a los vectores es aplicable de forma análoga. Un vector de este tipo puede infiltrarse por ejemplo en un microorganismo y utilizarse para preparar altas concentraciones de las moléculas de ADN descritas anteriormente. Además, un vector de este tipo es particularmente apto para infiltrar la molécula específica de ADN en un organismo vegetal, con el fin de restringir o impedir completamente la producción de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa en dicho organismo.

Se divulga un procedimiento para la preparación de un ADNc, que comprende la molécula de ADN divulgada, en el que se aísla ARN a partir de células de insectos o de plantas, en particular a partir de células del hipocotil, que se utilizará, tras adicionar una transcriptasa reversa y cebadores, para realizar una transcripción reversa. Las etapas individuales de dicho procedimiento se llevan a cabo según los protocolos conocidos de por sí. Para la transcripción inversa, existe, por un lado, la posibilidad de preparar el ADNc de todo el ARNm con ayuda de cebadores oligo(dT) y sólo entonces llevar a cabo una PCR con cebadores seleccionados, con el fin de preparar moléculas de ADN que comprenden el gen de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. Por otro lado, pueden utilizarse los cebadores seleccionados directamente para la transcripción reversa, con el fin de obtener un ADNc corto, específico. Los cebadores adecuados pueden prepararse por ejemplo por síntesis utilizando los modelos de las secuencias de ADNc de la transferasa. Dicho procedimiento permite preparar grandes cantidades de las moléculas de ADNc según la invención de forma muy rápida y sencilla y con una baja tasa de errores.

Además, se divulga un procedimiento para la clonación de una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa, caracterizado porque la molécula de ADN se clona en un vector, que se transfecta, a continuación, en una célula hospedadora o en un huésped, obteniéndose, por medio de selección y amplificación de células hospedadoras transfectadas, líneas de células que expresan la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa activa. La molécula de ADN se incorpora en el vector por ejemplo con ayuda de endonucleasas de restricción. Lo expuesto anteriormente es aplicable otra vez al vector. Lo importante de dicho procedimiento es que se seleccione un sistema de huésped/vector eficaz. Para obtener una enzima activa, son aptas en particular las células hospedadoras eucariotes. Una opción radica en transfectar el vector en células de insectos. En este caso, habría que utilizar en particular un virus de insecto como vector, por ejemplo baculovirus.

Naturalmente también es posible transfectar células humanas o las de otros vertebrados, que entonces expresarían una enzima ajena a dichas células.

Se divulga un procedimiento para la preparación de células hospedadoras recombinantes, en particular células de

plantas o células de insectos, u opcionalmente, plantas o insectos con una producción de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa inhibida o completamente impedida, que está caracterizado porque por lo menos uno de los vectores según la invención, es decir, el que comprende la molécula de ADN según la invención, la molécula de ADN mutada o la molécula que codifica para ribozimas o el que comprende la molécula de ADN en orientación inversa al promotor se infiltra en la célula hospedadora o la planta. Lo expuesto anteriormente referente a la transcripción es aplicable aquí también.

Las células hospedadoras utilizadas pueden ser por ejemplo células de plantas, siendo apto, por ejemplo, el plásmido Ti con el sistema *Agrobacterium*. El sistema *Agrobacterium* permite transfectar una planta directamente: las agrobacterias producen cecidomía de las raíces en las plantas. Cuando las agrobacterias infectan una planta herida, las bacterias mismas no llegan a la planta, sino que infiltran la sección del ADN recombinante, el denominado ADN T, del plásmido Ti anular, extracromosómico, inducido con el tumor en las células de plantas. El ADN T y con ello también la molécula ADN incorporada en el mismo se incorporan de forma estable en el ADN cromosómico de la célula, con lo cual los genes del ADN T vienen a ser expresados en la planta.

Existe un gran número de mecanismos de transfección eficaces conocidos para diferentes sistemas de huéspedes. Entre los ejemplos de dichos sistemas se incluyen la electroporación, el método de fosfato cálcico, la microinyección y el método de liposomas.

A continuación, las células transfectadas se someten a una selección, por ejemplo a base de sus resistencias a los antibióticos, para los cuales el vector posee genes, o de otros genes marcadores. A continuación, se amplifican las líneas de células transfectadas, o bien en cantidades menores, por ejemplo en placas de Petri, o bien en mayores cantidades, por ejemplo en fermentadores. Además, las plantas presentan una característica particular, puesto que son capaces de volver a desarrollarse a partir de una célula (transfectada) o de un protoplasto en una planta completa, que puede cultivarse.

Según el vector utilizado, se producen procesos en el huésped, los cuales inhiben o impiden completamente la expresión de la enzima.

Si el vector que comprende la molécula de ADN se transfecta por la mutación por delección, inserción o sustitución, se producirá una recombinación homóloga: La molécula de ADN mutada reconoce, a pesar de la mutación, la secuencia idéntica en el genoma de la célula hospedadora y se incorporará exactamente en este lugar, con lo cual se produce un gen "knockout". De esta manera, se introduce en el gen para la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa una mutación, que puede inhibir la expresión correcta de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. Tal como ya se ha expuesto anteriormente, lo importante en esta técnica es que la mutación sea suficiente para impedir la expresión de la proteína activa. Tras la selección y amplificación, una comprobación adicional puede consistir en secuenciar el gen, con el fin de establecer el éxito de la recombinación homóloga o el grado de la mutación.

Si el vector que comprende la molécula de ADN que codifica para una ribozima se transfecta, se expresará la ribozima activa en la célula hospedadora. La ribozima forma un complejo con la secuencia complementaria del ARNm de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa por lo menos en un sitio, corta este sitio, inhibiendo de esta manera la traducción de la enzima. En esta célula hospedadora así como en las líneas de células que proceden de la misma o de la planta, no se expresará la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa.

En el caso del vector que comprende la molécula de ADN divulgada en la dirección "sentido" o inversa al promotor, se expresa en la célula (o planta) transfectada un ARNm "sentido" o "antisentido". El ARNm "antisentido" o "sentido" es complementario con por lo menos una parte de la secuencia del ARNm de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y puede inhibir igualmente la traducción de la enzima. Como un ejemplo de un procedimiento para inhibir la expresión de un gen mediante la técnica "antisentido", ver la publicación de Smith *et al.* 1990, Mol. Gen. Genet. 224:477-481, en la que está inhibida la expresión de un gen involucrado en el proceso de maduración del tomate.

En todos los sistemas, por lo menos se inhibe, preferentemente incluso se impide completamente la expresión de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. El grado de perturbación de la expresión de gen depende del grado de formación de complejo, recombinación homóloga, de eventuales mutaciones al azar, subsiguientes y de otros procesos en la región del genoma. Las células transfectadas se investigan con respecto a la actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y se seleccionan.

También cabe la posibilidad de reforzar aún más la inhibición de la expresión de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa descrita anteriormente, infiltrando en el huésped, además de la infiltración de un vector tal como se ha descrito anteriormente, un vector que comprende un gen que codifica para una proteína de un mamífero, por ejemplo β -1,4-galactosiltransferasa. La fucosilación puede quedar disminuida por la acción de otras enzimas de mamíferos, siendo particularmente eficaz la combinación de la inhibición de la expresión de una α -1,3-fucosiltransferasa activa con ayuda de un vector según la invención y con ayuda de un vector de una enzima de mamífero.

Para la transfección puede utilizarse cualquier tipo de planta, por ejemplo la judía Mungo, la planta de tabaco, de

tomate y/o de patata.

Otro procedimiento ventajoso para la preparación de células hospedadoras recombinantes, en particular células de plantas o plantas, consiste en infiltrar la molécula de ADN que comprende la mutación en el genoma de la célula hospedadora o de la planta en lugar de la secuencia homóloga, no mutada (Schaefer *et al.* 1997, Plant J.; 11(6):1195-1206). Por tanto, dicho procedimiento no funciona con un vector, sino con una molécula pura de ADN. La molécula se infiltra en el huésped por ejemplo por bombardeo genético, microinyección o electroporación, para mencionar sólo tres ejemplos. Tal como ya se ha expuesto anteriormente, la molécula de ADN se coloca al lado de la secuencia homóloga en el genoma del huésped, con lo cual se produce una recombinación homóloga, provocando de esta manera una mutación por delección, inserción o sustitución en el genoma: La expresión de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa puede inhibirse o impedirse completamente.

Se describen las plantas o células de plantas, cuya actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa es preferentemente por debajo de un 50%, en particular por debajo de un 20%, de forma particularmente preferida de un 0%, de la actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa que tiene lugar en plantas o células de plantas naturales. La ventaja de dichas plantas o células de plantas radica en que las glicoproteínas producidas por las mismas no presenta fucosa con un enlace α -1,3 o muy poco de la misma. Cuando los productos de dichas plantas son ingeridos por el cuerpo humano o el de un vertebrado, no se produce una reacción inmune contra el epítipo α -1,3-fucosa.

Se describen plantas o células de plantas recombinantes, que son preparadas según uno de los procedimientos descritos anteriormente y cuya producción de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida.

Se divulgan también insectos o células de insectos recombinantes preparados según uno de los procedimientos descritos anteriormente y cuya producción de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida. Aquí tampoco se producen glicoproteínas con radicales de fucosa con enlace α -1,3, con lo cual tampoco se produce una reacción inmune contra el epítipo α -1,3-fucosa.

Se menciona también una molécula de ANP que comprende una secuencia de bases que es complementaria con la secuencia de la molécula de ADN según la invención. El ANP (ácido nucleico peptídico) es una secuencia similar a la de ADN, en la que las nucleobases están unidas a una espina dorsal de pseudopéptido. El ANP hibridiza por lo general con los oligómeros de ADN, ARN o ANP complementarios por apareamiento de bases según Watson-Crick y formación de hélix. La espina dorsal de péptido asegura una mayor resistencia a la degradación enzimática. Por lo tanto, la molécula de ANP constituye un mejor reactivo "antisentido". Ni las nucleasas ni las proteasas son capaces de atacar una molécula de ANP. La estabilidad de la molécula de ANP, en caso de ser unida a una secuencia complementaria, presenta un bloqueo estérico suficiente de las polimerasas de ADN y ARN, de la transcriptasa reversa, telomerasa y de las ribosomas.

Si la molécula de ANP presenta la secuencia citada anteriormente, se unirá al ADN o a un sitio del ADN que codifica para la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y puede inhibir de esta manera la transcripción de dicha enzima. Puesto que la molécula de ANP ni se transcribe ni se traduce, se prepara sintéticamente, por ejemplo con ayuda de la técnica t-boc.

Se divulga una molécula de ANP, que comprende una secuencia de bases que corresponde a la secuencia de la molécula de ADN según la invención. Dicha molécula de ANP forma un complejo con el ARNm o un sitio del ARNm de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa, inhibiendo la traducción de la enzima. Lo que se ha dicho con respecto al ARN "antisentido" es aplicable aquí de forma análoga. Así, por ejemplo, una región de formación de complejo particularmente eficaz es la región del inicio de la traducción o también las regiones 5' no traducidas del ARNm.

Se divulga un procedimiento para la preparación de plantas, insectos o células, en particular células de plantas o de insectos, que presentan una expresión bloqueada de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa al nivel de la transcripción o traducción, que está caracterizado porque en las células se infiltran moléculas de ANP según la invención. Para la infiltración de la molécula de ANP o de las moléculas de ANP en la célula, se utilizan otra vez los métodos convencionales, tales como por ejemplo la electroporación o microinyección. La infiltración resulta particularmente eficaz si los oligómeros de ANP están unidos a péptidos penetradores de células, por ejemplo transportan o pAntp (Pooga *et al.* 1998, Nature Biotechnology, 16: 857-861).

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de glicoproteínas recombinantes, que está caracterizado porque las plantas o células de plantas recombinantes según la invención, cuya producción de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida, o plantas o insectos o células, en las que se han infiltrado las moléculas de ANP por medio del procedimiento según la invención, se han transfectado con el gen que codifica para la glicoproteína recombinante, con lo cual vienen a ser expresadas las glicoproteínas recombinantes. En dicho procedimiento, se transfectan los vectores ya descritos anteriormente que comprenden genes para las proteínas deseadas en el huésped o en las células hospedadoras, tal como ya se ha descrito también anteriormente. Las células de plantas o de insectos transfectados expresan las proteínas deseadas, no

presentando fucosa con enlace α -1,3 o muy poco de la misma. Por tanto, no dispararán las reacciones inmunes ya mencionadas anteriormente en el cuerpo humano o el de un vertebrado. Esto permite producir cualquier proteína en dichos sistemas.

Preferentemente, se proporciona un procedimiento para la preparación de glicoproteínas recombinantes humanas, que está caracterizado porque las plantas o células de plantas recombinantes, cuya producción de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida, o plantas o células, en las que se han infiltrado las moléculas de ANP por medio del procedimiento según la invención, se han transfectado con el gen que codifica para la glicoproteína, con lo cual vienen a ser expresadas las glicoproteínas recombinantes. Dicho procedimiento permite producir proteínas humanas en (células de) plantas, que, al ser absorbidas por el cuerpo humano, no disparan una reacción inmune dirigida contra los radicales de fucosa con enlace α -1,3. Al mismo tiempo, cabe la posibilidad de utilizar, para la producción de las glicoproteínas recombinantes, tipos de plantas que sirven de alimentos, por ejemplo plátano, patata y/o tomate. Los tejidos de dicha planta comprenden la glicoproteína recombinante, con lo cual la glicoproteína recombinante es absorbida por el cuerpo humano por ejemplo por extracción de la glicoproteína recombinante del tejido, seguido por administración o directamente por el consumo del tejido vegetal.

Se prefiere un procedimiento para la preparación de glicoproteínas recombinantes humanas para su utilización en medicina, que está caracterizado porque las plantas o células de plantas recombinantes según la invención, cuya producción de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa queda inhibida o completamente impedida, o plantas o células, en las que se han infiltrado las moléculas de ANP por medio del procedimiento según la invención, se han transfectado con el gen que codifica para la glicoproteína, con lo cual vienen a ser expresadas las glicoproteínas recombinantes. Con tal fin, puede utilizarse cualquier proteína que es de interés en medicina.

La presente invención también se refiere a glicoproteínas recombinantes, que se han preparado según un procedimiento descrito anteriormente en sistemas de plantas o de insectos y cuya secuencia de péptidos presenta menos de un 50%, en particular menos de un 20%, de forma particularmente preferida un 0%, de los radicales de fucosa con enlace α -1,3 que tienen lugar en las proteínas expresadas en los sistemas de plantas o de insectos no reducidos por la fucosiltransferasa. Naturalmente, hay que dar preferencia a las glicoproteínas que no presentan radicales de fucosa con enlace α -1,3. La cantidad de fucosa con enlace α -1,3 depende del grado de la inhibición de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa descrita anteriormente.

Preferentemente, la presente invención se refiere a glicoproteínas recombinantes humanas, que se han preparado según un procedimiento descrito anteriormente en sistemas de plantas o de insectos y cuya secuencia de péptidos presenta menos de un 50%, en particular menos de un 20%, de forma particularmente preferida un 0%, de los radicales de fucosa con enlace α -1,3 que tienen lugar en las proteínas expresadas en los sistemas de plantas o de insectos no reducidos por la fucosiltransferasa.

Se describen glicoproteínas recombinantes humanas para su utilización en medicina, que se han preparado según un procedimiento descrito anteriormente en sistemas de plantas o de insectos y cuya secuencia de péptidos presenta menos de un 50%, en particular menos de un 20%, de forma particularmente preferida un 0%, de los radicales de fucosa con enlace α -1,3 que tienen lugar en las proteínas expresadas en los sistemas de plantas o de insectos no reducidos por la fucosiltransferasa.

Dichas glicoproteínas pueden contener otras unidades de oligosacáridos unidas que son específicas de plantas o de insectos, por lo cual serán diferentes – en el caso de las glicoproteínas humanas – de las glicoproteínas naturales. No obstante, las glicoproteínas iniciarán una menor reacción inmune o ninguna en absoluto en el cuerpo humano, puesto que, tal como ya se ha representado en la introducción de la descripción, los radicales de fucosa con enlace α -1,3 son la causa principal de las reacciones inmunes o reacciones inmunes cruzadas contra las glicoproteínas de plantas y de insectos.

Se divulga una composición farmacéutica que comprende las glicoproteínas. Además de las glicoproteínas, la composición farmacéutica comprende también otros aditivos convencionales para este tipo de composiciones. Se trata por ejemplo de diluyentes con contenidos diferentes de tampones (por ejemplo Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos, tales como tensioactivos y disolventes (por ejemplo Tween 80, Polysorbate 80), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol benzílico), adyuvantes, antioxidantes (por ejemplo ácido ascórbico, metabisulfito sódico), emulsificadores, cargas (por ejemplo lactosa, manitol), enlaces covalentes del polímero, tal como por ejemplo polietilenglicol, con la proteína, incorporación del material en preparaciones en forma de partículas de compuestos poliméricos, tal como por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas, sustancias auxiliares y/o vehículos útiles para el tratamiento correspondiente. Las composiciones de este tipo afectarán al estado físico, la estabilidad, la velocidad de la liberación *in vivo* y la velocidad de la excreción *in vivo* de las glicoproteínas según la invención.

Se describe también un procedimiento para la selección de moléculas de ADN que codifican para una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa en una muestra, a la que se adicionan las moléculas de ADN divulgadas marcadas, las cuales se unen a las moléculas de ADN que codifican para una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. Las moléculas de ADN

hibridizadas pueden detectarse, cuantificarse y seleccionarse. Con el fin de asegurar que la muestra contiene ADN monohebra que permite hibridizar las moléculas de ADN marcadas, se procede a desnaturalizar la muestra, por ejemplo calentándola.

- 5 Una opción consiste en separar el ADN que se va a investigar, si se desea, tras la adición de endonucleasas, por electroporesis sobre gel en un gel de agarosa. Tras trasladarlo a una membrana de nitrocelulosa, se adicionan las moléculas de ADN marcadas, que hibridizan con la molécula de ADN homóloga ("Southern Blotting").

- 10 Otra opción es encontrar genes homólogos procedentes de otras especies por medio de métodos dependientes de PCR, utilizando cebadores específicos y/o degenerados, derivados de la secuencia de la molécula de ADN divulgada.

- 15 Preferentemente, la muestra comprende, para el procedimiento según la invención citado anteriormente, ADN genómica de un organismo vegetal. Dicho procedimiento permite investigar un gran número de plantas por presencia del gen de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa de manera muy rápida y eficaz. Esto permite seleccionar las plantas que no contienen dicho gen o inhibir o impedir completamente la expresión de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa en las plantas o insectos que contienen dicho gen por medio del procedimiento según la invención descrito anteriormente, de modo que pueden utilizarse a continuación para la transfección y producción de glicoproteínas (humanas).

- 20 Asimismo, se mencionan las moléculas de ADN que codifican para una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa que han sido seleccionadas y luego aisladas de la muestra según los dos procedimientos citados por último. Dichas moléculas pueden utilizarse para otras investigaciones. Pueden secuenciarse y utilizarse también por su lado como sondas de ADN para encontrar GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasas. Dichas moléculas de ADN marcadas funcionarán de forma más eficaz que las moléculas de ADN según la invención como sondas para los organismos que presentan una relación más estrecha con los organismos a partir de los cuales fueron aisladas.

- 25 Se divulga una preparación de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa clonada que presenta isoformas con valores pI comprendidos entre 6,0 y 9,0, en particular entre 6,8 y 8,2. El valor pI de una proteína es el valor pH en el que su carga neta es de zero y es una función de la secuencia de aminoácidos, del modelo de glicosilación y también de la estructura espacial de la proteína. La GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa comprende por lo menos 7 isoformas que presentan un valor pI en dicho intervalo. La razón de las diferentes isoformas de la transferasa son por ejemplo diferentes glicosilaciones y proteólisis limitada. Se ha demostrado por medio de experimentos que las plantas de semillero de las judías Mungo procedentes de plantas diferentes presentan relaciones diferentes de las isozimas. El valor pI de una proteína puede establecerse por enfoque isoeléctrico conocido por los expertos en la materia.

La isoforma principal de la enzima presenta un peso molecular aparente de 54 kDa.

- 40 En particular, la preparación comprende isoformas con valores pI de 6,8, 7,1 y 7,6.

- Se describe también un procedimiento para la preparación de unidades de carbohidrato "vegetalizadas" procedentes de glicoproteínas humanas y de otros vertebrados, en el que a una muestra que comprende una unidad de carbohidrato o una glicoproteína se adicionan unidades de fucosa así como una GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa codificada por una molécula de ADN descrita anteriormente, con lo cual la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa une la fucosa a la unidad de carbohidrato o a la glicoproteína en la posición α -1,3. El procedimiento según la invención para la clonación de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa preparar grandes cantidades de la enzima purificada. Para obtener una transferasa completamente activa, se establecen condiciones de reacción adecuadas. Se ha hallado que la transferasa presenta una actividad particularmente alta a un valor pH de aproximadamente 7, si el tampón utilizado es el ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico-HCl. En presencia de cationes bivalentes, en particular Mn^{2+} , se refuerza la actividad de la transferasa recombinante. La unidad de carbohidrato se adiciona a la muestra o bien en una forma no ligada o ligada a una proteína. La transferasa recombinante es efectiva para ambas formas.

- 45 A continuación, la invención se ilustrará con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos y figuras de los dibujos adjuntos, que no limitan la invención. Específicamente, se muestran: en las Figs. 1a y 1b del dibujo, las cantidades de proteína medidas y la actividad de enzima medida en las fracciones individuales del eluado como curvas; en la Fig. 2, una representación de un gel de electroforesis de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa; en la Fig. 3, el resultado del enfoque isoeléctrico y la actividad de transferasa medida de las isoformas individuales; en la Fig. 4, las secuencias N-terminales de 4 péptidos trípticos 1 – 4 así como la secuencia de ADN de tres cebadores S1, A2 y A3; en las Figs. 5a y 5b, la secuencia de ADN de la α -1,3-fucosiltransferasa; en las Figs. 6a y 6b, la secuencia de aminoácidos de la α -1,3-fucosiltransferasa derivada de la anterior; en la Fig. 7, una representación esquemática de la α -1,3-fucosiltransferasa así como la hidrofobicidad de los radicales de aminoácidos; en la Fig. 8, una comparación de los motivos conservados de las diferentes fucosiltransferasas; en la Fig. 9, una comparación de la actividad de la fucosiltransferasa de células de insectos transfectadas con el gen de la α -1,3-fucosiltransferasa con un control negativo; en las Figs. 10a y 10 b, las estructuras de diferentes aceptores de la α -1,3-fucosiltransferasa; en las Figs. 11 y 12, los espectros de masas; y, en la Fig. 13, el resultado de una HPLC.

Ejemplo 1:**Aislamiento de la α -1,3-fucosiltransferasa del núcleo**

Todas las etapas se llevaron a cabo a 4°C. Plantas de semillero de judías Mungo se homogenizaron en una mezcladora, utilizando un volumen de 0,75 del tampón de extracción por kg de judías. A continuación, el material homogenizado se filtró pasándolo por dos capas de tejido de algodón, y el filtrado se centrifugó a 30.000 g durante 40 min. Se descartó el sobrenadante, y se extrajo el pellet con un tampón de disolución durante la noche con agitación constante. La centrifugación subsiguiente a 30.000 g durante 40 min. produjo el extracto de Triton.

El extracto de Triton se purificó de la manera siguiente:

Etapas 1: El extracto de Triton se colocó en un intercambiador de aniones microgranular de dietilaminoetilcelulosa con una columna de celulosa DE52 (5x28 cm, de la empresa Whatman), que anteriormente se había calibrado con el tampón A. La fracción no ligada se sometió a un tratamiento posterior en la etapa 2.

Etapas 2: La muestra se colocó en una columna (2,5x32) Affi-Gel Blue calibrada con el tampón A. Tras lavar la columna con este tampón, se eluyó la proteína adsorta con el tampón A que contiene NaCl 0,5 M.

Etapas 3: Tras la diálisis del eluado de la etapa 2 utilizando el tampón B, el mismo se colocó en una columna S-Sefarosa calibrada con el mismo tampón. La proteína ligada se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,5 M en el tampón B. Las fracciones que contienen la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa se combinaron y se sometieron a una diálisis con el tampón C.

Etapas 4: La muestra dializada se colocó en una columna GnGn-Sefarosa calibrada con el tampón C. La proteína ligada se eluyó utilizando el tampón C que contiene NaCl 1 M en lugar de MnCl₂.

Etapas 5: A continuación, la enzima se sometió a una diálisis con el tampón D y se colocó en una columna de GDP/hexanolamina/Sefarosa. Tras lavar la columna con el tampón D, se eluyó la transferasa reemplazando MgCl₂ y NaCl con GDP 0,5 mM. Las fracciones activas se unieron, se dializaron con el tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,3, y se liofilizaron.

La actividad enzimática de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa se determinó utilizando el péptido GnGn y GDP-L-[U-³⁴C]-fucosa en una cantidad de sustrato de 0,5 y 0,25, respectivamente, en presencia del tampón ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico-HCl, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc y AMP (según Staudacher *et al.* 1998 Glycoconjugate J. 15, 355-360; Staudacher *et al.* 1991 Eur. J. Biochem. 199, 745-751).

Las concentraciones de proteína se determinaron con ayuda del método Ácido bicínico (Pierce) o, durante las últimas etapas de la purificación enzimática, por medio del análisis de aminoácidos (Altmann 1992, Anal. Biochem. 204, 215-219).

En las Figs. 1a y 1b, se han representado las cantidades de proteína medidas y la actividad enzimática medida en las fracciones individuales del eluado como curvas. La Fig. 1a muestra la separación descrita anteriormente en la columna de S-Sefarosa, y la Fig. 1b la separación en la columna de GnGn-Sefarosa, en la que el círculo es la proteína, el círculo lleno negro la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y el cuadrángulo N-acetil- β -glucosaminidasa. Un U es definido como la cantidad de enzima que transfiere 1 μ mol de fucosa por minuto a un aceptor.

La Tabla 1 muestra las etapas individuales de la purificación de la transferasa.

Tabla 1

Etapas de purificación	Tot. Prot.	Tot. Act.	Activ. Esp.	Factor de purificación	Rendimiento
	mg	mU	mU/mg	Veces	%
Extracto de Triton X-100	91.500	4.846	0,05	1	100
DE52	43.700	4.750	0,10	2	98,0
Affigel Blue	180,5	4.134	23	460	85,3
S-Sefarosa	8,4	3.251	390	7.800	67,1
GnGn-Sefarosa	0,13 ¹	1.044	8.030	160.000	21,5
GDP/hexanolamina/Sefarosa	0,02 ¹	867	43.350	867.000	17,9

¹ se determinó por medio del análisis de aminoácidos

Tampón de extracción:

Ditiotreitol 0,5 mM
EDTA 1 mM
Polivinilpolipirrolidona al 0,5%
Sacarosa 0,25 M
Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,3

Tampón de disolución:

Ditiotreitol 0,5 mM
EDTA 1 mM
Triton X-100 al 1,5%
Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,3

Tampón A:

Tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,3 que contiene:
Triton X-100 al 0,1% y
NaN₃ al 0,02%

Tampón B:

Tampón citrato sódico 25 mM, pH 5,3 que contiene:
Triton X-100 al 0,1% y
NaN₃ al 0,02%

Tampón C:

Tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,3
MnCl₂ 5 mM y
NaN₃ al 0,02%

Tampón D:

Tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,3 que contiene:
MgCl₂ 10 mM
NaCl 0,1 M y
NaN₃ al 0,02%

Ejemplo 2:

SDS-Page y enfoque isoelectrico

Un SDS-Page se realizó en una Biorad Mini-Protean Cell sobre geles que contenían un 12,5% de acrilamida y 1% de bisacrilamida. Los geles se tiñieron o bien con Coomassie Brilliant Blue R-250 o bien con plata. El enfoque isoelectrico de la fucosiltransferasa se llevó a cabo sobre geles con un intervalo pI comprendido entre 6 y 9 (Servalyt precotes 6-9, Serva). Los geles se tiñieron con plata según el protocolo del fabricante. Para la electroforesis bidimensional, se cortaron bandas del gel de enfoque, que fueron tratadas con reactivos de S-alquilación y SDS y se sometieron a un SDS-Page tal como se ha descrito anteriormente.

La Fig. 2 muestra un gel de electroforesis de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa, en la que se ha representado la electroforesis bidimensional a mano izquierda y el SDS-Page unidimensional a mano derecha. El trayecto denominado A es un estándar, el trayecto denominado B es la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa de la columna de GnGn/Sefarosa y el trayecto denominado C es la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa "purificada", es decir, la fracción de la columna de GDP/hexanolamina/Sefarosa. Las dos bandas a 54 y 56 kDa representan isoformas de la transferasa.

La Fig. 3 muestra el resultado del enfoque isoelectrico. El trayecto A se tiñió con plata, y la actividad de las isoformas de la transferasa se comprobó en el trayecto B. La actividad se ha indicado como % de fucosa transferido por la GDP-fucosa al sustrato.

Ejemplo 3:

Secuenciación de péptidos

Para la secuenciación de la proteína, se cortaron bandas del gel de SDS/poliacrilamida teñido con Coomassie, se

sometieron las mismas a una carboxamidometilación y se disociaron con tripsina según Görg *et al.* 1988, Electrophoresis, 9, 681-692. Los péptidos tripticos se separaron por medio de HPLC con fase reversa en una columna Vydac C18 de 1,0x250 mm a 40°C a un caudal de 0,05 ml/min, utilizando un aparato HP 1100 (Hewlett-Packard). Los péptidos aislados se secuenciaron con un sistema de secuenciación de proteínas G10005A de Hewlett-Packard según el protocolo del fabricante. Además, se analizó la mezcla de péptidos por medio de digestión Ingel con MALDI-TOF MS (ver abajo).

La Fig. 4 muestra las secuencias N-terminales de 4 péptidos tripticos 1 – 4 (SEC ID No: 5-8). A partir de los tres primeros péptidos, se prepararon los cebadores S1, A2 y A3 (no. de identificación de la secuencia 9-11).

Ejemplo 4:

RT-PCR y clonación de ADNc

Todo el ARN se aisló a partir de un hipocotil de judías mungo de 3 días, utilizándose el sistema de aislamiento de SV Total ARN de Promega. Para la preparación del ADNc de la primera hebra, se incubó todo el ARN a 48°C durante 1 h con AMV transcriptasa reversa y cebadores de oligo(dT), utilizándose el sistema de transcriptasa reversa de Promega.

El ADNc de la primera hebra se sometió a una PCR, utilizando una combinación de cebadores “sentido” y “antisentido”:

A 10 µl de la reacción de transcripción reversa, se adicionó la cantidad siguiente:

50 µl que contenía 0,1 µmol de cada cebador, dNTPs 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM y Triton X-100 al 0,1%.

Tras una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 2 min., se realizaron 40 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min. a 49°C y 2 min. a 72°C. La última etapa de extensión se realizó a 72°C durante 8 min. Los productos PCR se subclonaron en el vector pCR2.1, utilizando el TA Cloning Kit de Invitrogen, y se secuenciaron. Los productos de dicha PCR eran dos fragmentos de ADN con una longitud de 744 bp y 780 bp, presentando ambos fragmentos el mismo extremo 5' (ver también la Fig. 7).

A partir de dichos dos fragmentos de ADN, se obtuvieron las regiones 5' y 3' del ADNc que faltaban por Rapid Amplification 5' y 3' de los extremos ADNc (RACE), utilizando el RACE kit de Gibco-BRL. Se utilizó como cebador “antisentido” el cebador de amplificación universal del kit y como cebador “sentido” o bien 5'-CTGGAAGTGTCCCTGTGGTT-3' (SEC ID NO: 12) o bien 5'-AGTGCAGTAGAGGGCCAGAA-3' (SEC ID NO: 13). Se utilizó como cebador “sentido” también el cebador de anclaje acortado del kit y como cebador “antisentido” 5'-TTGAGCACCACAATTGGAAAT-3' (SEC ID NO: 14) o 5'-GAATGCAAAGACGGCACGATGAAT-3' (SEC ID NO: 15).

La PCR se realizó a una “Annealing Temperature” de 55°C en las condiciones descritas anteriormente. Los productos RACE 5' y 3' se subclonaron en el vector pCR2.1 y se secuenciaron: Las secuencias de los fragmentos subclonados se secuenciaron por medio del método de dideoxinucleótido (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit y ABI PRISM 310 Genetic analyser (Perkin Elmer)). Para la secuenciación de los productos clonados en el vector pCR2.1, se utilizaron los cebadores directos T7 y M13. Ambas hebras de la región codificadora se secuenciaron por el Vienna VBC Genomics Sequencing Service, utilizándose cebadores marcados con infrarrojo (IRD700 e IRD800) y un secuenciador LI-COR Long Read IR 4200 (Lincoln, NE).

Las Figs. 5a y 5b muestran el ADNc entero, que presenta un tamaño de 2.198 bp y un marco de lectura abierto de 1.530 bp (SEC ID NO: 1). El marco de lectura abierto (codón de iniciación en los pares de bases 211-213, codón de terminación en los pares de bases 1740-1743) codifica para una proteína de 510 aminoácidos con un peso molecular de 56,8 kDa y un valor pI teórico de 7,51.

Las Figs. 6a y 6b muestran la secuencia de aminoácidos de la GlcNAc-α-1,3-fucosiltransferasa derivada del ADNc (SEC ID NO: 2). Los sitios para la glicosilación ligada a asparagina se encuentran en Asn346 y Asn429.

En la Fig. 7, se ha representado el ADNc de la GlcNAc-α-1,3-fucosiltransferasa esquemática (arriba) y el índice de hidrofobicidad derivado de la proteína codificada (abajo), en la que un índice de hidrofobicidad positivo significa una mayor hidrofobicidad. Entre ambos, se han representado los tamaños de los dos productos PCR citados anteriormente con relación al ADNc entero. El área de codificación se ha representado por medio de una barra, codificando “C” para la región citoplasmática postulada, T para la región transmembrana postulada y G para la región de la transferasa catalítica postulada para el lumen de Golgi. El análisis de la secuencia de ADN por “TMPred” (de EMBnet, Suiza) dio una región transmembrana probable entre Asn36 y Gly54. La región C terminal de la enzima incluye probablemente la región catalítica y por lo tanto debería de estar dirigida hacia el lumen del aparato de Golgi. Por ello, esta transferasa parece ser una proteína transmembrana del tipo II, tal como lo son todas las

glicosiltransferasas que desempeñan un papel en la biosíntesis de glicoproteínas (Joziasse, 1992 *Glycobiology* 2, 271-277). Las regiones grises representan los cuatro péptidos trípticos y los hexágonos representan los sitios potenciales de la N-glicosilación. Una búsqueda BLASTP de todos los bancos de datos accessible a través de NCBI demostró una similitud entre la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa y otras GlcNAc- α -1,3/4-fucosiltransferasas, por ejemplo la fucosiltransferasa VI humana. A 18-21% (investigado por SIM-LALNVIEW, Expase, Suiza), la similitud total estaba fuera de cualquier significado. No obstante, una parte de la secuencia de 35 aminoácidos (SEC ID NO: 4) presentaba una homología sorprendentemente alta con otras α -1,3-fucosiltransferasas (Fig. 8). Dicha parte de la secuencia se encuentra entre Glu267 y Pro301 de la SEC ID NO: 2.

Ejemplo 5:

Expresión de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa recombinante en células de insectos

La región codificadora de la supuesta GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa junto con las regiones citoplasmática y transmembranal se amplificó con el cebador directo 5'-CGGCGGATCCGCAATTGAATGATG-3' (SEC ID NO: 16) y el cebador inverso 5'-CCGGCTGCAGTACCATTTAGCGCAT-3' (SEC ID NO: 17) con el Expand High Fidelity PCR System de Boehringer Mannheim. El producto PCR se sometió a una doble digestión con PstI y BamHI y se subclonó en el vector de transferencia baculovirus pVL1393 tratado con fosfatasa alcalina, que antes había sido sometido a una digestión con PstI y BamHI. Con el fin de asegurar una recombinación homóloga, se cotransfectó el vector de transferencia con ADN viral del tipo BaculoGold (PharMingen, San Diego, CA) en células de insectos Sf9 en un medio IPL-41 que contenía lipofectin. Tras una incubación de 5 días a 27°C, se utilizaron volúmenes diferentes del sobrenadante que contenía el virus recombinante para la infección de las células de insectos Sf21. Tras una incubación de 4 días a 27°C en el medio IPL-41 que contenía FCS al 5%, se cosecharon las células Sf1 [sic] y se lavaron dos veces con una solución salina tratada con un tampón de fosfato. Las células se volvieron a suspender en el tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, que contenía Triton X-100 al 2% y se rompieron por sonicación sobre hielo.

Ejemplo 6:

Ensayo para la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa

El homogenizado y el sobrenadante de las células se ensayaron por presencia de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. Muestras de control se prepararon con baculovirus recombinante que codifica para la GlcNAc-fucosiltransferasa I de tabaco (Strasser *et al.* 1999, *Glycobiology*, en prensa).

La Fig. 9 muestra la actividad enzimática de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa recombinante así como del control negativo. En el mejor caso, la actividad enzimática de las células cotransfectadas y de su sobrenadante era 30 veces más alta que la de los controles negativos. Dicha actividad endógena, que puede medirse en ausencia de la transferasa recombinante, se debe sustancialmente a la α -1,6-fucosiltransferasa de insectos y sólo en un bajo tanto por ciento a la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa. Por ello, el aumento de la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa procedente de los baculovirus es mucho más que 100 veces.

La enzima presentaba una ancha actividad máxima alrededor de un valor pH de 7,0, si la actividad se midió en el tampón ácido 2-(morfolin)etanosulfónico-HCl. Tal como puede apreciarse por la Tabla 2, la adición de cationes bivalentes, en particular de Mn^{2+} , aumenta la actividad de la transferasa recombinante.

Tabla 2

Aditivo (conc. 10 mM)	Actividad relativa (aceptor: péptido GnGn)
	%
Ninguno	21
EDTA	18
MnCl ₂	100
CaCl ₂	82
MgCl ₂	52
CdCl ₂	44
CoCl ₂	35
CuCl ₂	3
NiCl ₂	24
ZnCl ₂	0,6

La Tabla 3 muestra que entre los aceptores utilizados es el péptido GnGn que presenta las mayores tasas de incorporación en condiciones de ensayo estándares, seguido de muy cerca del péptido GnGnF⁶ y M5Gn-Asn. Ninguna transferencia al péptido MM, que no presenta el término reductor de GlcNAc en la manosa con enlace en la posición 3, ha podido observarse. Dicha estructura parece ser necesaria para la fucosiltransferasa del núcleo. La transferasa recombinante estaba inactiva también con relación a los aceptores convencionales, responsables de la

determinación de las α -1,3/4-fucosiltransferasas de los grupos sanguíneos, que transfieren la fucosa a GlcNAc en los términos no reductores de oligosacáridos. Los valores K_m aparentes para los sustratos aceptores péptido de GnGn, péptido de GnGnF⁶, M5Gn-Asn y para el sustrato donante GDP-fucosa se estimaron en 0,19, 0,13, 0,23 y 0,11. Las estructuras de las moléculas se han representado en las Figs. 10a y 10b.

Tabla 3

Sustrato aceptor	Actividad relativa		Valor K_m
	%	mM	
Péptido GnGn	100	0,19	
Péptido GnGnF ⁶	87	0,13	
M5Gn-Asn	71	0,23	
Péptido MM	0		
Gal β 1-4GlcNAc	0		
Gal β 1-3GlcNAc	0		
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0		

Ejemplo 7:**Espectrometría de masas del producto de fucosiltransferasa**

Un hexapéptido GnGn dabsilado (2 nmol) se incubó con el homogenizado de células de insectos que comprende la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa recombinante (0,08 mU) en presencia de GDP-L-fucosa no radiactiva (10 nmol), el tampón ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico-HCl, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc y AMP. Un control negativo se realizó con el homogenizado de las células de insectos infectadas para las muestras de control. Las muestras se incubaron a 37°C durante 16 h y se analizaron por medio de espectrometría de masas MALDI TOF.

La espectrometría de masas se llevó a cabo en un DYNAMO (Thermo BioAnalysis, Santa Fe, NM), que es un MALDI-TOF MS, capaz de extracción dinámica (sinónimo para una extracción retrasada). Se utilizaron dos tipos de preparaciones de una matriz de muestra: Los péptidos y los glicopéptidos dabsilados se disolvieron en ácido fórmico al 5% y se aplicaron alícuotas a la diana, se secaron al aire y se cubrieron con ácido α -ciano-4-hidroxibenzóico al 1%. Glicanos piridilaminados, oligosacáridos reductores y glicopéptidos no derivatizados se diluyeron con agua, se aplicaron a la diana y se secaron al aire. Tras la adición de ácido 2,5-dihidroxibenzoico al 2%, las muestras se secaron inmediatamente aplicando un vacío.

La Fig. 11 muestra el espectro de masas de dichas muestras, representando A el control negativo: El pico principal (S) muestra el sustrato dabsilo-Val-Gly-Glu-(GlcNAc₄Man₃)Asn-Arg-Thr, siendo el valor $[M+H]^+$ calculado 2262,3. Aparentemente, este sustrato aparece también como un producto de adición sódico y como un ion más pequeño, formado por fragmentación de la función azo del grupo dabsilo, en (S*). Una pequeña cantidad del producto (P, $[M+H]^+ = 2408,4$) se puede atribuir a la α -1,6-fucosiltransferasa endógena. El pico en $m/z = 2424,0$ muestra la degalactosilación incompleta del sustrato. El espectro de masas B muestra la muestra que contiene la α -1,3-fucosiltransferasa recombinante. El pico principal (P) representa el producto fucosilado, y (P*) su ion fragmentado.

Adicionalmente, se mezclaron alícuotas de ambas muestras, con el fin de obtener concentraciones similares de sustrato y producto (muestra A). Dicha mezcla se diluyó con acetato de amonio 0,1 M, pH 4,0, que comprende 10 μ U de N-glicosidasa A (muestra B) o con Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, que contiene 100 μ U (1 U hidroliza 1 μ mol de sustrato por min.) de N-glicosidasa F (muestra C). Tras 2 y 20 h, se retiraron alícuotas pequeñas de dichas mezclas y se analizaron por medio de MALDI-TOF MS.

En la Fig. 12, se han representado los tres espectros de masas de las muestras A, B y C. La muestra A sin digestión muestra dos picos principales: el sustrato en un m/z de 2261,4 y el producto fucosilado en un m/z de 2407,7. La curva central muestra el espectro de masas de la muestra B, tratada con N-glicosidasa A, que hidroliza ambas glicoproteínas. El pico de 963,22 representa el producto deglicosilado. La curva inferior muestra el espectro de masas de la muestra C. La N-glicosidasa F no es capaz de hidrolizar los sustratos α -1,3-fucosilados, con lo cual el espectro contiene el pico del producto en un m/z de 2406,7, mientras que el pico del sustrato hidrolizado aparece en un m/z de 963,08.

Ejemplo 8:**Análisis HPLC del producto de fucosiltransferasa piridilaminado**

Las dos muestras descritas anteriormente (producto fucosilado y control negativo) se digirieron con N-glicosidasa A. Los oligosacáridos obtenidos se piridilaminaron y se analizaron por HPLC en fase reversa (Wilson *et al.* 1998 Glycobiology 8, 651-661; Kubelka *et al.* 1994 Arch. Biochem. Biophys. 308, 148-157; Hase *et al.* 1984 J. Biochem. 95, 197-203).

En la Fig. 13, B del diagrama superior representa el control negativo, en el que puede verse también, además del sustrato restante (péptido GnGn), el producto α -1,6-fucosilado. A presenta un pico con un tiempo de retención sustancialmente reducido, lo cual es específico de los [sic=términos] reductores GlcNAc de la fucosa con enlace α -1,3.

En el diagrama inferior, se comparó el producto de transferasa aislado antes (curva A) y después de la digestión por N-acetil- β -glucosaminasa (curva B) con MMF³ de la fosfolipasa A2 (curva C) de la abeja melífera.

Listado de secuencias

<110> Altmann Dr., Friedrich

<120> Gen para la fucosiltransferasa

<130> R 53926 (divisionaria de R 46233)

<150> A 270/99

<151> 1999-02-18

<150> EP 05108012.5

<151> 2000-02-17

<160> 17

<170> PatentIn ver. 2.1.

<210> 1

<211> 2198

<212> ADN

<213> Vigna radiata

<400> 1

```

actaactcaa acgctgcatt ttcttttttc tttcagggaa ccatccaccc ataacaacaa 60
aaaaaacaac agcaagctgt gtttttttta tegtctttt tctttaaaca agcaccacca 120
tcatggaatc gtgctcataa cgccaaaatt ttccatttcc ctttgatttt tagtttattt 180
tgcggaattg gcagttgggg gcgcaattga atgatgggtc tgttgacgaa tcttcgaggc 240
tcgagaacag atggtgccca acaagacagc ttaccggtt ttggtccggg aggcaaccca 300
aagaggaaat ggagcaatct aatgcctctt gttgttggcc ttgtggtcat cgcggagatc 360
gcgtttcttg gtaggttga tatggccaaa aacgcgccca tggttgactc cctcgctgac 420
ttcttctacc gctctcgagc ggtcgttgaa ggtgacgatt tggggttggg tttggtggct 480
tctgatcgga attctgaatc gtatagttgt gaggaatggt tggagaggga ggatgctgtc 540
acgtattcga ggggcttttc caaagagcct atttttgtt ctggagctga tcaggagtgg 600
aagtcgtgtt cggttggatg taaatttggg tttagtgggg atagaaagcc agatgccgca 660
tttgggttac ctcaaccaag tggaacagct agcattctgc gatcaatgga atcagcagaa 720
tactatgctg agaacaatat tgccatggca agacggaggg gatataacat cgtaatgaca 780
accagtctat cttcggatgt tcctgttgga tatttttcat gggctgagta tgatatgatg 840
gcaccagtgc agccgaaaac tgaagctgct cttgcagctg ctttcatttc caattgtggt 900
gctcgaaatt tccggttgca agctcttgag gcccttgaaa aatcaaacat caaaattgat 960
tcttatggtg gttgtcacag gaaccgtgat ggaagagtga acaaagtgga agccctgaag 1020
cactacaaat ttagcttagc gtttgaaaat tcgaatgagg aagattatgt aactgaaaaa 1080
ttcttccaat cccttggtgc tggaaactgtc cctgtggttg ttggtgctcc aaatattcag 1140
gactttgctc cttctcctgg ttcaatttta catattaaag agatagagga tgttgagtct 1200
gttgcaaaga ccatgagata tctagcagaa aatcccgaag catataatca atcattgagg 1260

```

tggaagtatg aggggtccatc tgactccttc aaggcccttg tggatatggc agctgtgcat 1320
 tcacgtgcc gtctttgcat tcacttggcc acagtgagta gagagaagga agaaaataat 1380
 ccaagcctta agagacgtcc ttgcaagtgc actagagggc cagaaaccgt atatcatatc 1440
 tatgtcagag aaaggggaag gtttgagatg gaggccattt acctgaggtc tagcaattta 1500
 actctgaatg ctgtgaaggc tgctgttggt ttgaagttca catccctgaa tcttgtgcct 1560
 gtatggaaga ctgaaaggcc tgaagttata agagggggga gtgctttaaa actctacaaa 1620
 atatacccaa ttggcttgac acagagacaa gctctttata ccttcagctt caaaggtgat 1680
 gctgatttca ggagtcactt ggagaacaat ccttgtgcca agtttgaagt ctttttgtg 1740
 tagcatgctc taaatggtac ctctgctcta cctgaattag cttcacttag ctgagcacta 1800
 gctagagttt taggaatgag tatggcagtg aatatggcat ggctttattt atgcctagtt 1860
 tcttggccaa ctcatgtatg ttttgtataa gacatcacac ttttaatttta aacttgtttc 1920
 tgtagaagtg caaatccata tttaatgctt agtttttagtg ctcttatctg atcatctaga 1980
 agtcacagtt cttgtatatt gtgagtgaag actgaaatct aatagaagga tcagatgttt 2040
 cactcaagac acattattac ttcattgtgt tttgatgac tcgagctttt ttagtgtctg 2100
 gaactgtccc tgtgggttga gcacctgtta ttgcttcagt gttactgtcc agtggttatc 2160
 gtttttgacc tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2198

<210> 2
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Vigna radiata

<400> 2

Met	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Ala
1				5					10					15	
Gln	Gln	Asp	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Asn	Pro	Lys	Arg
			20					25						30	
Lys	Trp	Ser	Asn	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Ala
			35				40						45		
Glu	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Met	Ala	Lys	Asn	Ala	Ala	Met
		50				55						60			
Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Glu
	65				70				75					80	
Gly	Asp	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Asp	Arg	Asn	Ser	Glu
			85					90						95	
Ser	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Trp	Leu	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr
			100				105					110			
Ser	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Glu	Pro	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Gln

10

ES 2 444 126 T3

115	120	125
Glu Trp Lys Ser Cys Ser Val Gly Cys Lys Phe Gly Phe Ser Gly Asp		
130	135	140
Arg Lys Pro Asp Ala Ala Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Gly Thr Ala		
145	150	155
		160
Ser Ile Leu Arg Ser Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn		
	165	170
		175
Ile Ala Met Ala Arg Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser		
	180	185
		190
Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp		
	195	200
		205
Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala		
	210	215
		220
Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu		
	225	230
		235
		240
Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His		
	245	250
		255
Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr		
	260	265
		270
Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr		
	275	280
		285
Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val		
	290	295
		300
Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu		
	305	310
		315
		320
His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg		
	325	330
		335
Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys		
	340	345
		350
Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala		
	355	360
		365
Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg		

ES 2 444 126 T3

370		375		380
Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys				
385		390		400
Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly				
	405		410	415
Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu				
	420		425	430
Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu				
	435		440	445
Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser				
	450		455	460
Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln				
	465		470	475
Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His				
	485		490	495
Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val				
	500		505	510

<210> 3

<211> 105

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de péptido

10

<400> 3

gaagccctga agcactacaa atttagctta gcgtttgaaa attcgaatga ggaagattat 60
gtaactgaaa aattcttcca atcccttggt gctggaactg tccct 105

15 <210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc

<400> 4

ES 2 444 126 T3

Glu Ala Leu Lys His Tyr Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn
1 5 10 15

Glu Glu Asp Tyr Val Thr Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly
20 25 30

Thr Val Pro
35

<210> 5
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de péptido

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)
15 <223> incierto

<400> 5

Lys Pro Asp Ala Xaa Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Thr Ala Ser
1 5 10 15

20 <210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de péptido

<400> 6
Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg
1 5 10

30 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de péptido

<400> 7
Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn Ile Ala
1 5 10

40 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de péptido

50 <400> 8

	Gly	Arg	Phe	Glu	Met	Glu	Ser	Ile	Tyr	Leu	
	1				5					10	
	<210> 9										
	<211> 29										
5	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador universal										
	<220>										
	<221> misc_feature										
	<222> (3), (15)										
15	<223> n es a, c, g o t										
	<400> 9										
	gcngartayt aygcngaraa yaayathgc										29
	<210> 10										
20	<211> 22										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador universal										
	<220>										
	<221> misc_feature										
	<222> (14), (17)										
30	<223> n es a, c, g o t										
	<400> 10										
	crtadatrtg rtanacngty tc										22
35	<210> 11										
	<211> 20										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
40	<220>										
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador universal										
	<220>										
	<221> misc_feature										
45	<222> (6)										
	<223> n es a, c, g o t										
	<400> 11										
	tadatnswyt ccatytcraa										20
50	<210> 12										
	<211> 20										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
55	<220>										
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador										
	<400> 12										
60	ctggaactgt ccctgtggtt										20

	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
	<400> 13	
10	agtgactag agggccagaa	20
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 14	
	ttcgagcacc acaattggaa at	22
	<210> 15	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
30	<400> 15	
	gaatgcaaag acggcacgat gaat	24
	<210> 16	
35	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
	<400> 16	
	cggcggatcc gcaattgaat gatg	24
45	<210> 17	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
	<400> 17	
	ccggctgcag taccatttag cgcac	25
55		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de glicoproteínas recombinantes, que comprende la producción de una glicoproteína recombinante en plantas o células de plantas, cuya producción de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa es inhibida o completamente impedida y cuya actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa endógena es inferior al 50% de la actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa que tiene lugar en las plantas o células de plantas naturales, y cuya GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa es codificada por una molécula de ADN, que comprende una secuencia según la SEC ID n° 1 con un marco de lectura abierto del par de bases 211 al par de bases 1740 o presenta una homología de por lo menos un 50% con respecto a la secuencia citada anteriormente o hibridiza con la secuencia citada anteriormente en condiciones rigurosas o comprende una secuencia que, como consecuencia del código genético, está degenerada en la secuencia de ADN citada anteriormente.
- 10
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las glicoproteínas recombinantes son proteínas humanas, en particular proteínas para uso médico.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la actividad de GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa endógena es inferior al 20% de la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa que tiene lugar en las plantas o células de plantas naturales.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa endógena es el 0% de la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa que tiene lugar en las plantas o células de plantas naturales.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la reducción de la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa resulta de la inhibición antisentido, siendo utilizado un polinucleótido, que es por lo menos parcialmente complementario de la secuencia de la molécula de ADN.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la reducción de la actividad de la GlcNAc- α -1,3-fucosiltransferasa resulta de la mutación "knockout" de la secuencia de la molécula de ADN.

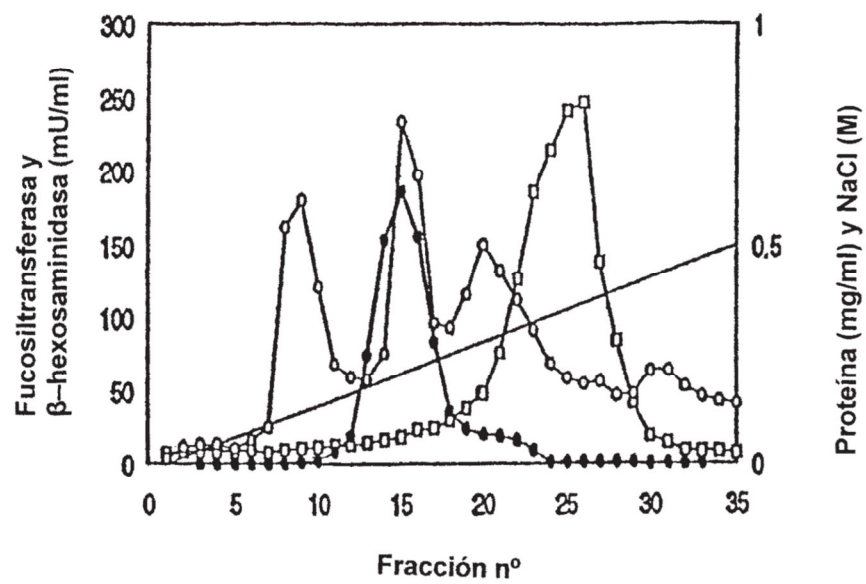


FIG.1 a

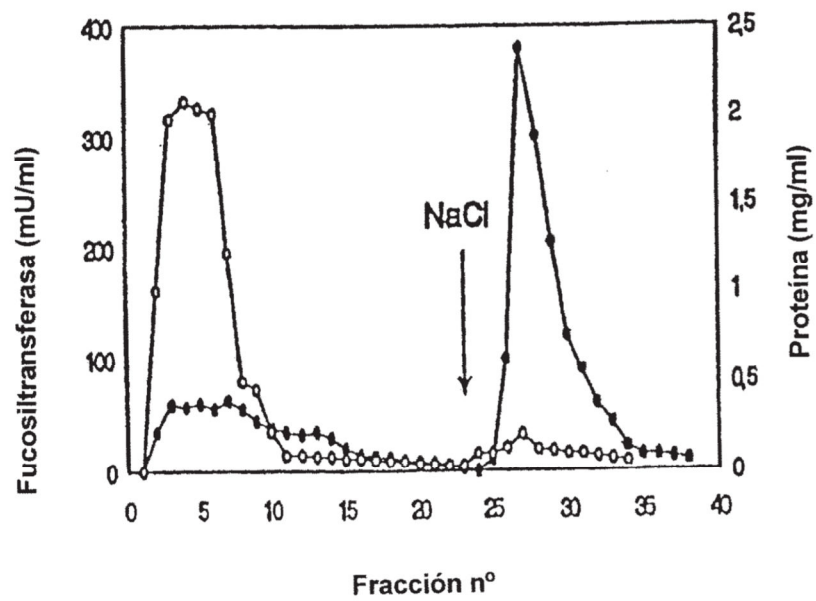


FIG.1 b

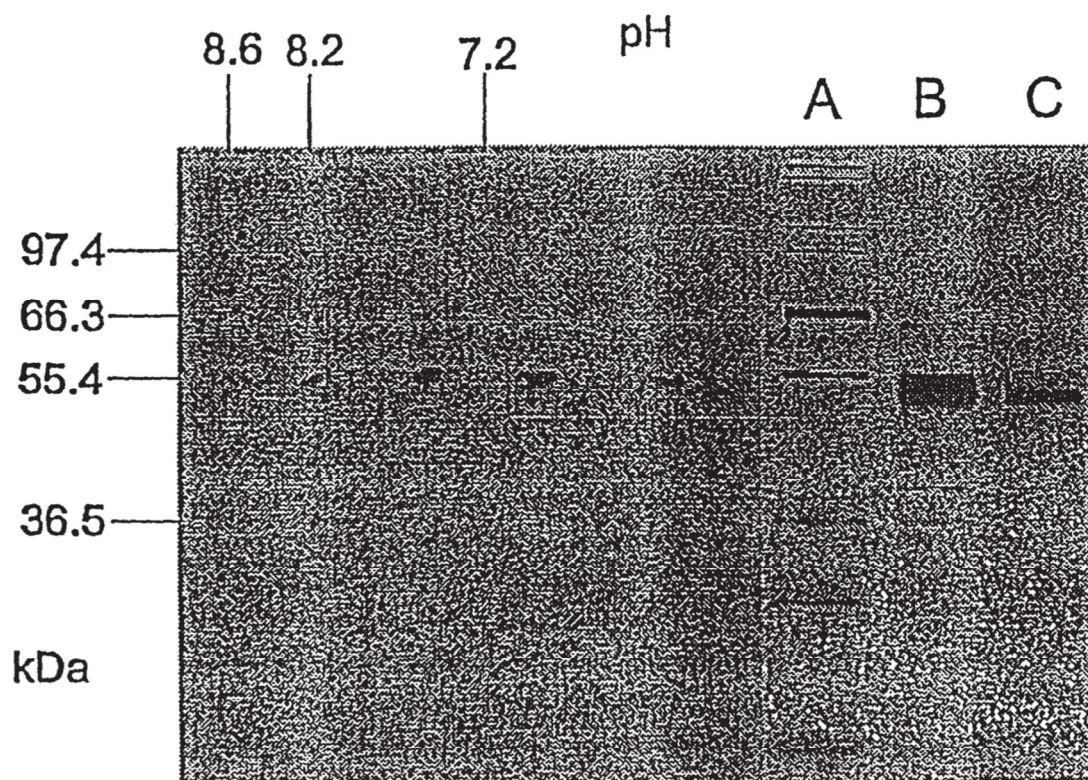
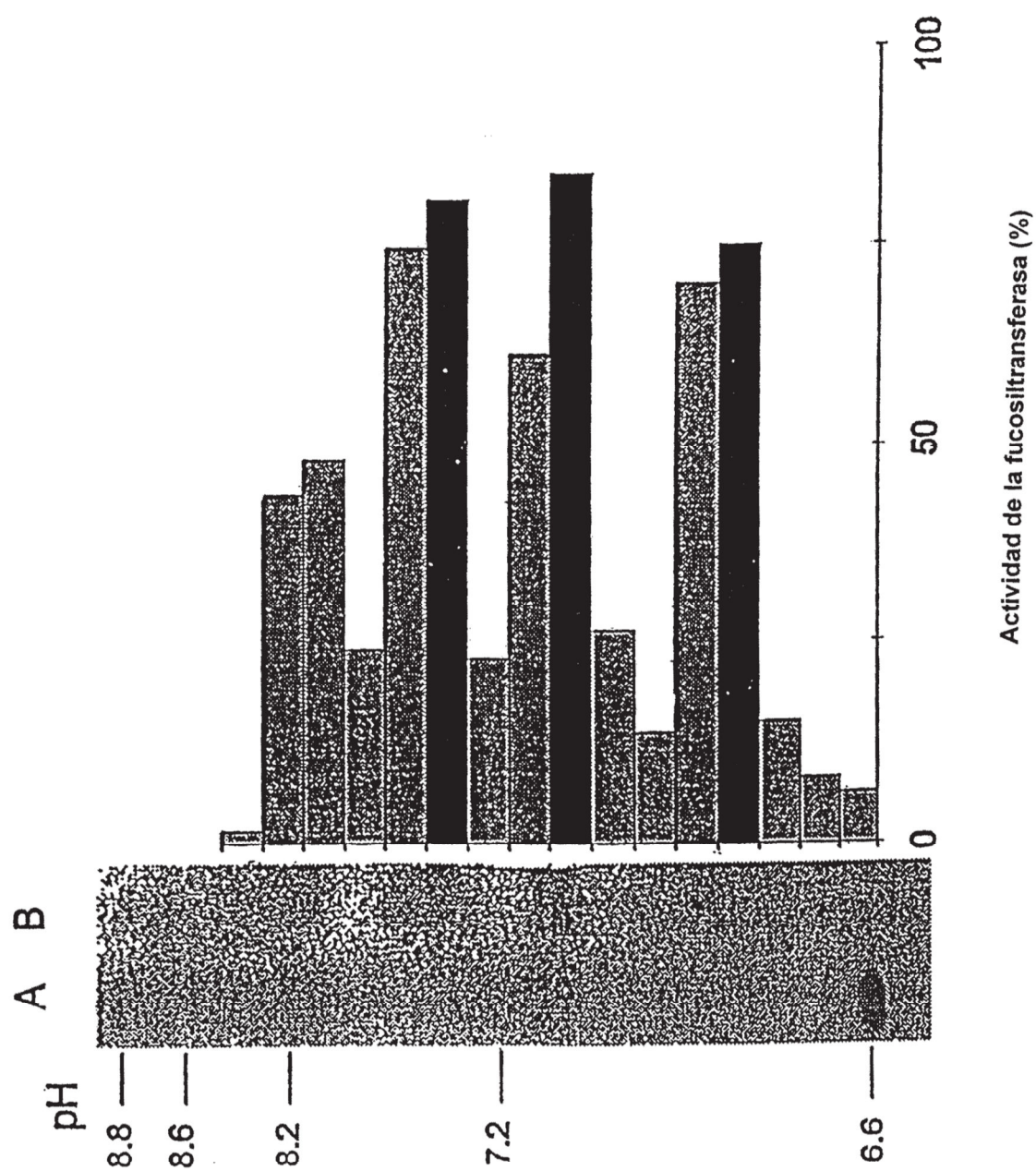


FIG.2

FIG.3



1 KPDA_xFGLPQPSTAS
 2 PETVYHIYVR
 3 MESA EYYAENNIA
 4 GRFEMESIYL

S1 5'- GCIGAATACTACGCIGAAAACAACAT^ACGC -3'
 G T T G T T T

A2 5'- CATAGATATGATAIACIGTCTC -3'
 ^A
 G T G G T

A3 5'- TAGAT^AICTCCATCTCAAA - 3'
 T GTT T G

FIG.4

ACTAACTCAA	ACGCTGCATT	TTCTTTTTTC	TTTCAGGGAA	CCATCCACCC	ATAACAACAA	60
AAAAACAAC	AGCAAGCTGT	GTTTTTTTTTA	TCGTTCTTTT	TCTTTAAACA	AGCACCCCCA	120
TCATGGAATC	GTGCTCATAA	CGCCAAAATT	TTCCATTTCC	CTTTGATTTT	TAGTTTATTT	180
TGCGGAATTG	GCAGTTGGGG	GCGCAATTGA	ATGATGGGTC	TGTTGACGAA	TCTTCGAGGC	240
TCGAGAACAG	ATGGTGCCCA	ACAAGACAGC	TTACCCGTTT	TGGCTCCGGG	AGGCAACCCA	300
AAGAGGAAAT	GGAGCAATCT	AATGCCTCTT	GTTGTTGCCC	TTGTGGTCAT	CGCGGAGATC	360
GCGTTTCTGG	GTAGGTTGGA	TATGGCCAAA	AACGCCGCCA	TGGTTGACTC	CCTCGCTGAC	420
TTCTTCTACC	GCTCTCGAGC	GGTCGTTGAA	GGTGACGATT	TGGGGTTGGG	TTTGGTGGCT	480
TCTGATCGGA	ATTCTGAATC	GTATAGTTGT	GAGGAATGGT	TGGAGAGGGA	GGATGCTGTC	540
ACGTATTCTGA	GGGGCTTTTC	CAAAGAGCCT	ATTTTTGTTT	CTGGAGCTGA	TCAGGAGTGG	600
AAGTCGTGTT	CGGTTGGATG	TAAATTGGG	TTTAGTGGGG	ATAGAAAGCC	AGATGCCGCA	660
TTTGGGTTAC	CTCAACCAAG	TGGAACAGCT	AGCATTCTGC	GATCAATGGA	ATCAGCAGAA	720
TACTATGCTG	AGAACAATAT	TGCCATGGCA	AGACGGAGGG	GATATAACAT	CGTAATGACA	780
ACCAGTCTAT	CTTCGGATGT	TCCTGTTGGA	TATTTTTTCAT	GGGCTGAGTA	TGATATGATG	840
GCACCAGTGC	AGCCGAAAAC	TGAAGCTGCT	CTTGACAGCTG	CTTTCATTTT	CAATTGTGGT	900
GCTCGAAATT	TCCGGTTGCA	AGCTCTTGAG	GCCCTTGAAA	AATCAAACAT	CAAAATTGAT	960
TCTTATGGTG	GTTGTCACAG	GAACCGTGAT	GGAAGAGTGA	ACAAAGTGGG	AGCCCTGAAG	1020
CACTACAAAT	TTAGCTTAGC	GTTTGAAAAT	TCGAATGAGG	AAGATTATGT	AACTGAAAAA	1080
TTCTTCCAAT	CCCTTGTTGC	TGGAAGTGTC	CCTGTGGTTG	TTGGTGCTCC	AAATATTCAG	1140

FIG.5 a

GACTTTGCTC	CTTCTCCTGG	TTCAATTTTA	CATATTAAAG	AGATAGAGGA	TGTTGAGTCT	1200
GTTGCAAAGA	CCATGAGATA	TCTAGCAGAA	AATCCCGAAG	CATATAATCA	ATCATTGAGG	1260
TGGAAGTATG	AGGGTCCATC	TGACTCCTTC	AAGGCCCTTG	TGGATATGGC	AGCTGTGCAT	1320
TCATCGTGCC	GTCTTTGCAT	TCACTTGGCC	ACAGTGAGTA	GAGAGAAGGA	AGAAAATAAT	1380
CCAAGCCTTA	AGAGACGTCC	TTGCAAGTGC	ACTAGAGGGC	CAGAAACCGT	ATATCATATC	1440
TATGTCAGAG	AAAGGGGAAG	GTTTGAGATG	GAGTCCATTT	ACCTGAGGTC	TAGCAATTTA	1500
ACTCTGAATG	CTGTGAAGGC	TGCTGTTGTT	TTGAAGTTCA	CATCCCTGAA	TCTTGTGCCT	1560
GTATGGAAGA	CTGAAAGGCC	TGAAGTTATA	AGAGGGGGGA	GTGCTTTAAA	ACTCTACAAA	1620
ATATACCCAA	TTGGCTTGAC	ACAGAGACAA	GCTCTTTATA	CCTTCAGCTT	CAAAGGTGAT	1680
GCTGATTTCA	GGAGTCACTT	GGAGAACAAT	CCTTGTGCCA	AGTTTGAAGT	CATTTTTGTG	1740
TAGCATGCGC	TAAATGGTAC	CTCTGCTCTA	CCTGAATTAG	CTTCACTTAG	CTGAGCACTA	1800
GCTAGAGTTT	TAGGAATGAG	TATGGCAGTG	AATATGGCAT	GGCTTTATTT	ATGCCTAGTT	1860
TCTTGGCCAA	CTCATTGATG	TTTTGTATAA	GACATCACAC	TTTAATTTTA	AACTTGTTTC	1920
TGTAGAAGTG	CAAATCCATA	TTTAATGCTT	AGTTTTAGTG	CTCTTATCTG	ATCATCTAGA	1980
AGTCACAGTT	CTTGTATATT	GTGAGTGAAA	ACTGAAATCT	AATAGAAGGA	TCAGATGTTT	2040
CACTCAAGAC	ACATTATTAC	TTCATGTTGT	TTTGATGATC	TCGAGCTTTT	TTAGTGTCTG	2100
GAAGTGTCCC	TGTGGTTTGA	GCACCTGTTA	TTGCTTCAGT	GTTACTGTCC	AGTGTTTATC	2160
GTTTTTGACC	TCTAAAAAAA	AAAAA	AAAAA	AAAAA		2198

FIG.5 b

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

FIG.6 a

Arg	Asn	Arg	Asp	Gly	Arg	Val	Asn	Lys	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	His	Tyr		
			260					265					270				
Lys	Phe	Ser	Leu	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Asn	Glu	Glu	Asp	Tyr	Val	Thr		
		275					280					285					
Glu	Lys	Phe	Phe	Gln	Ser	Leu	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Pro	Val	Val	Val		
	290					295					300						
Gly	Ala	Pro	Asn	Ile	Gln	Asp	Phe	Ala	Pro	Ser	Pro	Gly	Ser	Ile	Leu		
305					310					315					320		
His	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asp	Val	Glu	Ser	Val	Ala	Lys	Thr	Met	Arg		
				325					330					335			
Tyr	Leu	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ser	Leu	Arg	Trp	Lys		
			340					345					350				
Tyr	Glu	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Asp	Met	Ala	Ala		
		355					360					365					
Val	His	Ser	Ser	Cys	Arg	Leu	Cys	Ile	His	Leu	Ala	Thr	Val	Ser	Arg		
	370					375					380						
Glu	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg	Pro	Cys	Lys	Cys		
385					390					395					400		
Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Thr	Val	Tyr	His	Ile	Tyr	Val	Arg	Glu	Arg	Gly		
				405					410					415			
Arg	Phe	Glu	Met	Glu	Ser	Ile	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Leu	Thr	Leu		
			420					425					430				
Asn	Ala	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Lys	Phe	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu		
		435					440					445					
Val	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Glu	Arg	Pro	Glu	Val	Ile	Arg	Gly	Gly	Ser		
	450					455					460						
Ala	Leu	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Pro	Ile	Gly	Leu	Thr	Gln	Arg	Gln		
465					470					475					480		
Ala	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Phe	Lys	Gly	Asp	Ala	Asp	Phe	Arg	Ser	His		
				485					490					495			
Leu	Glu	Asn	Asn	Pro	Cys	Ala	Lys	Phe	Glu	Val	Ile	Phe	Val				
			500					505					510				

FIG.6 b

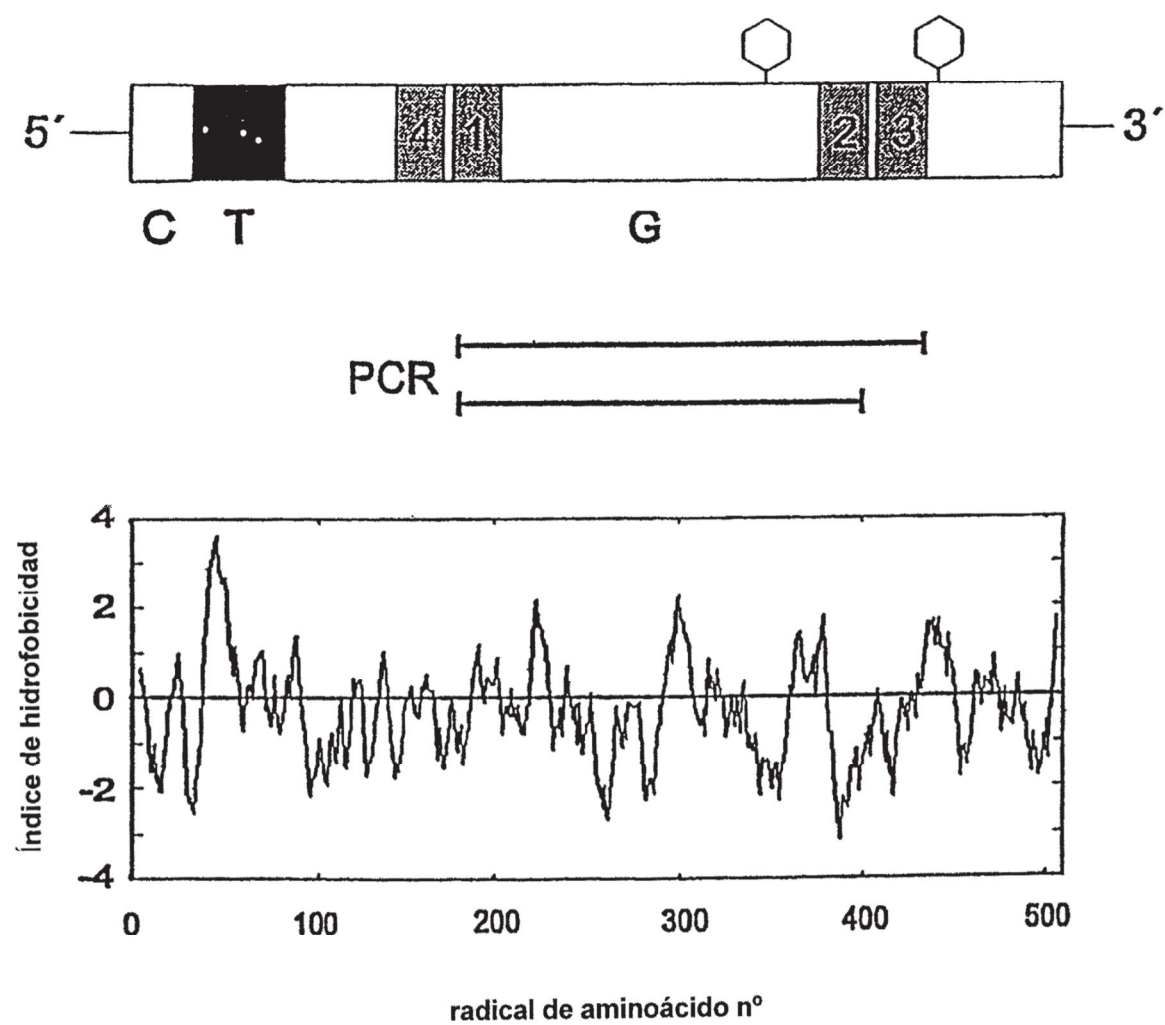


FIG.7

Transferasa	Tipo	# ^a	Motivo conservado
FucT-C3	Judía mungo		267-EALKHYKESLA FENSNEEDYVTEKFFQ-SLVAGTVP
FucT-III	Humano	P21217	238-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-III	Chimpancé	O19058	247-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-V	Humano	Q11128	249-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-V	Chimpancé	P56433	249-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-VI	Humano	P51993	235-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-VI	Chimpancé	P56434	235-ETLSRYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALEAWAVP
FucT-III	Vacuno	Q11126	240-KQLSQYKFYLA FENS LHPDYITEKLWRN ALQAWAVP
FucT-7	Hamster chino	O35886	237-GTLARYKFYLA FENS LHPDYITEKLWKNALEAWAVP
FucT-VII	Humano	Q11130	217-PTVAQYRFYLS FENS QHRDYITEKFWRN ALVAGTVP
FucT-VII	Ratón	Q11131	264-PTIARYRFYLA FENS QHRDYITEKFWRN ALAAGAVP
FucT-VII	<i>Schistosoma mansoni</i>	O76204	226-PTIARYRFYLA FENS QHRDYITEKFWRN ALAAGAVP
FucT-IV	Humano	P22083	277-HTVARYKFYLA FENS QHLDYITEKLWRN ALLAGAVP
FucT-IV	Ratón	Q11127	305-HTVARYKFYLA FENS RVDYITEKLWRN AFLAGAVP
FucT-IV	Rata	Q62994	305-HTVARYKFYLA FENS QHVDYITEKLWRN AFLAGAVP
FucT-IV	Gallina	Q98952	228-KTVSAKYFYLA FENS QHTDYITEKLWKNAFAASAVP
FucT-IX	Ratón	O88819	233-PTISTCKFYLS FENS IHKDYITEKLYN AFL-AGSVP
FucA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	O76544	247-DVLKRYNFALA FENS LCKDYITEKLWE-SLSVGTIP
hpFucT1	<i>Helicobacter pylori</i>	O32631	106-EFISQYKFNLC FENS QGYGVTEKILD-AYFSHTIP
hpFucT2	<i>Helicobacter pylori</i>	O30511	227-EFISQYKFNLC FENS QGYGVTEKI ID-AYFSHTIP
CEFT-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q21362	303-MLD TDYHFYVF FENS ICEDYVTEKLWKS GYQNTIIP

* N° de acceso al banco de datos de las secuencias de proteínas SwissProt

FIG.8

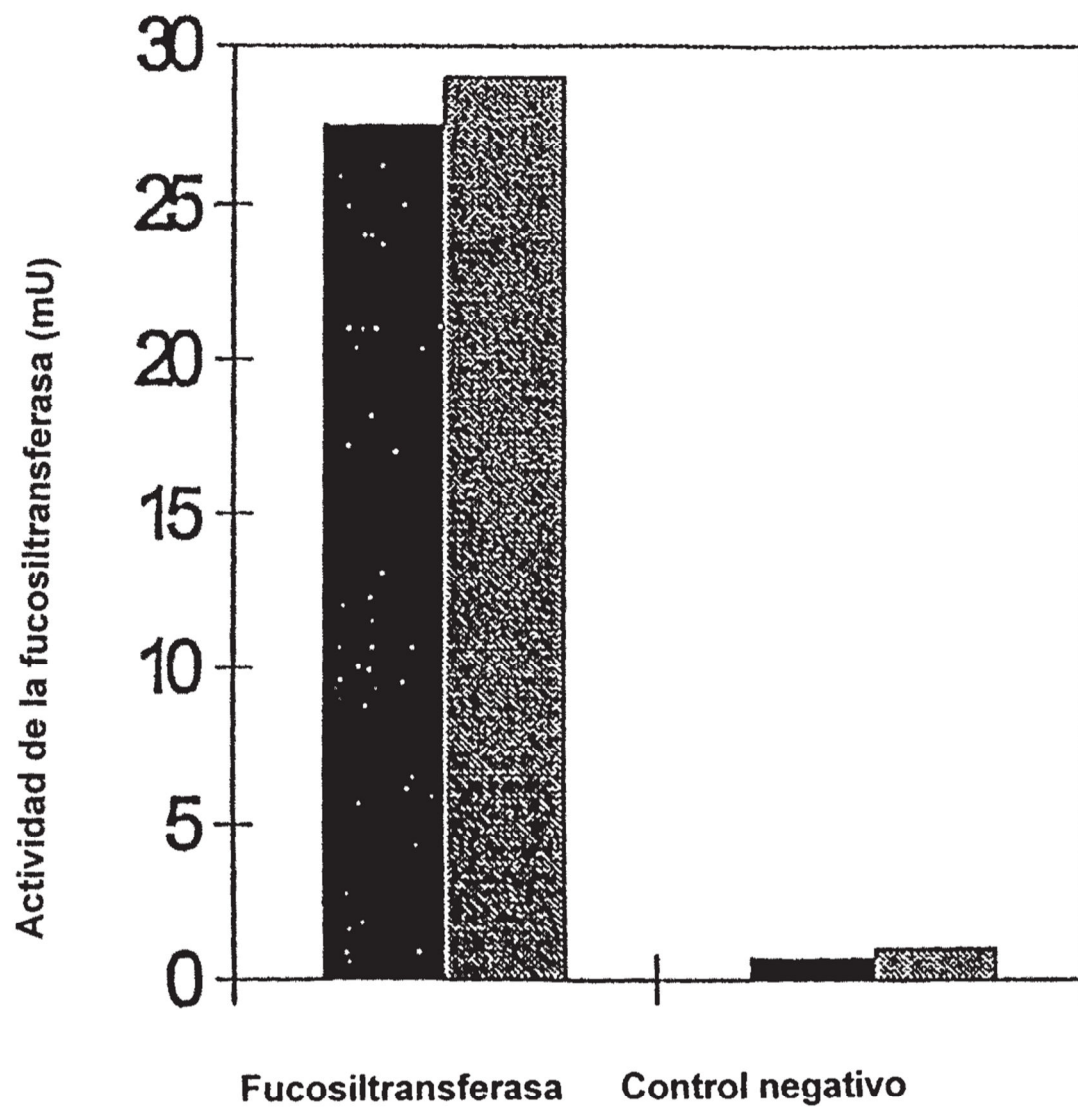


FIG.9

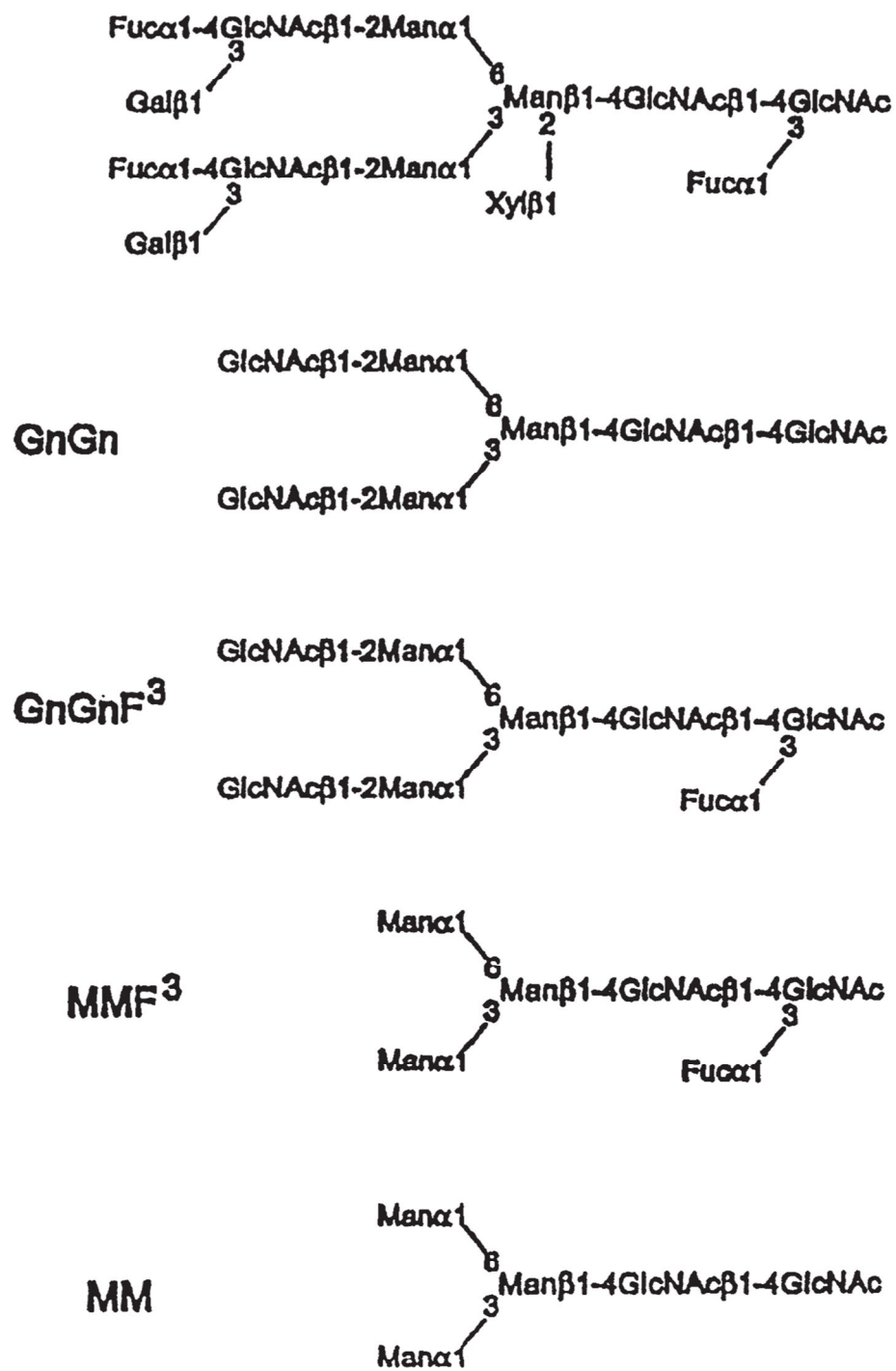


FIG.10 a

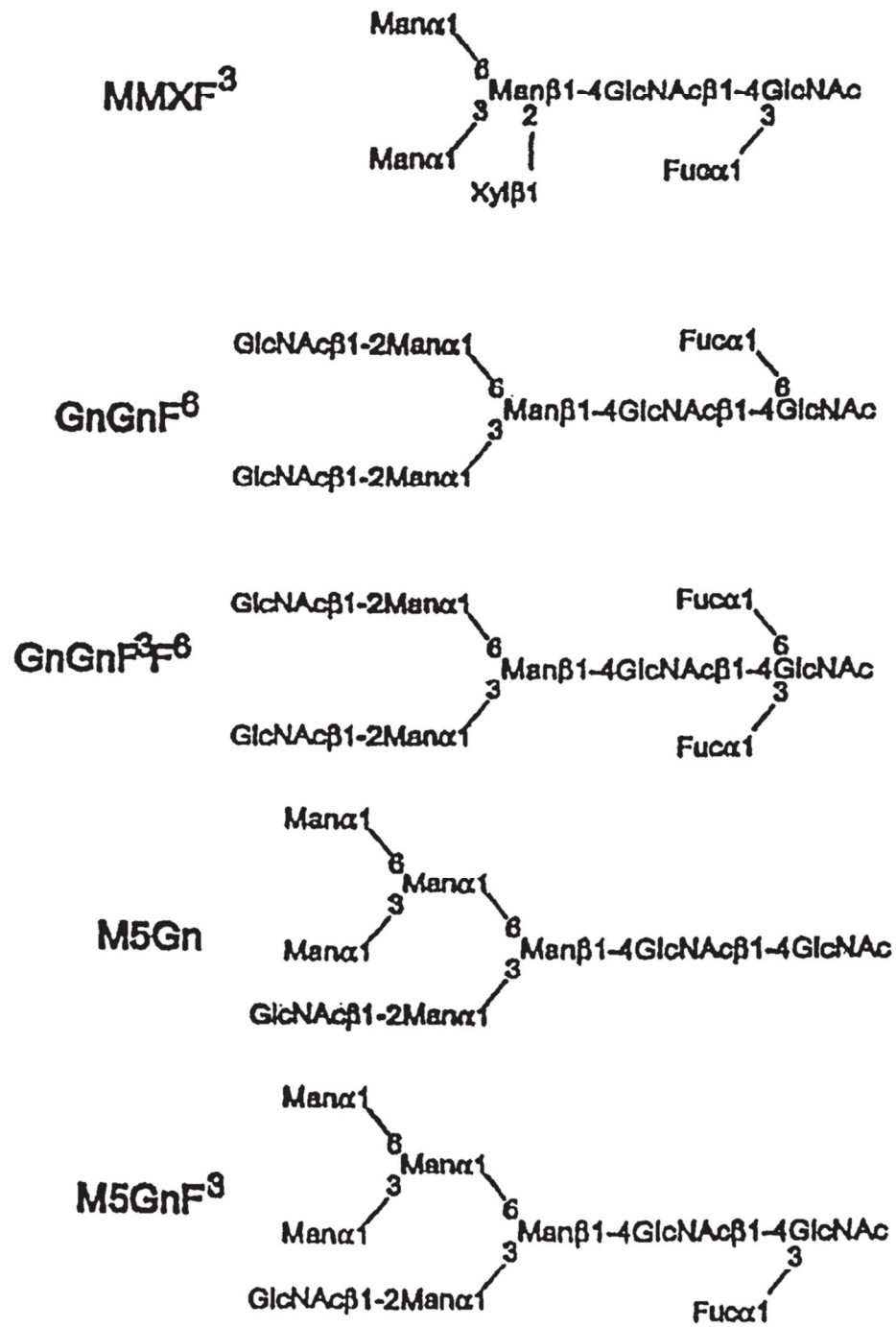


FIG.10 b

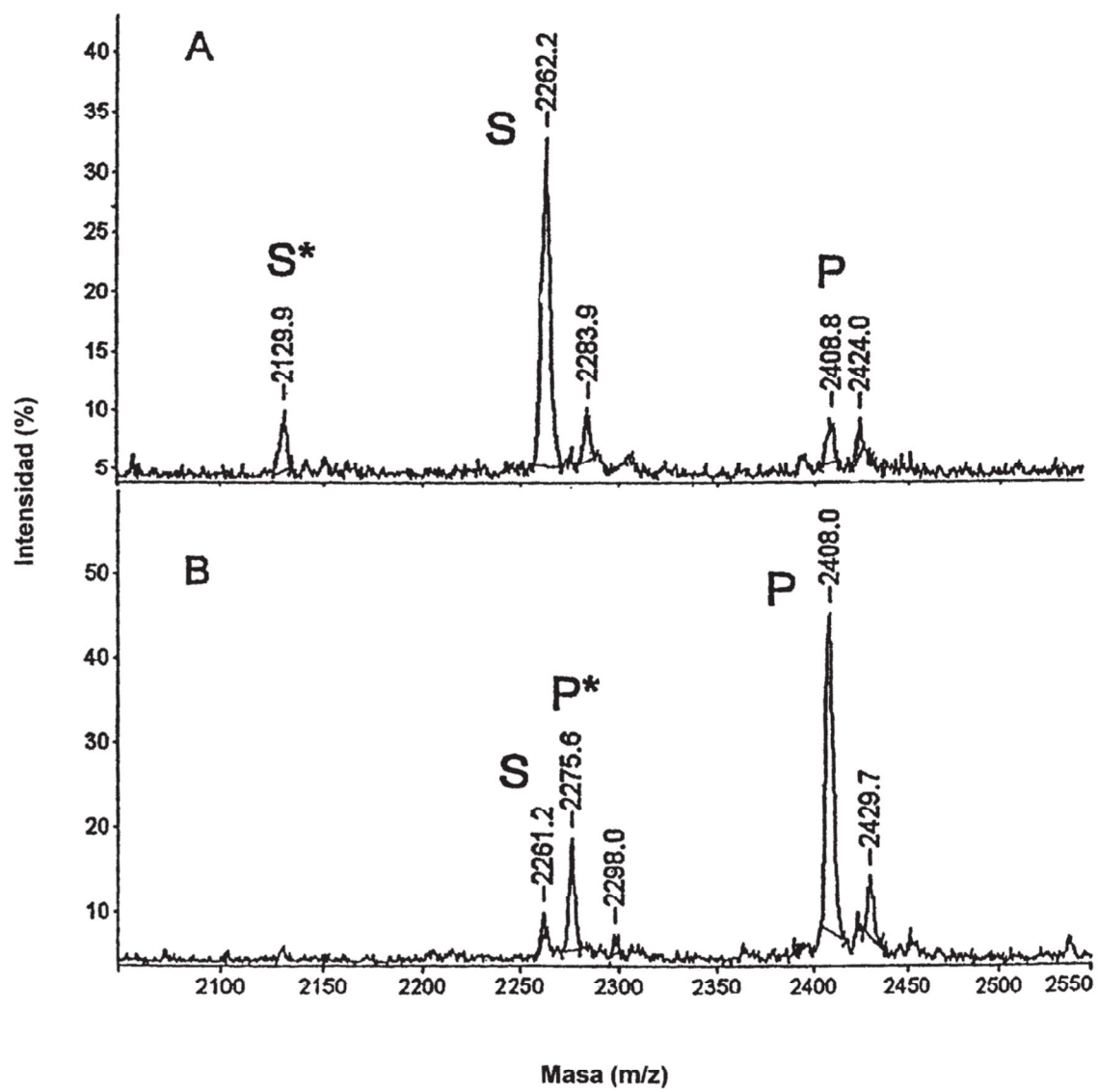
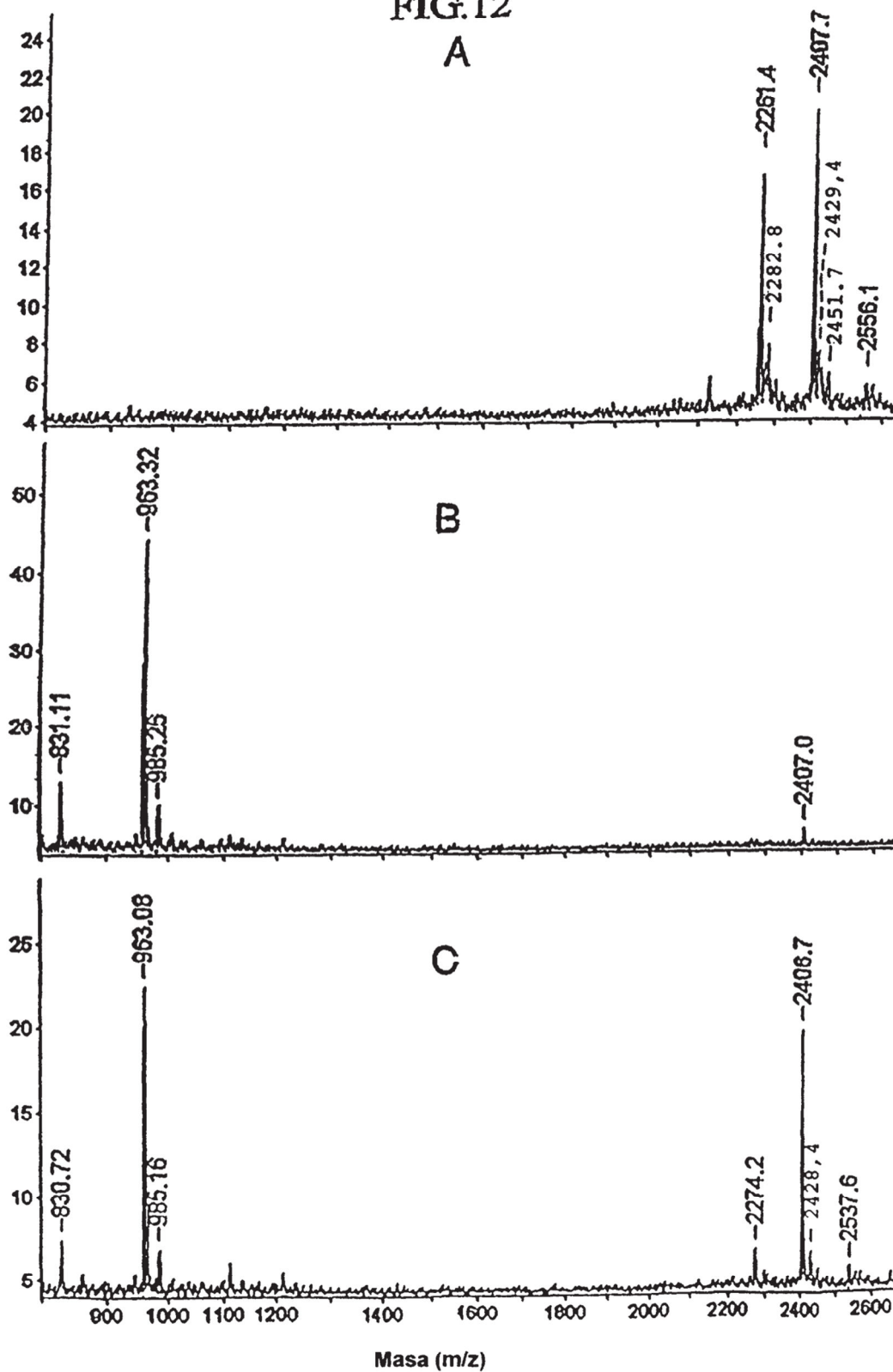


FIG.11

FIG.12



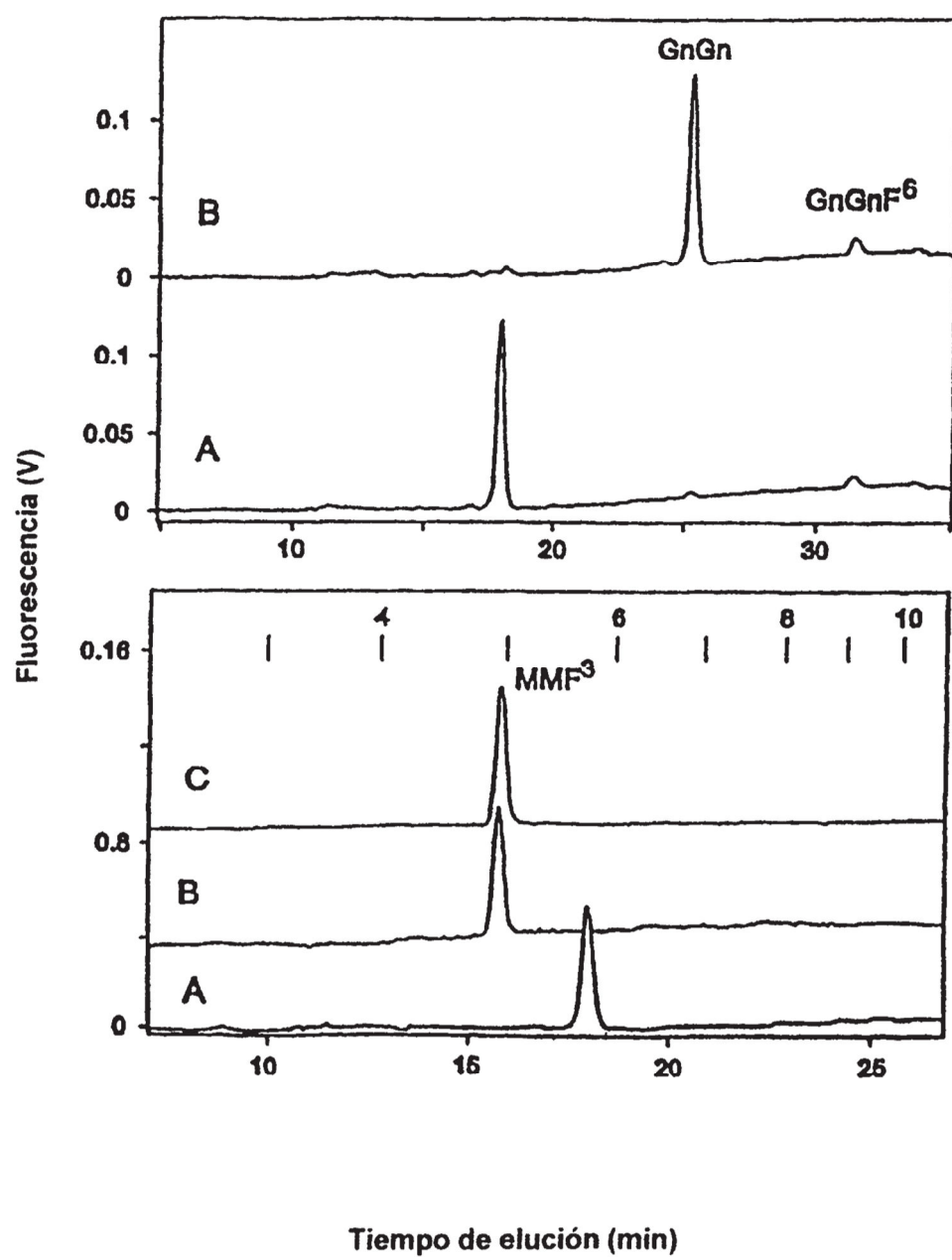


FIG.13