

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 627**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2010 E 15169876 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2944690**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

73 Titular/es:
**JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Maarweg 32
53619 Rheinbreitbach, DE**

72 Inventor/es:
**PARKOT, JULIA;
HÜFNER, ERIC y
JENNEWEIN, STEFAN**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 627 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fucosiltransferasas novedosas y sus aplicaciones

La presente invención se refiere a fucosiltransferasas novedosas y sus aplicaciones.

5 Muchas (glico)proteínas, (glico)lípidos u oligosacáridos requieren la presencia de estructuras fucosiladas particulares, con el fin de mostrar una actividad biológica particular. Por ejemplo, muchos mecanismos de reconocimiento intercelular requieren un oligosacárido fucosilado: por ejemplo, con el fin de unirse a las moléculas de adhesión celular, tales como L-selectina, las estructuras celulares específicas han de comprender carbohidratos fucosilados. Otro ejemplo de estructuras fucosiladas que tienen una función biológica son las estructuras que forman el sistema del grupo sanguíneo AB0. Además, las (glico)proteínas terapéuticas representan la clase de reactivos farmacéuticos con un crecimiento más rápido, donde sus propiedades farmacocinéticas y estabilidad se adscriben a sus glicanos.

10 Debido a su compleja naturaleza y propiedades químicas inherentes, la síntesis química de los glicoconjugados es un desafío importante y asociado con dificultades considerables. A diferencia de las proteínas y ácidos nucleicos, para los cuales hay comercializados sintetizadores automáticos, los glicanos (y menos aún los glicoconjugados) no pueden (todavía) sintetizarse utilizando un sistema comercial general. Aparte del requisito de controlar la estereoquímica, la formación de uniones específicas sigue siendo difícil.

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

20 Las fucosiltransferasas, que pertenecen a la familia enzimática de glicosiltransferasas, están ampliamente expresadas en los vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias. Catalizan la transferencia de un residuo de fucosa desde un donante, por lo general guanosina-difosfato fucosa (GDP-fucosa) a un aceptor, que incluye oligosacáridos, (glico)proteínas y (glico)lípidos. Los sustratos aceptores fucosilados de esta manera participan en diversos procesos biológicos y patológicos.

25 Se han identificado varias fucosiltransferasas, por ejemplo, en las bacterias *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, en mamíferos, *Caenorhabditis elegans* y *Schistosoma mansoni*, así como también en plantas, donde en función del sitio de la adición de fucosa, las fucosiltransferasas se clasifican en alfa 1,2, alfa 1,3/4 y O-fucosiltransferasas.

30 En los mamíferos, la GDP-fucosa se sintetiza en el citoplasma mediante la síntesis *de novo* y la ruta de recuperación. En la síntesis *de novo*, la GDP-manosa se convierte en GDP-fucosa mediante dos enzimas, mientras que la ruta de recuperación utiliza como sustrato la fucosa citosólica libre. En la célula, la GDP-fucosa se concentra en las vesículas y es reconocida por las fucosiltransferasas como un sustrato donante.

35 Cardeño-Tárraga *et al.* analizan la secuencia genómica completa de la bacteria *Bacteroides fragilis*, así como también las agrupaciones génicas de *Bacteroides fragilis* que participan potencialmente en la formación de cápsulas de antígeno O similares de *E. coli*.

El documento US 2006/0234354 A1 divulga métodos para la conversión enzimática práctica de GDP-manosa en GDP-fucosa, y estos métodos se utilizan para la preparación de oligosacáridos fucosilados. En el método descrito en él, se describe la enzima YEF B de *E. coli* catalizando la epimerización y reducción de GDP-4-ceto-6-D-desoximanosa en GDP-fucosa.

40 Los documentos WO 01/23398 A1 y US 5 922 577 divulgan la generación de oligosacáridos fucosilados, aplicando enzimas de tipo fucosiltransferasa humana.

Ya que la actividad biológica de muchos oligosacáridos, (glico)proteínas y (glico)lípidos importantes desde un punto de vista comercial depende de la presencia de residuos de fucosa concretos, en la técnica se requiere sintetizar o producir con eficacia glicoconjugados que tengan el(los) residuo(s) oligosacárido(s) deseado(s).

45 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar herramientas y métodos mediante los cuales se puedan producir sustratos fucosilados de una manera eficaz, y rentable respecto al tiempo y dinero, que generen cantidades elevadas del sustrato deseado.

50 De acuerdo con la invención, este objetivo se resuelve, entre otros, proporcionando una célula hospedadora fúngica o bacteriana, un uso y métodos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, que comprenden o utilizan un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia o está constituido por una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por:

- a) las SEQ ID NOs: 3 o 5 de la lista de secuencias adjunta;

- b) una secuencia de ácido nucleico complementaria a las SEQ ID NOs: 3 o 5;
- c) secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus hebras complementarias.

5 Los polinucleótidos de acuerdo con la invención representan fucosiltransferasas de la especie *Bacteroides fragilis*, donde las SEQ ID NOs: 3 y 5 muestran las secuencias polinucleotídicas de dos fucosiltransferasas de *Bacteroides fragilis* recién identificadas. La SEQ ID NO:1 de la lista de secuencias adjunta muestra la secuencia polinucleotídica de una fucosiltransferasa de *Akkermansia muciniphila* recién identificada.

10 Las fucosiltransferasas recién identificadas tienen efectos sorprendentes ya que utilizándolas se pueden llevar a cabo reacciones que no se producen de manera natural: En el alcance de la presente invención se ha descubierto que las alfa-1,3-fucosiltransferasas identificadas anteriormente son capaces de utilizar lactosa como sustrato y son capaces de producir oligosacáridos fucosilados, en particular 3-fucosillactosa. Hasta la fecha, ninguna de las alfa-1,3-fucosiltransferasas conocidas aisladas a partir de bacterias ha mostrado que utilice lactosa como un sustrato natural para la producción de fucosillactosa. Por lo tanto, la idoneidad de las fucosiltransferasas recién identificadas que se van a utilizar para producir oligosacáridos fucosilados es sumamente sorprendente y, por lo tanto, su uso
15 representa una herramienta excelente para producir fácilmente, con eficacia y ahorrando dinero, por ejemplo, oligosacáridos de la leche humana (HMO, por sus siglas en inglés), tales como fucosillactosa. En la actualidad, se han caracterizado estructuralmente más de 80 compuestos, que pertenecen a HMO; representan una clase de oligosacáridos complejos que actúan como prebióticos. Además, la homología estructural de HMO respecto a los epítomos epiteliales justifica las propiedades protectoras contra los patógenos bacterianos. Dentro del tubo
20 gastrointestinal de los lactantes, los HMO fomentan selectivamente el crecimiento de cepas bacterianas seleccionadas y, por lo tanto, ceban el desarrollo de una microbiota intestinal única en los lactantes alimentados con leche materna.

Hasta la fecha, la complejidad estructural de estos oligosacáridos ha impedido su producción sintética, y la principal fuente de HMO sigue siendo la leche humana. Por lo tanto, se necesitan HMO que se puedan obtener con facilidad y prontitud, los cuales se pueden proporcionar utilizando las fucosiltransferasas (sorprendentemente adecuadas) que se muestran en la presente.
25

De acuerdo con la presente invención, el término «polinucleótido(s)» se refiere por lo general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. El término «polinucleótido(s)» incluye, sin carácter limitante, ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias o regiones mono-, bi- y tricatenarias, ARN mono- y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más comúnmente, regiones bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, el término «polinucleótido», tal como se utiliza en la presente, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las hebras en tales regiones pueden proceder de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero normalmente solo está implicada una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región helicoidal triple es a menudo un oligonucleótido. Tal como se utiliza en la presente, el término «polinucleótido(s)» también incluye ADN o ARN como los descritos anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o ARN con esqueletos modificados por estabilidad u otras razones son «polinucleótido(s)» con el significado que se le da al término en la presente. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son polinucleótidos según se utiliza el término en la presente. Se apreciará que se han realizado una gran variedad de modificaciones en el ADN y ARN con muchos fines útiles que conocen los expertos en la técnica. El término «polinucleótido(s)», tal como se emplea en la presente, engloba tales formas modificadas de manera química, enzimática o metabólica de polinucleótidos, así como también las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluidas, por ejemplo, células simples y complejas. Asimismo, el término «polinucleótido(s)» también engloba polinucleótidos cortos denominados a menudo oligonucleótido(s).
30
35
40
45

El término «polipéptido(s)» se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. El término «polipéptido(s)» se refiere tanto a cadenas cortas, denominadas normalmente péptidos, oligopéptidos y oligómeros y a cadenas más largas denominadas generalmente proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos que no son los 20 aminoácidos codificados por genes. El término «polipéptido(s)» incluye los modificados mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, pero también mediante técnicas de modificación química. Tales modificaciones se describen bien en los textos básicos y con más detalle en las monografías, así como también en una bibliografía de investigación voluminosa, y son muy conocidas por los expertos en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en un grado idéntico o variable en varios sitios en un polipéptido concreto. Asimismo, un polipéptido concreto puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier lugar de un polipéptido, incluidos el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y el extremo amino o carboxilo. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto
50
55
60

hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, selenoilación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tales como arginilación, y ubiquitinación. Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraduccionales y puede que se generen también mediante procesos totalmente sintéticos.

El término «aislado» significa alterado «por el hombre» respecto a su estado natural, es decir, si está presente en la naturaleza, se ha modificado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de manera natural en un organismo vivo no está «aislado», pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales con los que coexiste en su estado natural está «aislado», según se emplea el término en la presente. De manera similar, una secuencia «sintética», según se utiliza el término en la presente, se refiere a cualquier secuencia que se ha generado de manera sintética y no se ha aislado directamente de una fuente natural. El término «recombinante» se refiere a ADN modificado genéticamente preparado sometiendo genes a corte y empalme o trasplantándolos de una especie a las células de un organismo hospedador de una especie diferente. Tal ADN se vuelve parte de la dotación genética del hospedador y se replica.

La expresión «polinucleótido que codifica un polipéptido», tal como se utiliza en la presente, engloba polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido de la invención, especialmente, una alfa-1,3-fucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en las SEQ ID NOs: 2, 4 y 6. La expresión también engloba polinucleótidos que incluyen una región continua única o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidas por un fago integrado o una inserción de secuencia o edición) junto con regiones adicionales que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

El término «variante(s)», tal como este se utiliza en la presente, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido, respectivamente, de referencia pero retiene propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, tal como se explica más adelante. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Por lo general, las diferencias son limitadas de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son, en global, muy similares y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y el polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Un residuo aminoacídico sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede tener un origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante de la que no se sabe que ocurra en la naturaleza. Las variantes que no tienen un origen natural de polinucleótidos y polipéptidos se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis, mediante síntesis directa y mediante otros métodos recombinantes conocidos por los expertos en la técnica.

Los términos «alfa-1,3-fucosiltransferasa» o «fucosiltransferasa» o un ácido nucleico/polinucleótido que codifica una «alfa-1,3-fucosiltransferasa» o «fucosiltransferasa» se refieren a una glicosiltransferasa que cataliza la transferencia de una fucosa de un sustrato donante, por ejemplo, GDP-fucosa, a una molécula aceptora en una unión alfa-1,3. La molécula aceptora puede ser un carbohidrato, un oligosacárido, una proteína o (glico)proteína, o un lípido o (glico)lípido, y puede ser, por ejemplo, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetillactosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico, glucosa, lactosa o cualquier combinación de estos. En el alcance de la presente invención, también están comprendidas por esos términos variantes polimórficas de ácidos nucleicos/polinucleótidos y polipéptidos, alelos, mutantes y homólogos entre especies, que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente un 60% de identidad secuencial de aminoácidos, un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferentemente un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% o más de identidad secuencial de aminoácidos, preferentemente en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000 o más aminoácidos, respecto a un polipéptido codificado por un ácido nucleico seleccionado entre las SEQ ID NOs: 1, 3 o 5, o una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs: 2, 4 o 6.

Además, el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa puede estar alterado por adiciones o deleciones de secuencias peptídicas con el fin de modificar su actividad. Por ejemplo, las secuencias polipeptídicas se pueden fusionar al polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa con el fin de hacer efectiva una actividad enzimática adicional. Como alternativa, los aminoácidos se pueden eliminar para anular o modificar la actividad de la proteína. La proteína se puede modificar para que carezca de actividad enzimática alfa-1,3-fucosiltransferasa pero siga manteniendo su estructura tridimensional. Tal modificación puede ser útil en el desarrollo de anticuerpos contra el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa.

Además, los productos génicos de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa pueden incluir proteínas o polipéptidos que representan productos génicos funcionalmente equivalentes. Un producto génico de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa equivalente de este tipo puede comprender deleciones, adiciones o sustituciones de residuos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias génicas de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa descritas anteriormente, pero que dan como resultado un cambio silencioso, y proporcionan de esta manera un producto génico de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en función de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros planos incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. En el contexto de esta invención, la expresión «funcionalmente equivalente», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido capaz de mostrar una actividad *in vivo* sustancialmente similar a la de los productos génicos de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa endógenos codificados por las secuencias génicas de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa descritas anteriormente, tal como se evalúa según varios criterios que incluyen, sin carácter limitante, la antigenicidad, es decir, la capacidad de unirse a un anticuerpo anti-alfa-1,3-fucosiltransferasa, inmunogenicidad, es decir, la capacidad de generar un anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína o polipéptido de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa, así como también la actividad enzimática.

En el alcance de la invención se incluyen proteínas, polipéptidos y derivados (incluidos fragmentos) de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción. Además, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia del polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa.

El polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Se pueden utilizar métodos con los que están muy familiarizados los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican la alfa-1,3-fucosiltransferasa y las señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Remítase, por ejemplo, a las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Un «oligosacárido», tal como se utiliza el término en la presente y se entiende generalmente en la técnica, se refiere a un polímero sacarídico que contiene un número pequeño, normalmente de tres a diez, de azúcares simples, es decir, monosacáridos.

De acuerdo con la invención, la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa está contenida en un vector, donde la secuencia polinucleotídica está ligada operablemente a las secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector. En una realización especialmente preferida, el vector es un vector de expresión y, de acuerdo con otro aspecto de la invención, el vector puede estar presente en forma de un plásmido, cósmido, fago, liposoma o virus.

Para la producción recombinante, las células hospedadoras se pueden modificar genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de estos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986), y Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Por lo tanto, el polinucleótido de acuerdo con la invención está comprendido en un vector con el que se van a transformar/transfectar de manera estable las células hospedadoras. En el vector, el polinucleótido de la invención está controlado, por ejemplo, por un promotor inducible, de manera que se puede actuar específicamente sobre la expresión del gen/polinucleótido y, si se desea, se puede sobreexpresar el gen de esta manera.

Se puede utilizar una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriofagos, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus y vectores derivados de combinaciones de estos, tales como los derivados del plásmido y elementos genéticos de bacteriofagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los constructos del sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan así como también generan la expresión. Por lo general, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un hospedador se puede utilizar para la expresión en este sentido. Se puede insertar la secuencia de ADN apropiada en el sistema de expresión mediante una cualquiera de varias técnicas de uso común y muy conocidas tal como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook *et al.*, remítase a la referencia anterior.

En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso de un polipéptido aislado con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por:

- (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6;
- b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicha variante alélica está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; y
- c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicho ortólogo está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5.

La expresión «condiciones rigurosas» se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridarán específicamente a temperaturas más elevadas. Por lo general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 15 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual un 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC y un 1% de SDS, incubación a 42 °C, o 5x SSC, un 1% de SDS incubación a 65 °C, con un lavado en 0.2x SSC y un 0.1% de SDS a 65 °C.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la invención se refiere a una célula hospedadora que contiene un vector tal como se ha definido anteriormente, donde la célula hospedadora que se selecciona a partir del grupo constituido por hongos, incluidas levaduras, y bacterias. Se prefiere especialmente que la célula hospedadora sea una célula de *Escherichia coli*.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «célula hospedadora» se define actualmente como una célula fúngica o bacteriana que ha sido transformada o transfectada, o es capaz de ser transformada o transfectada por una secuencia polinucleotídica exógena.

Se pueden utilizar varios sistemas vectoriales de expresión en hospedadores para expresar las secuencias codificantes del gen de la alfa-1,3-fucosiltransferasa de la invención. Tales sistemas de expresión en hospedadores representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y purificar posteriormente, pero también representan células las cuales, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, muestran el producto génico de tipo alfa-1,3-fucosiltransferasa de la invención *in situ*.

Se pueden consultar varios sistemas de expresión y hospedadores adecuados, por ejemplo, en el documento WO 98/55630, el cual trata sobre fucosiltransferasas aisladas de *Helicobacter pylori*, a cuya publicación se hace referencia de manera explícita en la presente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa se adapta para el uso de codones de la célula respectiva.

La invención se refiere a un método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:

- a. proporcionar un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por a) una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6; b) una secuencia de aminoácidos una variante alélica de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6, donde dicha variante alélica está codificada por una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; y c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6, donde dicho ortólogo está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5,
- b. poner en contacto el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa del paso a. con una mezcla que comprende un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido en condiciones en las que el polipéptido cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado.

De acuerdo con la invención, el método para producir oligosacáridos fucosilados se puede realizar en un sistema exento de células o en un sistema que contiene células. Se permite que los sustratos reaccionen con el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa durante un tiempo suficiente y en condiciones suficientes para permitir la formación del producto enzimático. Se debe entender que estas condiciones variarán dependiendo de las cantidades y pureza del sustrato y enzima, independientemente de si el sistema es un sistema exento de células o con células. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente estas variables.

En los sistemas exentos de células, el polipéptido de acuerdo con la invención, el(los) sustrato(s) aceptor(es), sustrato(s) donante(s) y, según proceda, otros ingredientes de la mezcla de reacción, incluidas otras glucosiltransferasas y enzimas accesorias se combinan mediante mezcla en un medio de reacción acuoso. Las enzimas se pueden utilizar libres en solución o se pueden unir o inmovilizar a un soporte tal como un polímero y los sustratos se pueden añadir al soporte. El soporte puede estar, por ejemplo, empaquetado en una columna.

Los sistemas que contienen células para la síntesis de oligosacáridos fucosilados pueden incluir células hospedadoras modificadas de manera recombinante.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:

- 10 a. cultivar, en condiciones adecuadas de nutrientes permisivas para la producción del oligosacárido fucosilado y permisivas para la expresión de un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa, una célula hospedadora tal como se ha descrito anteriormente;
- 15 b. proporcionar, simultáneamente o después del paso a., un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un oligosacárido, de manera que la alfa-1,3-fucosiltransferasa expresada en dicha célula hospedadora catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado;
- y
- c. aislar dicho oligosacárido fucosilado a partir de la célula hospedadora o el medio de su crecimiento.

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

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

El término «sustrato», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier material o combinaciones de diferentes materiales sobre los cuales puede actuar el polipéptido de la invención para dar lugar a oligosacáridos, (glico)proteínas o (glico)lípidos fucosilados.

Se permite que los sustratos reaccionen con el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa durante un tiempo suficiente y en condiciones suficientes para permitir la formación del producto enzimático. Estas condiciones variarán dependiendo de las cantidades y pureza del sustrato y enzima, independientemente de si el sistema es un sistema exento de células o con células. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente estas variables.

De acuerdo con un aspecto del método de acuerdo con la invención, se proporciona el sustrato donante en el paso b. al producirlo dentro de la célula hospedadora. De esta forma, una enzima que convierte, por ejemplo, fucosa, que se va a añadir a la célula hospedadora, en GDP-fucosa se expresa simultáneamente en la célula hospedadora. Esta enzima puede ser, por ejemplo, una fucosa-cinasa/fucosa-1-fosfato guanililtransferasa bifuncional, como Fkp de *Bacteroides fragilis*, o la combinación de una fucosa-cinasa independiente junto con una fucosa-1-fosfato guanililtransferasa independiente como las que hay conocidas de varias especies que incluyen *Homo sapiens*, *Sus scrofa* y *Rattus norvegicus*.

Como alternativa, en el paso b., el sustrato donante se puede añadir en medio de cultivo/células hospedadoras o puede ser producido por el propio metabolismo de las células.

En una realización adicional más, la invención se refiere a un método que comprende los siguientes pasos

- 45 a) cultivar células hospedadoras transformadas o transfectadas para que comprendan una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre i) la SEQ ID NO: 3 o 5 de la lista de secuencias adjunta, ii) secuencia de ácido nucleico complementaria a la SEQ ID NO: 3 o 5 y iii) secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en i) y ii) o sus hebras complementarias, en condiciones adecuadas de nutrientes de manera que la secuencia de ácido nucleico seleccionada entre i), ii) y iii) se exprese como un péptido que tiene actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa;
- 50 b) proporcionar, simultáneamente o después del paso a., un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un oligosacárido, de manera que la alfa-1,3-fucosiltransferasa expresada en dicha célula hospedadora catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado; y
- c) aislar dicho oligosacárido fucosilado a partir de la célula hospedadora o el medio de su crecimiento.

En los métodos de acuerdo con la invención, el péptido que se expresa en la célula hospedadora, muestra actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa y, por lo tanto, transfiere un residuo de fucosa de un donante, por ejemplo, guanosina-difosfato fucosa (GDP-fucosa), a un aceptor, el cual incluye oligosacáridos, (glico)proteínas y (glico)lípidos. De esta

manera, el sustrato aceptor así fucosilado se puede utilizar como un aditivo alimentario, para complementar alimentos para bebés, o como un compuesto terapéutica o farmacéuticamente activo. Con los métodos novedosos, se pueden proporcionar de manera fácil y eficaz productos fucosilados, sin necesitar procesos sintéticos complicados, caros y que requieren tiempo.

- 5 Tal como se utiliza en la presente, el término «aislar» se refiere a recolectar, recoger o separar del sistema de expresión génica el producto producido por la alfa-1,3-fucosiltransferasa de acuerdo con la invención.

En consecuencia, la invención también divulga oligosacáridos fucosilados obtenidos mediante los métodos de acuerdo con la invención, así como también el uso de un polinucleótido, el vector o el polipéptido tal como se ha descrito anteriormente para la producción de oligosacáridos fucosilados.

- 10 De acuerdo con otra realización más, la producción de dicho oligosacárido fucosilado se realiza mediante la (sobre)expresión heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,3-fucosiltransferasa.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen por lo general el mismo significado que les adjudica normalmente un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Por lo general, la nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos descritos anteriormente y a
15 continuación son aquellos conocidos y empleados normalmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Por lo general, las reacciones enzimáticas y los pasos de purificación se realizan de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

La invención también cubre fragmentos de las secuencias polinucleotídicas divulgadas en ella.

- 20 De la descripción de las realizaciones y los dibujos adjuntos se derivan más ventajas.

La presente solicitud divulga:

(1) Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por: a) las SEQ ID NOs: 3 o 5 de la lista de secuencias
25 adjuntas; b) una secuencia de ácido nucleico complementaria a las SEQ ID NOs: 3 o 5; c) secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus hebras complementarias.

(2) El polinucleótido aislado del apartado (1), constituido por las SEQ ID NOs: 3 o 5 que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa.

(3) Un vector, que contiene la secuencia de ácido nucleico del apartado (1) o (2) que codifica un polipéptido con
30 actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa, estando la secuencia de ácido nucleico ligada operablemente a las secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector.

(4) Un péptido aislado con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por: (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6;
35 b) una secuencia de aminoácido de una variante alélica de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicha variante alélica está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicho ortólogo está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; y (d) un fragmento de
40 una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicho fragmento comprende al menos 10 aminoácidos contiguos.

(5) La célula hospedadora que contiene el vector del apartado (3).

(6) La célula hospedadora del apartado (5), donde la célula hospedadora se selecciona a partir del grupo constituido por hongos, incluidas levaduras, y bacterias.

45 (7) La célula hospedadora del apartado (5) o (6), donde la célula hospedadora es una célula de *Escherichia coli*.

(8) La célula hospedadora de cualquiera de los apartados (5) a (7), donde el ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa se adapta para el uso de codones de la célula respectiva.

(9) El uso del polinucleótido de cualquiera de los apartados (1) o (2), o del vector del apartado (3), o del polipéptido del apartado (4), para la producción de un oligosacárido fucosilado.

(10) El uso del apartado (9), donde la producción de dicho oligosacárido fucosilado se realiza mediante la expresión heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,3-fucosiltransferasa.

(11) El uso del apartado (9) o (10), donde el oligosacárido fucosilado es 3-fucosillactosa.

(12) Un método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:

- 5 a. proporcionar el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa del apartado (4),
- b. poner en contacto el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa del paso a. con una mezcla que comprende un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido en condiciones en las que el polipéptido cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado.

(13) Un método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:

- a. cultivar, en condiciones adecuadas de nutrientes permisivas para la producción del oligosacárido fucosilado y permisivas para la expresión de un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa, la célula hospedadora de cualquiera de los apartados (5) a (8);
- 15 b. proporcionar, simultáneamente o después del paso a., un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido, con el fin de que el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado; y
- c. aislar dicho oligosacárido fucosilado a partir de la célula hospedadora o el medio de su crecimiento.

20 (14) El método del apartado (12) o (13), donde el sustrato donante es GDP-fucosa.

(15) El método de cualquiera de los apartados (12) a (14), donde la GDP-fucosa la proporciona una enzima expresada simultáneamente en la célula hospedadora o el metabolismo de la célula hospedadora.

(16) El oligosacárido fucosilado obtenido mediante el uso de cualquiera de los apartados (9) a (11) o mediante el método de cualquiera de los apartados (12) a (15).

25 En las figuras se ilustran varias realizaciones de la invención y se explican más detalladamente en la siguiente descripción. En las figuras:

La **Fig. 1** muestra la expresión de Amuc0760co a partir de pDEST14-amuc0760co en *Escherichia coli* JM109(DE3); se separaron 15 µg de proteína soluble a partir del extracto crudo en SDS-PAGE al 15% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie;

30 La **Fig. 2** muestra la detección de Amuc0760co con una etiqueta de His mediante inmunoelectrotransferencia;

La **Fig. 3** muestra el mapa vectorial de pDEST14-amuc0760co, es decir, el gen con codones optimizados *amuc0760co* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa Amuc0760co clonada en pDEST14 (Invitrogen) mediante la reacción Gateway (**A**); el mapa vectorial de pDEST14-fucT6, es decir, el gen *fucT6* de *Bacteroides fragilis* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa FucT6 clonada en pDEST14 (Invitrogen, Alemania) mediante la reacción Gateway y (**B**); y el mapa vectorial de pDEST14-fucT7, es decir, el gen *fucT7* de *Bacteroides fragilis* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa FucT7 clonada en pDEST14 (Invitrogen, Alemania) mediante la reacción Gateway (**C**).

La **Fig. 4** muestra el mapa vectorial de pACYC-amuc0760co, es decir, el gen con codones optimizados *amuc0760co* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa Amuc0760co clonada en pACYCDuet-1 (Novagen mediante NcoI / PstI) (**A**); el mapa vectorial de pACYC-fucT6, es decir, el gen con codones optimizados *fucT6* de *Bacteroides fragilis* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa FucT6 clonada en pACYCDuet-1 (Novagen, UK) mediante NcoI / BamHI (**B**); y el mapa vectorial de pACYC-fucT7, es decir, el gen con codones optimizados *fucT7* de *Bacteroides fragilis* que codifica la nueva alfa-1,3-fucosiltransferasa FucT7 clonada en pACYCDuet-1 (Novagen, UK) mediante NcoI / EcoRI (**C**).

45 La **Fig. 5** muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos del gen *amuc0760co* y la proteína Amuc0760co;

La **Fig. 6** muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos del gen *fucT6* y la proteína FucT6.

La **Fig. 7** muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos del gen *fucT7* y la proteína FucT7;

La **Fig. 8** muestra el análisis de la purificación de 3-fucosillactosa mediante cromatografía de permeación en gel BioGel P-2 utilizando cromatografía de capa fina con una fase móvil de butanol/acetona/ácido acético/agua

(35/35/7/23) y solución de tinción de difenilaminoanilina (2% de difenilamina, 2% de anilina, 10% de ácido fosfórico en metanol); y

La **Fig. 9** muestra el cromatograma de HPLC; separación mediante la columna Rezex RCM Ca²⁺ de Phenomenex con agua como eluyente (0.6 mL/min durante 30 minutos a 80 °C) y detección mediante el detector de índice de refracción (Shimadzu, Alemania) (**A**); y el cromatograma de HPLC; separación mediante la columna Dionex CarboPac PA1 con NaOH 50 mM como eluyente (1 mL/min durante 30 minutos a 30 °C) y detección mediante el detector electroquímico DECADE II (Antec Leyden, Países Bajos) (**B**).

Ejemplo

Clonación de los genes

Se optimizaron los codones del gen que codifica la fucosiltransferasa Amuc0760 y se sintetizaron mediante GenScript, Piscataway, Nueva Jersey (EE. UU.). Con dos secuencias flanqueantes se codifican los sitios attB para la clonación Gateway (5'-secuencia: GGGGACAAGTT-TGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC (SEQ ID NO: 7), 3'-secuencia: T-AGGACCCAGCTTTCTGTACAAAAGTGGTCCCC (SEQ ID NO: 8)) se clonó en pUC57 mediante GenScript. La transferencia Gateway en el vector pDEST14 (Invitrogen GmbH, Alemania) (remítase a la fig. 3A) se llevó a cabo según el manual proporcionado por el proveedor (Invitrogen GmbH, Alemania). El polinucleótido que codifica Amuc0760co con una etiqueta de His en el extremo N se amplificó a partir de pUC57-amuc0760co utilizando los cebadores GG-GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATACAACCATGGGCCATCA-CCATCATCACCACAAAACGCTGAAAATTAGCTTTC (SEQ ID NO: 9) y GGGGACC-ACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTC (SEQ ID NO: 10). El polinucleótido que codifica amuc0760co con una etiqueta de His en el extremo C se amplificó a partir de pUC57-amuc0760co utilizando los cebadores GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC (SEQ ID NO: 11) y GGGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC (SEQ ID NO: 12).

Los genes que codifican las fucosiltransferasas FucT6 y FucT7 se amplificaron a partir de ADN genómico de NCTC 9343 de *Bacteroides fragilis* con los cebadores GGGGACA-AGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATACAACCATGTGTGATTGCTTGTC-TATCATATTG (SEQ ID NO: 13)/ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAT-TTTCTATCAAACAATTGAGAATAATATTC (SEQ ID NO: 14) y GGGGACAAGTTTGT-ACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATACAACCATGGATATATTGATTCTTTTTTATA-ATACGATG (SEQ ID NO: 15)/ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATATC-CCTCCCAATTTTAGTTTCG (SEQ ID NO: 16), respectivamente, y también se clonó en pDEST14 utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen GmbH, Alemania) (remítase a la fig. 3B y 3C).

Expresión de fucosiltransferasas

Los genes *amuc0760co*, *fucT6* y *fucT7* se clonaron adicionalmente en el vector de expresión pACYCDuet-1 (Novagen, UK). Para la clonación de *amuc0760co* mediante restricción con NcoI / PstI y el posterior ligado se utilizaron los cebadores AGCTAGCCATGGGCAA-AACGCTGAAAATTAGCTTTCTG (SEQ ID NO: 17) y AGCTAGCTGCAGTTAGCGAC-GCAGGCGATTTTTC (SEQ ID NO: 18) (los sitios de restricción están subrayados) y el producto resultante se denominó *pACYC-amuc0760co* (remítase a la fig. 4A). Se clonó *fucT6* mediante NcoI / BamHI utilizando los cebadores GATCACCATGGGCTGTGATTGCTTGTCTATCATAT-TG (SEQ ID NO: 19) y GATCAGGATCCTTATTTTCTATCAAACAATTGAGAATAATA-TTC (SEQ ID NO: 20) (sitios de restricción subrayados) lo que dio como resultado *pACYC-fucT6* (remítase a la fig. 4B), y se clonó *fucT7* mediante NcoI / EcoRI utilizando los cebadores GATCACCATGGATATATT-GATTCTTTTTTATAATACGATGTGG (SEQ ID NO: 21) y GATCAGAATTTCTATATC-CCTCCCAATTTTAGTTTCGTG (SEQ ID NO: 22) (sitios de restricción subrayados) lo que dio como resultado *pACYC-fucT7* (remítase a la fig. 4C).

Se transformaron las cepas JM109(DE3) o BL21(DE3) $\Delta lacZ$ de *E. coli* con los plásmidos apropiados tal como se ha descrito anteriormente. Se inocularon 5 mL de medio 2YT mediante una sala de inoculación y se cultivaron a 37 °C y 180 rpm durante toda la noche. Se inocularon 400 mL de 2YT con 4 mL del cultivo de toda la noche y se cultivaron a 37 °C y 180 rpm hasta que se alcanzó una DO660 de 0.5. Se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 0.1 mM y se prolongó el cultivo a 28 °C y 180 rpm durante toda la noche. Se recolectaron las células y se resuspendieron en 4 v/p de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 + MgCl₂ 5 mM o, cuando se utilizaron para la purificación mediante la columna Ni Sepharose FF (HisPrep FF 16/10, GE Healthcare, Suecia), en 4 v/p de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 + NaCl 500 mM + imidazol 30 mM. Se añadió una cantidad de microesferas de vidrio que fue hasta seis veces el peso del sedimento celular y la suspensión celular se agitó en vórtex dos veces durante 5 minutos, mientras que en el periodo intermedio la suspensión celular se colocó en hielo durante 5 minutos. Después de la desorganización de la integridad física se retiraron los desechos celulares centrifugando durante 10 minutos a 15 000 x g. El sobrenadante resultante se utilizó para su análisis en SDS-PAGE o para purificación mediante Ni Sepharose FF.

Detección mediante inmunoelectrotransferencia

Se expresó Amuc0760co con una etiqueta de His tal como se ha descrito anteriormente. A partir del extracto celular crudo, se separaron 10 mg de proteína en un gel de SDS al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando un tanque Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Alemania) de acuerdo con el manual suministrado por el proveedor. Se detectó Amuc0760co con una etiqueta de His en la membrana utilizando el kit con anticuerpo con etiqueta de His conjugado con HRP (*His-Tag Antibody HRP Conjugate Kit*) (Novagen, UK) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor (remítase a la fig. 2).

Producción de compuestos fucosilados

Se transformaron células BL21(DE3) *lacZ* pDEST14-fkp pCOLA-lacY-fucP de *E. coli* con pACYC que portaba el gen de fucosiltransferasa apropiado. Se cultivaron las colonias en placas con 2YT con los antibióticos apropiados. De cada cepa se cultivaron 5 mL de los cultivos de toda la noche (2YT con antibióticos) y a partir de estos cultivos se inocularon 30 mL de medio mineral en cada caso hasta un 1%. Las células se cultivaron utilizando glicerol como fuente de carbono y a DO600 = 0.2 se indujeron con IPTG 0.1 mM y se añadieron lactosa 20 mM y fucosa 20 mM. La producción de 3-fucosillactosa se monitorizó mediante TLC y análisis por HPLC. La comparación de la cantidad de 3-fucosillactosa (3-FL) producida por la expresión de FutA a partir de *Helicobacter pylori* en comparación con la expresión de Amuc0760co a partir de *Akkermansia muciniphila* así como también FucT6 y FucT7 a partir de *Bacteroides fragilis* se muestra en la siguiente tabla 1:

Tabla 1: Comparación de la cantidad de 3-fucosillactosa obtenida utilizando alfa-1,3-fucosiltransferasa FutA de *Helicobacter pylori*, Amuc0760co de *Akkermansia muciniphila* y FucT6 y FucT7 de *Bacteroides fragilis*

Fucosiltransferasa	Producción de 3-FL [mM]
sin (control negativo)	0
FutA (<i>Helicobacter pylori</i>)	3.83
Amuc0760co (<i>Akkermansia muciniphila</i>)	5.39
FucT6 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	4.95
FucT7 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	6.89

Tal como se puede apreciar en la tabla 1, la cantidad del producto fucosilado 3-fucosillactosa fue significativamente más elevado cuando se utilizaron las alfa-1,3-fucosiltransferasas de acuerdo con la invención, es decir Amuc0760co de *Akkermansia muciniphila* y FucT6 y FucT7 de *Bacteroides fragilis*, en comparación con la alfa-1,3-fucosiltransferasa FutA de *Helicobacter pylori*, que es de vanguardia.

Purificación del producto de la fucosilación

Se produjo 3-fucosillactosa tal como se ha descrito anteriormente en varios pasos. El primer paso fue la purificación mediante adsorción sobre carbono activo. Se aplicó el sobrenadante del cultivo del paso de producción sobre un lecho de carbono activo. Se recogió el flujo que atravesó el lecho y se analizó pero no se detectó la presencia de 3-fucosillactosa. Para eliminar compuestos del medio unidos de manera no específica tales como, por ejemplo, sales y aminoácidos, se lavó el lecho con agua destilada (no 3-FL en el flujo que lo atravesó). A continuación, se eluyeron 3-FL y la lactosa y fucosa aún presentes con etanol al 96%. Posteriormente, se evaporó el etanol en un evaporador rotatorio y el residuo se filtró mediante un módulo de flujo cruzado de 10 kDa (Microdyn Nadir, Alemania). Las sales aún presentes se eliminaron mediante electrodiálisis y posteriormente las endotoxinas se eliminaron mediante filtración utilizando un módulo de flujo cruzado (Pall, Alemania). A continuación, se separó 3-FL de la lactosa y fucosa a escala de gramos utilizando material cromatográfico de permeación en gel Biogel P-2 (BioRad, Alemania) empaquetado en una columna de vidrio de 520 mm x 428 mm con una placa fritada. La purificación de 3-FL se monitorizó mediante cromatografía de capa fina (remítase a la fig. 8). Las fracciones que contenían únicamente 3-fucosillactosa se combinaron y liofilizaron.

Confirmación de la identidad del producto

La 3-fucosillactosa purificada producida utilizando las fucosiltransferasas presentadas en esta invención se analizó mediante 1H-RMN y espectrometría de masas. Los espectros resultantes fueron coherentes con los espectros esperados para 3-FL. Además de esto, se aplicaron diferentes métodos de HPLC para verificar la identidad de la 3-FL resultante. Un método fue la separación utilizando una columna Rezex RCM Ca²⁺ de Phenomenex con agua

como eluyente (0.6 mL/min durante 30 minutos a 80 °C) y detección mediante el detector de índice de refracción (Shimadzu, Alemania) (remítase a la fig. 9A). El otro método fue la separación mediante la columna Dionex CarboPac PA1 con NaOH 50 mM como eluyente (1 mL/min durante 35 minutos a 30 °C) y detección mediante el detector electroquímico DECADE II (Antec Leyden, Países Bajos) (remítase a la fig. 9B).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Jennewein Biotechnologie GmbH

<120> Fucosiltransferasas novedosas y sus aplicaciones

<130> 2827P103EP

5 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 999

< 212> ADN

10 < 213> *Akkermansia muciniphila*

<400> 1

```

atgaaaaacgc tghaaaattag ctttctgcaa agcaccoccg atttcggccg tgagggtatg      60
ctgcaactgc tghaaatctcg ctatcatgtg gttgaagatg atagtgattt tgattacctg      120
gtggcgacgc cgtgggttcta tghtaaccgt gaagcctttt acgatttcct ggaacgcgca      180
ccggggccata ttaccgtgat gtatggttgc cacgaagcga tcgccccgga ttttatgctg      240
ttcgattatt acattggcct ggacaccgtg ccgggtagcg atcgtaccgt taaactgccg      300
tatctgcgcc atcacctgga agaagtcat ggcggtaaag aaggcctgga tgcacatgcc      360
ctgctggcca gaaaaacggg tttttgtaac ttcactacg ccaatcgtaa atctcatccg      420
aaccgcgatg caatgtttca caaactgagt gcgtttcgtt tcgtgaatag cctgggcccg      480
catctgaaca ataccocggg cgatggtcac cgtgcggaag attggtatgc cagctctatt      540
cgcatgaaaa aaccgtacaa attttctatc gccttcgaaa acgcatggta cccgggttac      600
accagcgaaa aaatcgttac gtctatgctg gccggcacca ttccgatcta ttggggtaat      660
ccggatatta gccgtgaatt taacagtgcg agctttatca attgccatga ttttccgacg      720
ctggatgatg cggcggcgta tgtgaaaaaa gttgatgaag atgataacct gtggtgtgaa      780
attatgagcc gcccgtgaa aaccccgaa caggaagcac gttttctgga agaaaccgaa      840
cgcgaaaacgg cgaaactgta taaaatcttc gatcagagtc cggaagaagc ccgtcgcaaa      900
ggcgatggta cctgggtgag ctattaccag cgttttctga aacgtggtca tcgtatgcag      960
ctggcctggc gtcgcctgaa aaatcgctg cgtcgctaa      999
    
```

<210> 2

< 211> 332

15 < 212> PRT

< 213> *Akkermansia muciniphila*

<400> 2

```

Met Lys Thr Leu Lys Ile Ser Phe Leu Gln Ser Thr Pro Asp Phe Gly
1           5           10           15
    
```

ES 2 663 627 T3

Arg Glu Gly Met Leu Gln Leu Leu Lys Ser Arg Tyr His Val Val Glu
 20 25 30

Asp Asp Ser Asp Phe Asp Tyr Leu Val Ala Thr Pro Trp Phe Tyr Val
 35 40 45

Asn Arg Glu Ala Phe Tyr Asp Phe Leu Glu Arg Ala Pro Gly His Ile
 50 55 60

Thr Val Met Tyr Gly Cys His Glu Ala Ile Ala Pro Asp Phe Met Leu
 65 70 75 80

Phe Asp Tyr Tyr Ile Gly Leu Asp Thr Val Pro Gly Ser Asp Arg Thr
 85 90 95

Val Lys Leu Pro Tyr Leu Arg His His Leu Glu Glu Val His Gly Gly
 100 105 110

Lys Glu Gly Leu Asp Ala His Ala Leu Leu Ala Ser Lys Thr Gly Phe
 115 120 125

Cys Asn Phe Ile Tyr Ala Asn Arg Lys Ser His Pro Asn Arg Asp Ala
 130 135 140

Met Phe His Lys Leu Ser Ala Phe Arg Phe Val Asn Ser Leu Gly Pro
 145 150 155 160

His Leu Asn Asn Thr Pro Gly Asp Gly His Arg Ala Glu Asp Trp Tyr
 165 170 175

Ala Ser Ser Ile Arg Met Lys Lys Pro Tyr Lys Phe Ser Ile Ala Phe
 180 185 190

Glu Asn Ala Trp Tyr Pro Gly Tyr Thr Ser Glu Lys Ile Val Thr Ser
 195 200 205

Met Leu Ala Gly Thr Ile Pro Ile Tyr Trp Gly Asn Pro Asp Ile Ser
 210 215 220

Arg Glu Phe Asn Ser Ala Ser Phe Ile Asn Cys His Asp Phe Pro Thr
 225 230 235 240

Leu Asp Asp Ala Ala Ala Tyr Val Lys Lys Val Asp Glu Asp Asp Asn
 245 250 255

Leu Trp Cys Glu Ile Met Ser Arg Pro Trp Lys Thr Pro Glu Gln Glu
 260 265 270

ES 2 663 627 T3

Ala Arg Phe Leu Glu Glu Thr Glu Arg Glu Thr Ala Lys Leu Tyr Lys
 275 280 285

Ile Phe Asp Gln Ser Pro Glu Glu Ala Arg Arg Lys Gly Asp Gly Thr
 290 295 300

Trp Val Ser Tyr Tyr Gln Arg Phe Leu Lys Arg Gly His Arg Met Gln
 305 310 315 320

Leu Ala Trp Arg Arg Leu Lys Asn Arg Leu Arg Arg
 325 330

<210> 3

< 211> 996

< 212> ADN

5 < 213> *Bacteroides fragilis*

<400> 3

atgtgtgatt gcttgtctat catattgta gtcaaatga aaaagattta tttgaaattt 60
 gttgattttt gggatggatt tgatactatt tctaacttta ttgtggatgc tttgtccatt 120
 caatacgaag tagtactatc taatgagcca gattatttat tctattcatg ttttggaaacg 180
 tcacatttag aatatgattg tataaaaatc atgtttatag gtgaaaatat agttcctgat 240
 tttaacgttt gtgattatgc cataggtttt aattatattg attttgggga ccgttacttg 300
 aggttgccct tatatgctat atatgatgga ttttcaaact tgcagaataa aaagattgat 360
 gtaaataaag ctttagaccg taaattttgt agtattgttg tttcaaataa taaatgggca 420
 gatcctattc gtgagacttt ctttaaatta ctatctagtt ataagaaagt agactctggt 480
 ggaagagctt ggaataatat aggagacct gttgataata aattggattt tattagccaa 540
 tataagttta atattgcttt tgaaaatagt aggttactgg gatatacaac agaaaaata 600
 atggaaccta tgcaggtgaa ttctattcca gtatattggg gaaatccttt ggttggtaaa 660
 gattttaatg tggactcctt tgtaaatgct catgattttg attctttaga aagattagtt 720
 gagtatatta tagaattgga ttcttcaaag gataaatatc tggaaatggt ggaaaaacct 780
 tggcttctcg ataagacata tttggattgg aaacaattgc tgttaaattt tattaataat 840
 attatgatga aatcatataa ggatgcgaag tatttggtta attatggtca tgctggaaag 900
 tatagaaatg aacaacgctt ttgggggaga tgtgaacgta aatttaaact tcaaagaatt 960
 attgaatatt attctcaatt gtttgataga aaataa 996

<210> 4

< 211> 331

10 < 212> PRT

< 213> *Bacteroides fragilis*

<400> 4

ES 2 663 627 T3

Met Cys Asp Cys Leu Ser Ile Ile Leu Leu Val Lys Met Lys Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Leu Lys Phe Val Asp Phe Trp Asp Gly Phe Asp Thr Ile Ser Asn
 20 25 30

Phe Ile Val Asp Ala Leu Ser Ile Gln Tyr Glu Val Val Leu Ser Asn
 35 40 45

Glu Pro Asp Tyr Leu Phe Tyr Ser Cys Phe Gly Thr Ser His Leu Glu
 50 55 60

Tyr Asp Cys Ile Lys Ile Met Phe Ile Gly Glu Asn Ile Val Pro Asp
 65 70 75 80

Phe Asn Val Cys Asp Tyr Ala Ile Gly Phe Asn Tyr Ile Asp Phe Gly
 85 90 95

Asp Arg Tyr Leu Arg Leu Pro Leu Tyr Ala Ile Tyr Asp Gly Phe Ser
 100 105 110

Asn Leu Gln Asn Lys Lys Ile Asp Val Asn Lys Ala Leu Asp Arg Lys
 115 120 125

Phe Cys Ser Ile Val Val Ser Asn Asn Lys Trp Ala Asp Pro Ile Arg
 130 135 140

Glu Thr Phe Phe Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Lys Lys Val Asp Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Ala Trp Asn Asn Ile Gly Gly Pro Val Asp Asn Lys Leu Asp
 165 170 175

Phe Ile Ser Gln Tyr Lys Phe Asn Ile Ala Phe Glu Asn Ser Arg Val
 180 185 190

Leu Gly Tyr Thr Thr Glu Lys Ile Met Glu Pro Met Gln Val Asn Ser
 195 200 205

Ile Pro Val Tyr Trp Gly Asn Pro Leu Val Gly Lys Asp Phe Asn Val
 210 215 220

Asp Ser Phe Val Asn Ala His Asp Phe Asp Ser Leu Glu Arg Leu Val
 225 230 235 240

ES 2 663 627 T3

Glu Tyr Ile Ile Glu Leu Asp Ser Ser Lys Asp Lys Tyr Leu Glu Met
 245 250 255

Leu Glu Lys Pro Trp Leu Leu Asp Lys Thr Tyr Leu Asp Trp Lys Gln
 260 265 270

Leu Leu Leu Asn Phe Ile Asn Asn Ile Met Met Lys Ser Tyr Lys Asp
 275 280 285

Ala Lys Tyr Leu Val Asn Tyr Gly His Ala Gly Lys Tyr Arg Asn Glu
 290 295 300

Gln Arg Phe Trp Gly Arg Cys Glu Arg Lys Phe Lys Leu Gln Arg Ile
 305 310 315 320

Ile Glu Tyr Tyr Ser Gln Leu Phe Asp Arg Lys
 325 330

<210> 5

< 211> 891

< 212> ADN

5 < 213> *Bacteroides fragilis*

<400> 5

atggatatat tgattctttt ttataatac agtggggat ttccactcga gttccgaaag 60
 gaagatttac ctgggggctg tgtgataacg actgatcgaa acctcattgc aaaggcggat 120
 gctgtggttt tccatttgcc cgatttgctt tccgtgatgg aggatgaaat cgataagcgg 180
 gaaggacagc tttgggtggg atggagtctg gaatgtgaag agaattatag ttggacgaag 240
 gatcccagat tcagagagag ttttgactta tggatggggt atcatcagga ggatgatatt 300
 gtgtatcctt attatggacc ggattatggg aagatgctgg ttacggcacg gagggaaaag 360
 ccttataaga agaaggcatg tatgtttatt tcgagtgata tgaaccggag tcatcgacaa 420
 gagtatctta aggaattgat gcagtatacc gacatcgatt cgtatgggaa actataccgt 480
 aattgtgaat tacctgttga ggatcgggga cgggatacac ttcttagtgt gatcggggat 540
 tatcagtttg tgataagttt tgagaatcgc atagggagg attatgtgac agaaaagttt 600
 ttcaatcctt tgttggccgg tactgttccg gtctatctgg gagctcccaa tattcgggaa 660
 tttgctccgg gagaaaattg ttttctggat atttgtactt tcgattctcc cgagggagta 720
 gccgctttta tgaatcaatg ctatgatgac gaggcattgt atgaacgttt ttatgcatgg 780
 aggaaacggc ctttattatt gtcgtttaca aaaaagttag agcaagtccg gagcaatccg 840
 ttaatcaggc tttgccaaaa aatacacgaa ctaaattgg gagggatatg a 891

<210> 6

< 211> 295

10 < 212> PRT

< 213> *Bacteroides fragilis*

ES 2 663 627 T3

<400> 6

Met Asp Ile Leu Ile Leu Phe Tyr Asn Thr Met Trp Gly Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Glu Phe Arg Lys Glu Asp Leu Pro Gly Gly Cys Val Ile Thr Thr Asp
 20 25 30

Arg Asn Leu Ile Ala Lys Ala Asp Ala Val Val Phe His Leu Pro Asp
 35 40 45

Leu Pro Ser Val Met Glu Asp Glu Ile Asp Lys Arg Glu Gly Gln Leu
 50 55 60

Trp Val Gly Trp Ser Leu Glu Cys Glu Glu Asn Tyr Ser Trp Thr Lys
 65 70 75 80

Asp Pro Glu Phe Arg Glu Ser Phe Asp Leu Trp Met Gly Tyr His Gln
 85 90 95

Glu Asp Asp Ile Val Tyr Pro Tyr Tyr Gly Pro Asp Tyr Gly Lys Met
 100 105 110

Leu Val Thr Ala Arg Arg Glu Lys Pro Tyr Lys Lys Lys Ala Cys Met
 115 120 125

Phe Ile Ser Ser Asp Met Asn Arg Ser His Arg Gln Glu Tyr Leu Lys
 130 135 140

Glu Leu Met Gln Tyr Thr Asp Ile Asp Ser Tyr Gly Lys Leu Tyr Arg
 145 150 155 160

Asn Cys Glu Leu Pro Val Glu Asp Arg Gly Arg Asp Thr Leu Leu Ser
 165 170 175

Val Ile Gly Asp Tyr Gln Phe Val Ile Ser Phe Glu Asn Ala Ile Gly
 180 185 190

Lys Asp Tyr Val Thr Glu Lys Phe Phe Asn Pro Leu Leu Ala Gly Thr
 195 200 205

Val Pro Val Tyr Leu Gly Ala Pro Asn Ile Arg Glu Phe Ala Pro Gly
 210 215 220

Glu Asn Cys Phe Leu Asp Ile Cys Thr Phe Asp Ser Pro Glu Gly Val
 225 230 235 240

ES 2 663 627 T3

Ala Ala Phe Met Asn Gln Cys Tyr Asp Asp Glu Ala Leu Tyr Glu Arg
 245 250 255

Phe Tyr Ala Trp Arg Lys Arg Pro Leu Leu Leu Ser Phe Thr Lys Lys
 260 265 270

Leu Glu Gln Val Arg Ser Asn Pro Leu Ile Arg Leu Cys Gln Lys Ile
 275 280 285

His Glu Leu Lys Leu Gly Gly
 290 295

<210> 7

< 211> 46

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 7

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaacc 46

10 <210> 8

< 211> 33

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> Cebador

<400> 8

taggacccag ctttcttgta caaagtggtc ccc 33

<210> 9

< 211> 92

20 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 9

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat acaaccatgg gccatcacca 60

25 tcatcaccac aaaacgctga aaattagctt tc 92

<210> 10

< 211> 30

< 212> ADN

ES 2 663 627 T3

< 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
<400> 10
5 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc 30
<210> 11
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Artificial
10 <220>
< 223> Cebador
<400> 11
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt c 31
<210> 12
15 < 211> 30
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
20 <400> 12
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc 30
<210> 13
< 211> 73
< 212> ADN
25 < 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
<400> 13
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat acaacctatgt gtgattgctt 60
gtctatcata ttg 73
30 <210> 14
< 211> 63
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
35 < 223> Cebador

ES 2 663 627 T3

<400> 14
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ttattttcta tcaaacaatt gagaataata 60
 ttc 63
 <210> 15
 <211> 79
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat acaaccatgg atatattgat 60
 10 tcttttttat aatacgatg 79
 <210> 16
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catatccctc ccaatttag ttcg 54
 <210> 17
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 17
 agctagccat gggcaaaacg ctgaaaatta gctttctg 38
 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 agctagctgc agttagcgac gcaggcgatt ttc 34

<210> 19
< 211> 37
< 212> ADN
< 213> Artificial
5 <220>
< 223> Cebador
<400> 19
gatcaccatg ggctgtgatt gcttctat catattg 37
<210> 20
10 < 211> 44
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
15 <400> 20
gatcaggatc cttatttct atcaacaat tgagaataat attc 44
<210> 21
< 211> 43
< 212> ADN
20 < 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
<400> 21
gatcaccatg gatattga ttctttta taatcagtg tgg 43
25 <210> 22
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
30 < 223> Cebador
<400> 22
gatcagaatt ctcatatccc tccaatttt agttcgtg 38

REIVINDICACIONES

1. Célula hospedadora, transformada o transfectada con una secuencia polinucleotídica exógena, donde la secuencia polinucleotídica está contenida en un vector, y donde la secuencia polinucleotídica se selecciona a partir del grupo constituido por a) las SEQ ID NOs: 3 y 5 de la lista de secuencias adjunta; b) una secuencia de ácido nucleico complementaria a las SEQ ID NOs: 3 o 5; c) secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus hebras complementarias, estando ligada operablemente la secuencia polinucleotídica a secuencias de control reconocidas por la célula hospedadora transformada con el vector, donde la secuencia polinucleotídica codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa, y donde la célula hospedadora se selecciona a partir del grupo constituido por hongos, incluidas levaduras, y bacterias.
2. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la célula hospedadora es una célula de *Escherichia coli*.
3. Célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que el ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa se adapta para el uso de codones de la célula respectiva.
4. Uso de un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa y que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por a) las SEQ ID NOs: 3 o 5 de la lista de secuencia adjuntas; b) una secuencia de ácido nucleico complementaria a las SEQ ID NOs: 3 o 5; c) secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico definidas en a) y b) o sus hebras complementarias; o del vector tal como se reivindica en la reivindicación 1, o de un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6; b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6, donde dicha variante alélica está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; y c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, donde dicho ortólogo está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5, para la producción de un oligosacárido fucosilado.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la producción de dicho oligosacárido fucosilado se realiza mediante la expresión heteróloga u homóloga del polinucleótido que codifica la alfa-1,3-fucosiltransferasa.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado por que el oligosacárido fucosilado es 3-fucosillactosa.
7. Método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:
- proporcionar un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6; b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6, donde dicha variante alélica está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5; y c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 4 o 6, donde dicho ortólogo está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la hebra opuesta de una molécula de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5,
 - poner en contacto el polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa del paso a. con una mezcla que comprende un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido en condiciones en las que el polipéptido cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado.
8. Método para producir oligosacáridos fucosilados, que comprende los pasos de:
- cultivar, en condiciones adecuadas de nutrientes permisivas para la producción del oligosacárido fucosilado y permisivas para la expresión de un polipéptido con actividad alfa-1,3-fucosiltransferasa, una célula hospedadora tal como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 3;
 - proporcionar, simultáneamente o después del paso a., un sustrato donante que comprende un residuo de fucosa y un sustrato aceptor que comprende un mono- u oligosacárido, con el fin de que el polipéptido alfa-1,3-fucosiltransferasa catalice la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante al sustrato aceptor, para producir de esta manera un oligosacárido fucosilado; y
 - aislar dicho oligosacárido fucosilado a partir de la célula hospedadora o el medio de su crecimiento.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que el sustrato donante es GDP-fucosa.

10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que la GDP-fucosa la proporciona una enzima expresada simultáneamente en la célula hospedadora o el metabolismo de la célula hospedadora.

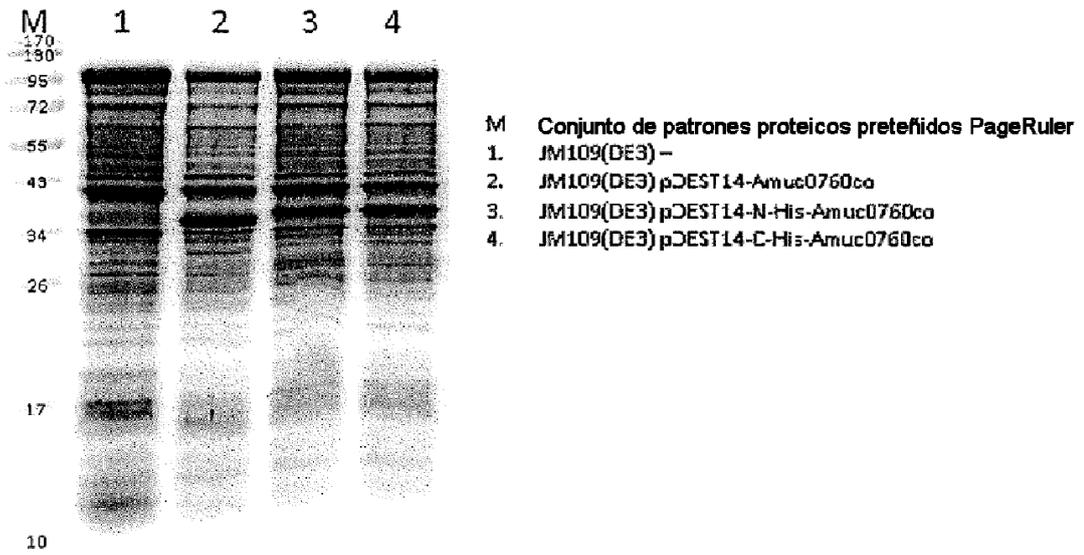


Fig. 1

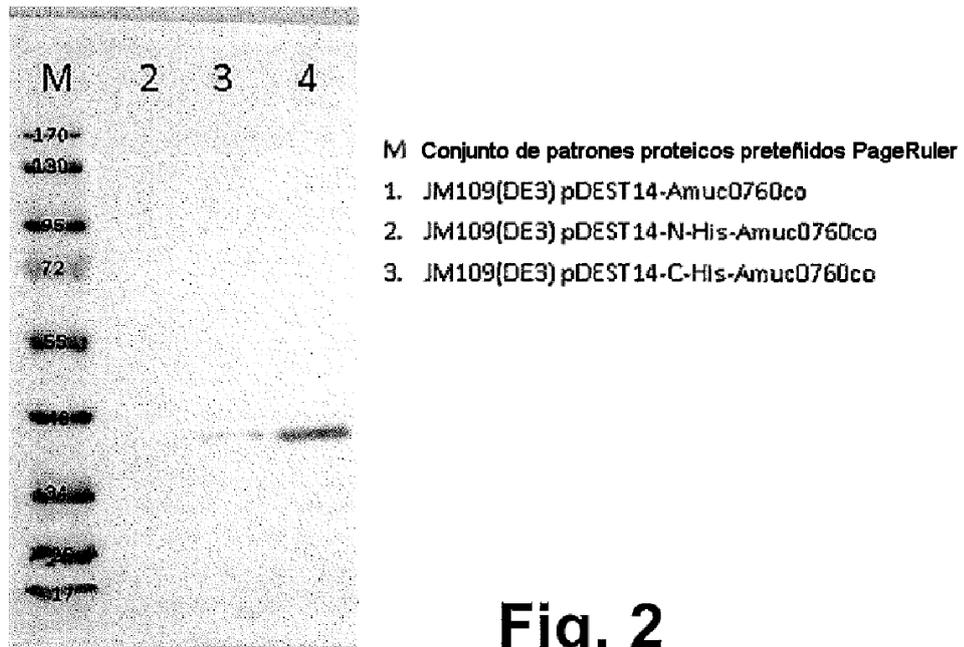


Fig. 2

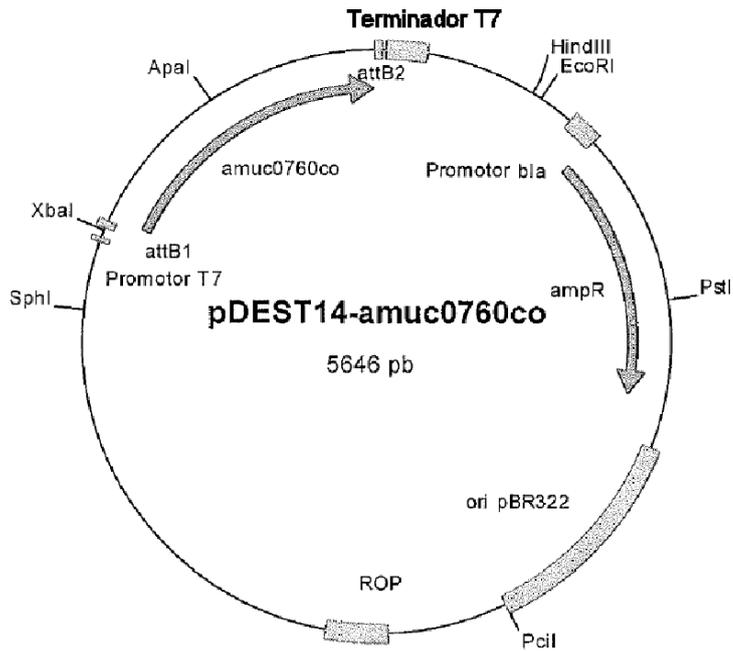


Fig. 3A

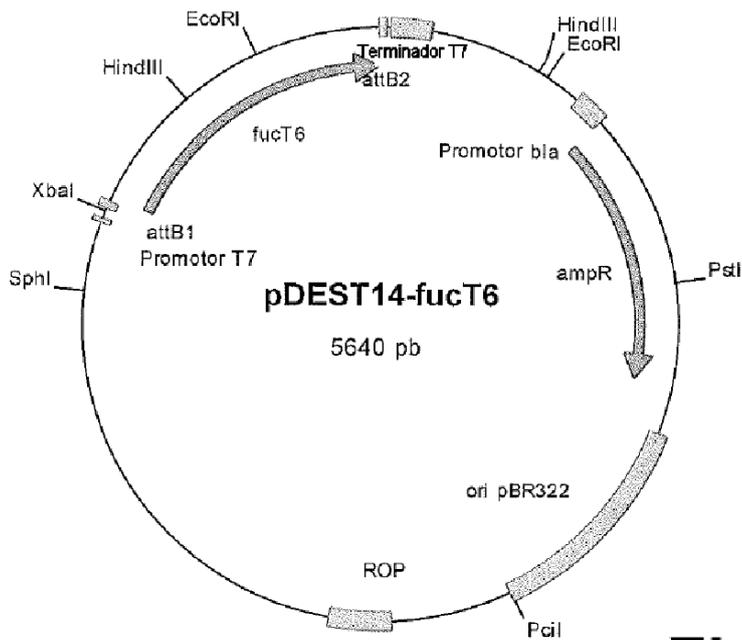


Fig. 3B

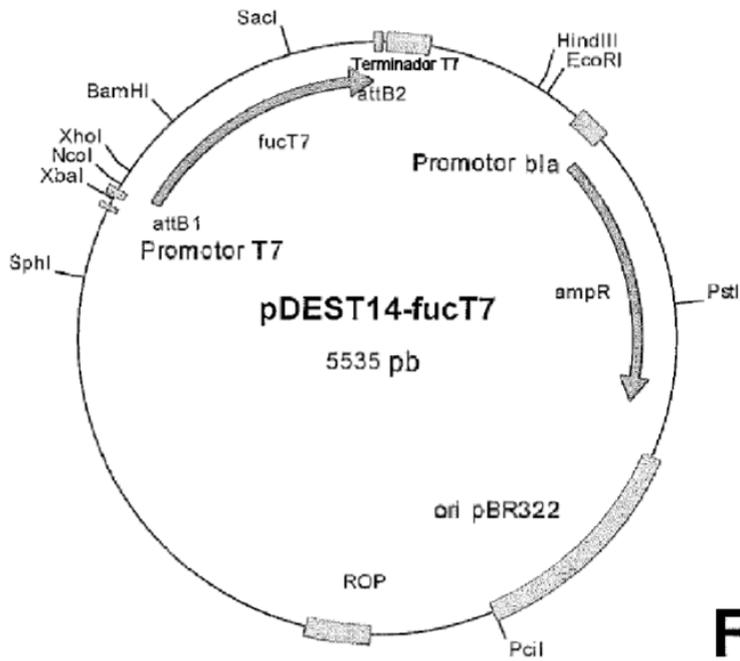


Fig. 3C

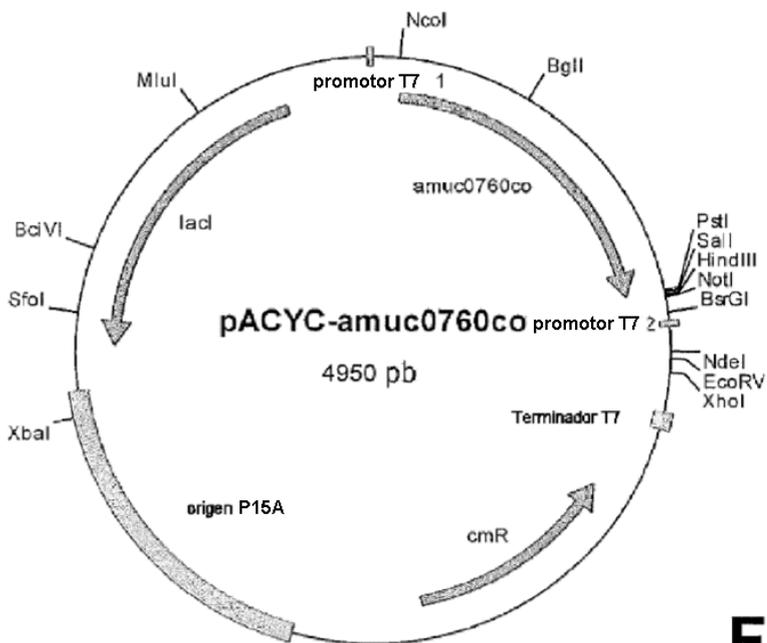


Fig. 4A

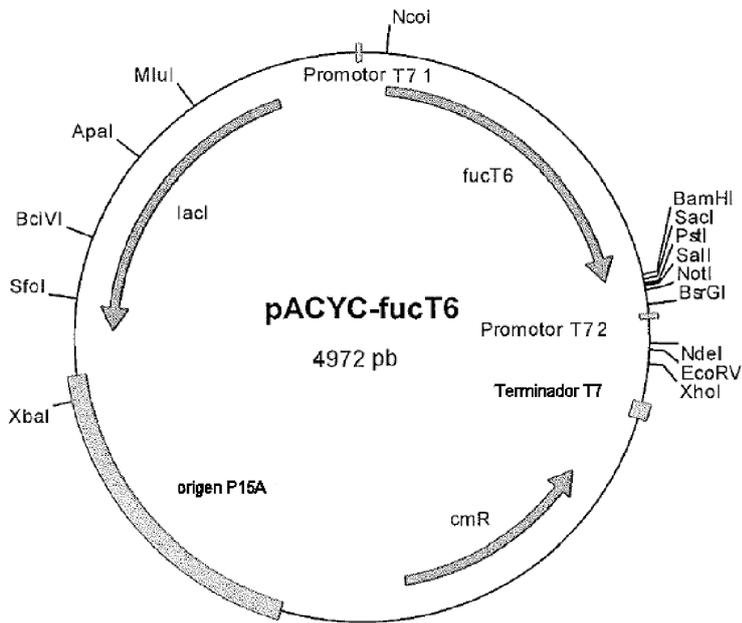


Fig. 4B

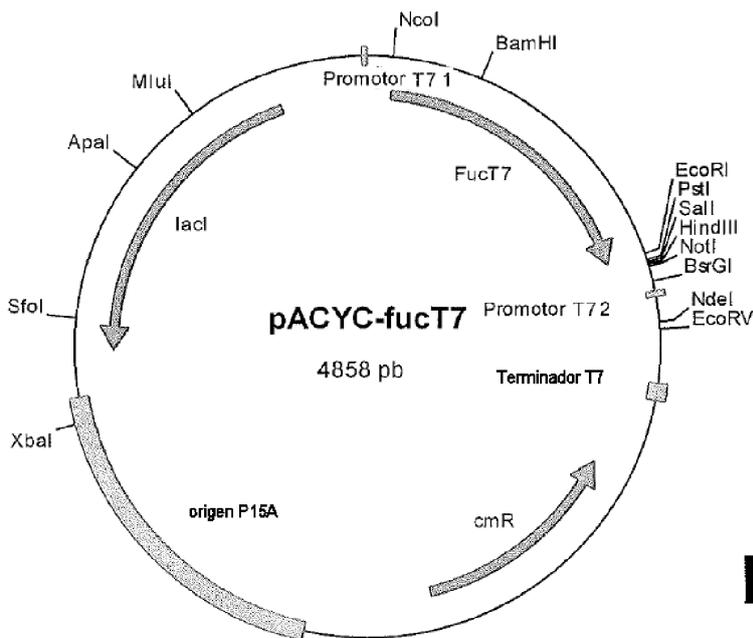


Fig. 4C

Secuencia del gen *amu0760co*:

ATGAAAACGCTGAAAATTAGCTTTCTGCAAAGCACCCCGGATTTCCGGCCGTGAGGGTATGCTGCAACTGCTGA
AATCTCGCTATCATGTGGTTGAAGATGATAGTGATTTTGATTACCTGGTGGCGACGCCGTGGTTCTATGTAAAC
CGTGAAGCCTTTTACGATTTCTGGAACGCGCACCCGGGCCATATTACCGTGATGTATGGTTGCCACGAAGCGA
TCGCCCCGGATTTTATGCTGTTGATTATTACATTGGCCTGGACACCGTGCCGGGTAGCGATCGTACCGTTAAA
CTGCCGTATCTGCGCCATCACCTGGAAGAAGTTCATGGCGGTAAAGAAGGCCTGGATGCACATGCCCTGCTGG
CCAGCAAAACGGGTTTTTTGTAACCTCATCTACGCCAATCGTAAATCTCATCCGAACCGCGATGCAATGTTTCAC
AAACTGAGTGC GTTTTCGTTTCGTGAATAGCCTGGGCCCGCATCTGAACAATACCCCGGGCGATGGTCACCGTG
CGGAAGATTGGTATGCCAGCTCTATTCGCATGAAAAAACCGTACAAATTTTCTATCGCCTTCGAAAACGCATGG
TACCCGGGTTACACCAGCGAAAAAATCGTTACGTCTATGCTGGCCGGCACCATTCGGATCTATTGGGGTAATCC
GGATATTAGCCGTGAATTTAACAGTGCAGCTTTATCAATTGCCATGATTTTCCGACGCTGGATGATGCGGGCG
GCGTATGTGAAAAAAGTTGATGAAGATGATAACCTGTGGTGTGAAATTATGAGCCGCCCGTGGAAAACCCCG
GAACAGGAAGCACGTTTTCTGGAAGAAACCGAACGCGAAACGGCGAAACTGTATAAAATCTTCGATCAGAGT
CCGGAAGAAGCCCGTCGCAAAGGCGATGGTACCTGGGTGAGCTATTACCAGCGTTTTCTGAAACGTGGTCATC
GTATGCAGCTGGCCTGGCGTCGCCTGAAAAATCGCCTGCGTCGCTAA

Secuencia de la proteína Amuc0760co:

MKTLKISFLQSTPDFGREGMLQLLKSRYHVVEDDSDFDYLVATPWFYVNRFAFYDFLERAPGHITVMYGCHEAIAP
DFMLFDYYIGLDTVPGSDRTVKLPYLRHHLEEVHGGKEGLDAHALLASKTGFCNFIYANRKSHPNRDAMFHKLSAFR
FVNSLGPHLNNTPGDGHRAEDWYASSIRMKKPYKFSIAFENAWYPGYTSEKIVTSMLAGTIPIYWGNPDISREFNSA
SFINCHDFPTLDDAAAYVKKVDEDDNLWCEIMSRPWKTPEQEARFLEETERETAKLYKIFDQSPEEARRKGDGTWV
SYYQRFKRGHRMQLAWRRLKNRLRR

Fig. 5

Secuencia del gen *fucT6*:

ATGTGTGATTGCTTGTCTATCATATTGTTAGTCAAATGAAAAAGATTATTTGAAATTTGTTGATTTTTGGGAT
GGATTTGATACTATTTCTAACTTTATTGTGGATGCTTTGTCCATTCAATACGAAGTAGTACTATCTAATGAGCCA
GATTATTTATTCTATTCATGTTTTGGAACGTCACATTTAGAATATGATTGTATAAAAATCATGTTTTATAGGTGAA
AATATAGTTCCTGATTTTAACGTTTGTGATTATGCCATAGGTTTTAATTATATTGATTTTGGGGACCGTTACTTG
AGGTTGCCTTTATATGCTATATATGATGGATTTTCAACTTGCAGAATAAAAAGATTGATGTAAATAAAGCTTT
AGACCGTAAATTTGTAGTATTGTTGTTTCAAATAATAAATGGGCAGATCCTATTCGTGAGACTTTCTTTAAATT
ACTATCTAGTTATAAGAAAGTAGACTCTGGTGGAAAGAGCTTGAATAAATATAGGAGGACCTGTTGATAATAAA
TTGGATTTTATTAGCCAATATAAGTTTAATATTGCTTTTAAAATAGTAGGGTACTGGGATATACAACAGAAAA
AATAATGGAACCTATGCAGGTGAATTCTATTCCAGTATATTGGGGAAATCCTTTGGTTGGTAAAGATTTTAATG
TGGACTCCTTTGTAATGCTCATGATTTTGAATCTTTAGAAAAGATTAGTTGAGTATATTATAGAATTGGATTCTT
CAAAGGATAAATATCTGGAAATGTTGGAAAAACCTTGGCTTCTCGATAAGACATATTTGGATTGGAAACAATT
GCTGTTAAATTTTATTAATAATATTATGATGAAATCATATAAGGATGCGAAGTATTTGGTTAATTATGGTCATGC
TGGAAAGTATAGAAATGAACAACGCTTTTGGGGGAGATGTGAACGTAAATTTAACTTCAAAGAATTATTGAA
TATTATTCTCAATTGTTTATAGAAAATAA

Secuencia de la proteína FucT6:

MCDCLSIILLVKMKKIYLFVDFWDFDTSINFIVDALSIQYEVVLSNEPDYLFYSCFGTSHLEYDCIKIMFIGENIVPDF
NVCDYAIGFNYIDFGDRYLRLPLYAIYDGFNSLQNKKIDVNKALDRKFCISIVVSNKRWADPIRETFKLLSSYKKVDSG
GRAWNNIGGPVDNKLDFISQYKFNIAFENSRLVGYTTEKIMEPMQVNSIPVYWGPNPLVGKDFNVDSFVNAHDFDS
LERLVEYIIELDSSKDKYLEMLEKPWLLDKTYLDWKQLLNFINNIMMKSYPDALVNYGHAGKYRNEQRFWGRG
ERKFKLQRIIEYYSQLFDRK

Fig. 6

Secuencia del gen *fucT7*:

ATGGATATATTGATTCTTTTTATAATACGATGTGGGGATTTCCACTCGAGTCCGAAAGGAAGATTTACCTGG
GGGCTGTGTGATAACGACTGATCGAAACCTCATTGCAAAGGCCGATGCTGTGGTTTTCCATTTGCCCATTGTC
CTTCGGTGATGGAGGATGAAATCGATAAGCGGGAAGGACAGCTTTGGGTGGGATGGAGTCTGGAATGTGAA
GAGAATTATAGTTGGACGAAGGATCCCGAGTTCAGAGAGAGTTTTGACTTATGGATGGGGTATCATCAGGAG
GATGATATTGTGTATCCTTATTATGGACCGGATTATGGGAAGATGCTGGTTACGGCACGGAGGGAAAAGCCTT
ATAAGAAGAAGGCATGTATGTTTATTTTCGAGTGATATGAACCGGAGTCATCGACAAGAGTATCTTAAGGAATT
GATGCAGTATACCGACATCGATTCGTATGGGAACTATAACCGTAATTGTGAATTACCTGTTGAGGATCGGGGA
CGGGATACACTTCTTAGTGTGATCGGGGATTATCAGTTTGTGATAAGTTTTGAGAATGCGATAGGGAAAGGATT
ATGTGACAGAAAAGTTTTTCAATCCTTTGTTGGCCGTAAGTGTCCGGTCTATCTGGGAGCTCCCAATATTCGG
GAATTTGCTCCGGGAGAAAATTGTTTTCTGGATATTTGTAATTTTCGATTCTCCCGAGGGAGTAGCCGCTTTTAT
GAATCAATGCTATGATGACGAGGCATTGTATGAACGTTTTTATGCATGGAGGAAACGGCCTTTATTATTGTCGT
TTACAAAAAAGTTAGAGCAAGTCCGGAGCAATCCGTTAATCAGGCTTTGCCAAAAAATACACGAACTAAAATT
GGGAGGGATATGA

Secuencia de la proteína FucT7:

MDILILFYNTMWGFPLEFRKEDLPGGCVITTDNRNLIKADAVVFHLPDLPSVMEDEIDKREGQLWVGWSLECEENY
SWTKDPEFRESFDLWMGYHQEDDIVYPYGPDYGKMLVTARREKPYKKKACMFISSDMNRSRQEYLKELMQYT
DIDSYGKLYRNCELPVEDRGRDITLLSVIGDYQFVISFENAIGKDYVTEKFFNPLLAGTVPVYLGAPNIREFAPGENCFL
DICTFDSPEGVAAFMNQCYDDEALYERFYAWRKRPLLSFTKKLEQVRSNPLIRLCQKIHELKGGI

Fig. 7

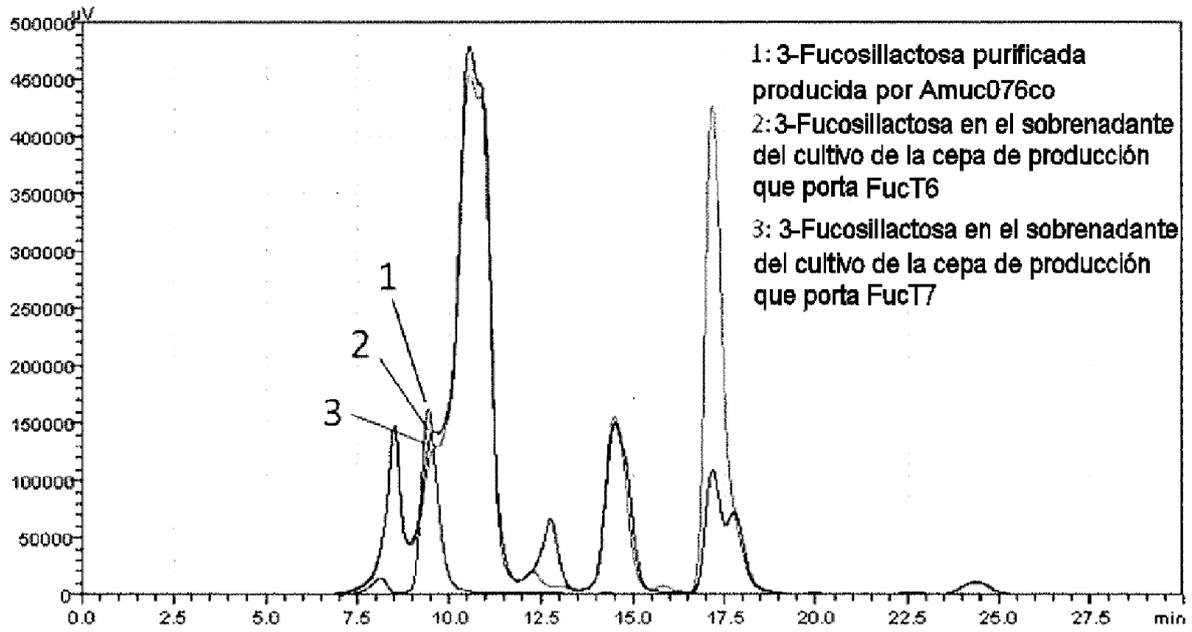


Fig. 9A

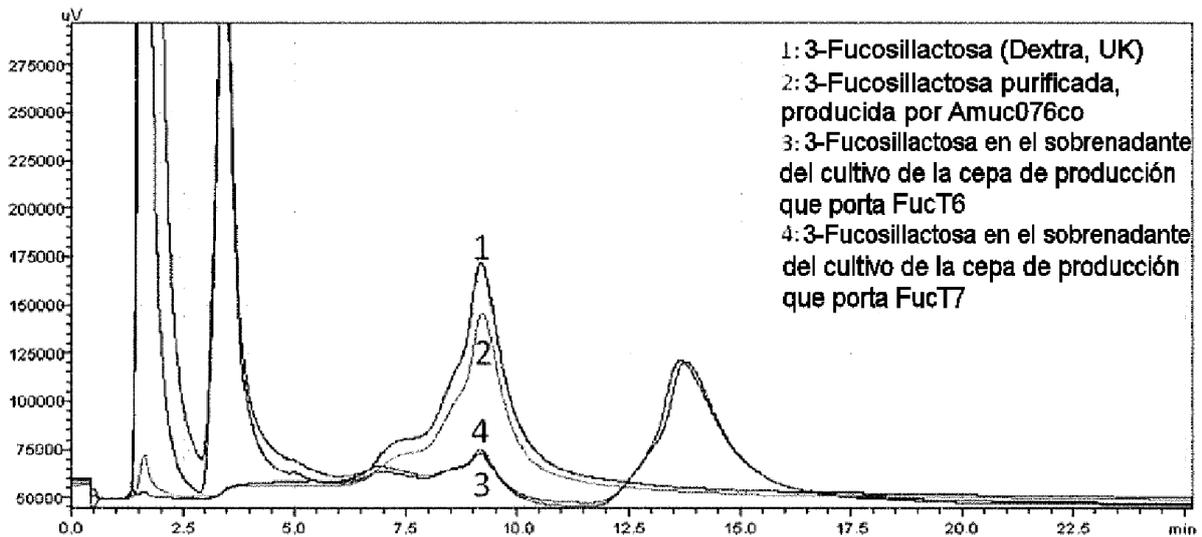


Fig. 9B