

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 132**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2015 PCT/IB2015/058197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2015 E 15853319 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 3209772**

54 Título: **Fucosidasa mutada**

30 Prioridad:

24.10.2014 EP 14190374

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

11.04.2025

73 Titular/es:

**GLYCOM A/S (100.00%)
Kogle Allé 4
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**CHAMPION, ELISE;
VOGEL, ANDREAS;
BARTSCH, SEBASTIAN y
DEKANY, GYULA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 3 013 132 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

Fucosidasa mutada

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una α 1-3/4 transfucosidasa que tiene una actividad sintética de transfucosidasa aumentada y/o una actividad hidrolítica disminuida, y una termoestabilidad aumentada.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha aislado una α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (SEQ ID No. 18 del documento US 8361756, Sela et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 18964 (2008), Sela et al. Appl. Environ. Microbiol. 78, 795 (2012); para su estructura cristalina, véase Sakurama et al. J. Biol. Chem. 287, 16709 (2012)). Esta fucosidasa está codificada por una secuencia de ADN de 1437 nucleótidos como se expone en la patente '756, que codifica una secuencia de 478 aminoácidos. Según la patente '756, los oligosacáridos de la leche humana ("HMO") se pueden sintetizar poniendo en contacto un precursor que contiene oligosacáridos con esta fucosidasa de tipo salvaje, y aislando luego un precursor que contiene oligosacáridos modificados. La proteína según SEQ ID No. 18 del documento US 8361756 se denomina SEQ ID No. 1 en la presente solicitud.

El documento WO 2013/190531 se refiere a métodos para obtener mezclas de oligosacáridos mediante métodos mediados por enzimas, siendo una de las posibles enzimas utilizadas la α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje aislada de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697.

Sin embargo, la α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje no ha sido totalmente adecuada para obtener oligosacáridos fucosilados, particularmente HMO fucosilados. Por lo tanto, se han buscado mutantes de la enzima que tengan preferiblemente una actividad sintética de transfucosidasa aumentada y/o una actividad hidrolítica reducida y/o una termoestabilidad aumentada, especialmente una actividad sintética de transfucosidasa aumentada, una actividad hidrolítica reducida y una termoestabilidad aumentada.

Osano et al. (Biochemistry 46, 1022 (2007)) describe la conversión de una α -L fucosidasa de *Thermotoga maritima* en una α -L-transfucosidasa mediante evolución dirigida.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una α 1-3/4 transfucosidasa mutada que tiene una termoestabilidad aumentada, un rendimiento sintético de transfucosidasa aumentado y/o una actividad hidrolítica significativamente reducida, en comparación con la α 1-3/4 transfucosidasa de tipo salvaje de SEQ ID No. 1, que tiene

- 40 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID No. 1, y
- una mutación en las posiciones de aminoácidos 135 y 174, y al menos una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413, estando dicha numeración de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID no. 1, en la que
 - 45 - en la posición 135, Trp (W) se sustituye por Phe o Tyr; en la posición 168, Ser (S) se sustituye por Glu (E);
 - 50 - en la posición 174, Ala (A) se sustituye por Asn, His o Phe;
 - en la posición 237, Glu (E) se sustituye por Asn o His;
 - en la posición 413, Glu (E) se sustituye por Arg (R).

55 Según otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una α 1-3/4 transfucosidasa mutada mencionada anteriormente, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una secuencia de ADN que codifica la α 1-3/4 transfucosidasa mutada, después

60 (b) expresar la α 1-3/4 transfucosidasa mutada en una célula hospedante transformada con la secuencia de ADN obtenida en la etapa (a).

Además, se proporciona un método para sintetizar un hidrato de carbono fucosilado, que comprende la etapa de hacer reaccionar un dador de fucosilo y un aceptor de hidrato de carbono en presencia de una α 1-3/4 transfucosidasa mutante mencionada anteriormente, para transferir el resto de fucosilo del dador de fucosilo al aceptor de hidrato de carbono.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 El primer aspecto de la invención se refiere a una α 1-3/4 transfucosidasa mutada que tiene una termoestabilidad aumentada, un rendimiento sintético de transfucosidasa aumentado y/o una actividad hidrolítica significativamente reducida, en comparación con la α 1-3/4 transfucosidasa de tipo salvaje de SEQ ID No. 1, que tiene:

- identidad sustancial (es decir, al menos 95 por ciento (%) de identidad de secuencia) con SEQ ID No.1, y
- 10 - mutación o mutaciones (es decir, un aminoácido reemplazado por otro aminoácido) en las posiciones de aminoácidos 135 y 174, y al menos una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413, estando dicha numeración de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 1, en la que:
 - 15 - en la posición 135, Trp (W) se sustituye por Phe o Tyr;
 - en la posición 168, Ser (S) se sustituye por Glu (E);
 - en la posición 174, Ala (A) se sustituye por Asn, His o Phe;
 - 20 - en la posición 237, Glu (E) se sustituye por Asn o His;
 - en la posición 413, Glu (E) se sustituye por Arg (R).

25 De ese modo, se puede obtener una α 1-3/4 mutada que proporciona, en comparación con la α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje de SEQ ID No. 1:

- aumento del rendimiento sintético de la transfucosidasa en una reacción entre un dador de fucosilo y un aceptor para producir un producto fucosilado, y/o
- 30 - hidrólisis significativamente reducida, de manera preferible prácticamente indetectable, del producto fucosilado de tal reacción, así como
- mayor termoestabilidad.

35 La expresión "hidrólisis prácticamente indetectable del producto fucosilado" significa preferiblemente que si ocurre la hidrólisis del producto fucosilado por la α 1-3/4 transfucosidasa mutada de la presente invención, la presencia de los productos de hidrólisis en la muestra está por debajo del nivel de detección. El experto en la técnica es consciente del límite de detección de los diferentes métodos analíticos. Normalmente, los experimentos de hidrólisis enzimática se siguen mediante HPLC. En las condiciones utilizadas (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2), no se pueden detectar

40 los productos de hidrólisis a una concentración inferior a alrededor de 1 %.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una α 1-3/4 transfucosidasa mutada que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1, y

- 45 a) una mutación en las posiciones de aminoácidos 135 y 174, y al menos una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413, en la que:
 - en la posición 135, Trp (W) se sustituye por Phe o Tyr;
 - 50 - en la posición 168, Ser (S) se sustituye por Glu (E);
 - en la posición 174, Ala (A) se sustituye por Asn, His o Phe;
 - en la posición 237. Glu (E) se sustituye por Asn o His;
 - 55 - en la posición 413, Glu (E) se sustituye por Arg (R)

y

60 un mayor rendimiento sintético de la transfucosidasa en una reacción entre un dador de fucosilo y un aceptor para producir un producto fucosilado, y/o una actividad hidrolítica significativamente reducida, de manera preferible prácticamente indetectable, hacia el producto fucosilado de dicha reacción, y una termoestabilidad mejorada, en comparación con la α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje de SEQ ID No. 1.

65 El fragmento de polipéptido de la posición de aminoácido 56 a 345 de SEQ ID No.1 se ha identificado como el dominio conservado (una alineación de secuencia que representa un dominio proteico conservado durante la evolución

molecular de la superfamilia α -L-fucosidasa) de la α 1-3/4 fucosidasa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 por la Base de Datos de Dominios Conservados del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las α -fucosidasas que contienen el dominio conservado de la α 1-3/4 fucosidasa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 con una identidad de secuencia de al menos 75 % se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Descripción	Identidad	Número de acceso
α -L-fucosidasa [<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> EK3]	100 %	KEY30716.1
α -L-fucosidasa [<i>Bifidobacterium longum</i>]	93 %	WP_013140205.1
fucosidasa α 1-3/4 putativa [<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i> JCM 15439]	92 %	KFI63931.1
fucosidasa α 1-3/4 putativa [<i>Bifidobacterium scardovii</i>]	75 %	KF194501.1

10 Según esta invención, las expresiones "identidad sustancial" y "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, significan preferiblemente que las dos o más secuencias son iguales o tienen al menos alrededor de 95 % de nucleótidos o restos de aminoácidos que son iguales cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación o secuencias designadas de ácidos nucleicos o aminoácidos (es decir, las secuencias tienen al menos alrededor de 95 por ciento (%) de identidad).

15 El porcentaje de identidad de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se puede medir utilizando algoritmos de comparación de secuencias BLAST 2.0 con parámetros predeterminados, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Según esta invención, el porcentaje de identidad de un fragmento de polipéptido sustancialmente idéntico de la posición de aminoácido 56 a 345 de SEQ ID No. 1, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica de SEQ ID No. 1, o secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente idénticas que codifican el fragmento de polipéptido de la posición de aminoácido 56 a 345 de SEQ ID No. 1 o secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente idénticas que codifican la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID No. 1 es al menos 95 %, preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, aún más preferiblemente al menos 98 %, y lo más preferible al menos 99 %. Adecuadamente, la definición excluye preferiblemente una identidad de secuencia del 100 %, tal como imponer un límite máximo en la identidad de secuencia del 99,9 %, 99,8 % o 99,7 %, o requerir que se presente al menos una diferencia de aminoácidos entre las secuencias que se comparan. Esta definición también se aplica al complemento de una secuencia de prueba, y a secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como a aquellas que tienen sustituciones. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST 2.2.20+, que se describe en Altschul et al. Nucl. Acids Res. 25, 3389 (1997). BLAST 2.2.20+ se utiliza para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

35 Las fucosidasas transfieren un resto de fucosilo de un oligosacárido dador a un aceptor. Si el aceptor es otro hidrato de carbono (mono- u oligosacárido), entonces la fucosidasa actúa como transfucosidasa (capaz de producir un producto de hidrato de carbono fucosilado). Por otro lado, la misma fucosidasa puede transferir el mismo resto de fucosilo, que se añadió al aceptor de hidrato de carbono previamente, del producto a una molécula de agua, actuando así como una hidrolasa. Los dos procesos tienen lugar simultáneamente. El rendimiento sintético global es la relación entre las actividades de transfucosidasa e hidrólisis. Si el rendimiento sintético global es inferior a 1, entonces la actividad de hidrólisis es dominante, y si el rendimiento sintético global es superior a 1, entonces la actividad de transfucosidasa es dominante. El rendimiento sintético global experimental de la α 1-3/4 fucosidasa de tipo salvaje de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 es alrededor de 0,03 (como se determina en la reacción 3-FL + LNnT \rightleftharpoons LNFP-III + Lac, véase el Ejemplo 1).

45 En comparación, las fucosidasas mutantes de esta invención muestran un rendimiento sintético general mucho más alto, preferiblemente mayor que 1, lo que significa una actividad de transfucosidasa mucho más alta con respecto a la actividad hidrolítica. En este sentido, una actividad sintética de transfucosidasa relativamente baja de un mutante de esta invención puede compensarse mediante una reducción significativa en la actividad hidrolítica del mutante que da como resultado un rendimiento sintético mejorado (es decir, la hidrólisis mediada por transfucosidasa del producto fucosilado es significativamente menor que su síntesis mediada por transfucosidasa, de modo que el equilibrio de las reacciones que compiten se desplaza hacia la formación del producto). De manera similar, una actividad hidrolítica relativamente alta de un mutante puede superarse mediante una mejora significativa en su actividad sintética de transfucosidasa. Las α 1-3/4 fucosidasas mutadas de esta invención muestran una mejora sustancial en su rendimiento sintético de transfucosidasa con respecto a la fucosidasa de tipo salvaje de SEQ ID No.1, es decir, una mejora de al menos 50 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 500 veces, incluso más preferiblemente 1000 veces, particularmente 2000 veces con respecto a la fucosidasa de tipo salvaje. Como consecuencia de este mayor rendimiento sintético de transfucosidasa, la cantidad de la α 1-3/4 transfucosidasa mutada de la invención, utilizada en la síntesis de un producto fucosilado, se puede reducir significativamente y los tiempos

ES 3 013 132 T3

de reacción se pueden acortar significativamente, lo que puede reducir los costos de sintetizar productos de oligosacáridos fucosilados, particularmente HMO fucosilados.

5 Adecuadamente, las fucosidasas mutantes de la invención son fucosidasas no naturales, es decir, no se producen en la naturaleza ni son de origen natural, sino que se producen como resultado de síntesis química, ingeniería genética o métodos similares en el laboratorio, dando como resultado fucosidasas mutantes sintéticas.

10 La combinación de mutaciones como se describió anteriormente imparte no sólo un rendimiento sintético de transfucosidasa aún mejor a la enzima mutada sino también una estabilidad mejorada, particularmente estabilidad de temperatura.

La α 1-3/4 transfucosidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1 como se describió anteriormente, y una mutación de aminoácido:

- 15 - en la posición de aminoácido 135 y 174, y
- al menos en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413.

20 En este aspecto, en la posición 135, Trp (W) se sustituye por Phe o Tyr; en la posición 168, Ser (S) se sustituye por Glu (E); en la posición 174, Ala (A) se sustituye por Asn, His o Phe; en la posición 237, Glu (E) se sustituye por His (H); y en la posición 413, Glu (E) se sustituye por Arg (R).

Preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID NO 1 que tiene mutaciones:

- 25 - en la posición de aminoácido 135 y 174, y
- al menos en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413.

30 En una realización más preferida, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1 como se describió anteriormente, y una mutación en la secuencia de aminoácidos en la posición 135 y 174 más una posición adicional seleccionada de 168 y 413.

35 En una realización más preferida, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID No. 1 que tiene mutaciones en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 135 y 174 más una posición adicional seleccionada de 168 y 413.

40 Preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa de este primer aspecto comprende una mutación adicional en la posición de aminoácido seleccionada de 165, 168, 232, 237, 258, 260 y 274, y más preferiblemente de 165, 168, 232, 258, 260 y 274.

Las α -fucosidasas que tienen al menos alrededor de 75 por ciento de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1, se enumeran en la Tabla 2.

45 Tabla 2.

Descripción	Identidad	Número de acceso
α -L-fucosidasa [<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> EK3]	99 %	KEY30716.1
α -L-fucosidasa [<i>Bifidobacterium longum</i>]	88 %	WP_013140205.1
fucosidasa α 1-3/4 putativa [<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i> JCM 15439]	87 %	KF163931.1

Aún más preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1 como se describió anteriormente, y mutaciones de aminoácidos:

- 50 - en las posiciones de aminoácido 135 y 174,
- en las posiciones de aminoácido 168 o 413, y
55 - una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274.

Aún más preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1 como se describió anteriormente, y mutaciones de aminoácidos:

- 60 - en las posiciones de aminoácido 135, 174 y 413, y opcionalmente 168, y

ES 3 013 132 T3

- una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274.

Aún más preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID No.1 como se describió anteriormente que tiene mutaciones:

- en las posiciones de aminoácido 135, 174 y 413, y opcionalmente 168, y
- una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274.

La combinación anterior de mutaciones imparte no sólo un rendimiento sintético de transfucosidasa aún mejor a la enzima mutada sino también una estabilidad aún mejor, particularmente estabilidad de temperatura, al tiempo que se mantiene un rendimiento sintético de transfucosidasa aún mejor. Las mutaciones en 135 y 174 son las siguientes:

- en la posición 135, como W135F o W135Y,
- en la posición 174, como A174F, A174H o A174N,

y en 165, 232, 258, 260 y 274 son preferiblemente las siguientes:

- en la posición 165, como P165E,
- en la posición 232, como R232A,
- en la posición 258, como Q258R,
- en la posición 260, como D260P,
- en la posición 274, como N274A.

En el primer aspecto de la invención, la α 1-3/4 fucosidasa mutada que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1, dentro de la invención como se establece anteriormente, tiene una mutación en la posición de aminoácido 174, y opcionalmente también 282, para proporcionar una actividad hidrolítica significativa o completamente suprimida. En este sentido, en la posición 174, Ala (A) se reemplaza preferiblemente por Phe (F), Asn (N) o His (H), y en la posición 282, Val (V) se reemplaza preferiblemente por Arg (R), Glu (E), His (H) o Lys (K). La actividad hidrolítica suprimida es beneficiosa debido a que la enzima mutada entonces no degrada significativamente el dador y/o el producto por hidrólisis. Como resultado, la reacción de la transfucosidasa ya no está controlada cinéticamente, y se puede lograr una relación síntesis/hidrólisis mucho mejor (lo que significa un mejor rendimiento sintético). La mutación en una o ambas, preferiblemente ambas, de las posiciones de aminoácido anteriores puede proporcionar una actividad hidrolítica reducida al menos 100 veces, preferiblemente al menos 1000 veces, más preferiblemente al menos 10000 veces hacia los productos fucosilados.

Además, según una determinada realización, una α 1-3/4 fucosidasa mutada que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No.1, y dentro de la invención como se establece anteriormente, comprende la mutación de

- la posición del aminoácido 174 y opcionalmente también 282, y
- al menos la posición del aminoácido 165, 168, 232, 237, 258, 260 o 274.

La combinación de mutaciones como se describió anteriormente imparte no sólo una hidrólisis significativamente reducida, de manera preferible prácticamente indetectable, del producto fucosilado sino también una estabilidad mejorada, particularmente estabilidad de temperatura.

Preferiblemente, en la mutación del aminoácido en la posición 174 y opcionalmente también 282, en la posición 174, Ala (A) se reemplaza por Phe (F), Asn (N) o His (H), y/o en la posición 282, Val (V) se reemplaza por Arg (R), Glu (E), His (H) o Lys (K).

Según el segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para obtener una α 1-3/4 transfucosidasa mutada del primer aspecto de la invención, que comprende las etapas de:

- proporcionar una secuencia de ADN que codifique la α 1-3/4 transfucosidasa mutada, después
- expresar la α 1-3/4 transfucosidasa mutada en una célula hospedante transformada con la secuencia de ADN obtenida en la etapa (a).

en las que R₁ es como se define anteriormente,

R_{2a} es un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un resto de glicosilo que comprende un grupo N-acetil-lactosaminilo y/o un grupo lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo ³uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo,

R_{3a} es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un grupo lacto-N-biosilo;

cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo ³uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de resto de sialilo y/o fucosilo,

R_{2b} es un grupo lacto-N-biosilo opcionalmente sustituido con un resto de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo, y

R_{3b} es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos N-acetil-lactosaminilo y/o un grupo lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo.

Más preferiblemente, los compuestos de fórmulas 1a y 1b tienen uno o más de los siguientes enlaces y modificaciones:

- el grupo N-acetil-lactosaminilo en el resto de glicosilo de R_{2a} en la fórmula 1a está unido al otro grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglicosídico 1-3,
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{2a} en la fórmula 1a está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglicosídico 1-3,
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{3a} en la fórmula 1a está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglicosídico 1-3,
- el grupo N-acetil-lactosaminilo en el resto de glicosilo de R_{3b} en la fórmula 1b está unido a otro grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglicosídico 1-3 o 1-6, y
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{3b} en la fórmula 1b está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglicosídico 1-3.

Aún más preferiblemente, un compuesto de fórmula 1a, 1b o 2 se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-fucosillactosa (2'-FL), 3'-O-sialillactosa (3'-SL), lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I, Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]Glc, lacto-N-fucopentaosa V (LNFP-V, Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]Glc), Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]Glc, lacto-N-hexaosa (LNH, Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), lacto-N-neohexaosa (LNnH, Galβ1-4GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), para-lacto-N-hexaosa (pLNH, Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), para-lacto-N-neohexaosa (pLNnH, Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), fucosil-LNH I (FLNH-I, Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), fucosil-LNH II (FLNH-II, Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-6[Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc), fucosil-para-LNH I (FpLNH-I, Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), fucosil-para-LNH II (FpLNH-II, Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, difucosil-LNH I (DFLNH-I, Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-6[Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc), difucosil-para-LNH (DFpLNH, Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), difucosil-para-LNnH (DFpLNnH, Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), lacto-N-octaosa (LNO, Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), lacto-N-neooctaosa (LNnO, Galβ1-4GlcNAcβ1-3[Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), iso-lacto-N-octaosa (iLNO, Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), LST a (NeuAca2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), LST c (NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), sialil-LNH (SLNH, Galβ1-3GlcNAcβ1-3[NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), sialil-LNnH I (SLNnH-I, Galβ1-4GlcNAcβ1-3[NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), sialil-LNnH II (SLNnH-II, Galβ1-4GlcNAcβ1-6[NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc), disialil-LNT (DSLNT, NeuAca2-3Galβ1-3[NeuAca2-6]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), fucosil-sialil-LNH (FSLNH, NeuAca2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), fucosil-sialil-LNH II (FSLNH-II, Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3[NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc), disialil-LNH I (DSLNH-I, NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6[NeuAca2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc), disialil-LNH II (DSLNH-II, Galβ1-4GlcNAcβ1-6[NeuAca2-3Galβ1-3[NeuAca2-6]GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc) y disialil-LNnH (DSLNnH, NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6[NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc), ventajosamente 2'-FL, 3'-SL, LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-V, LNH, LNnH, pLNH, pLNnH y DSLNT.

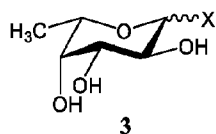
Una α1-3/4 fucosidasa mutada del primer aspecto de la invención demuestra una fuerte selectividad α1-3/4 cuando se lleva a cabo el método del tercer aspecto de la invención. Como resultado, el producto de la reacción es un mono- u oligosacárido α1-3- o α1-4-fucosilado, preferiblemente un oligosacárido de 3-10 unidades monoméricas,

exclusivamente, y no se puede detectar ningún producto α 1-2-fucosilado. Preferiblemente, la α 1-3/4 transfucosidasa mutada traslada el resto de fucosilo de un dador apropiado a la posición 3 de la glucosa en un aceptor de fórmula 2, a la posición 3 de la N-acetil-glucosamina en un grupo N-acetil-lactosaminilo, preferiblemente terminal, en un aceptor de fórmula 1, 1a o 1b, o a la posición 4 de la N-acetil-glucosamina en un grupo lacto-N-biosilo, preferiblemente terminal, en un aceptor de fórmula 1, 1a o 1b. Por consiguiente, una α 1-3/4 transfucosidasa mutada de la invención se utiliza preferiblemente para sintetizar HMO fucosilados tales como DFL, FSL o aquellos en los que el resto de fucosilo está unido a un resto de GlcNAc con enlace α 1-3 o α 1-4, más preferiblemente a los HMO fucosilados enumerados en la Tabla 3 a continuación (para abreviaturas, véase Urashima et al. Milk Oligosaccharides, Nova Science Publishers, NY, 2011, Tabla 4 en las págs. 14-25).

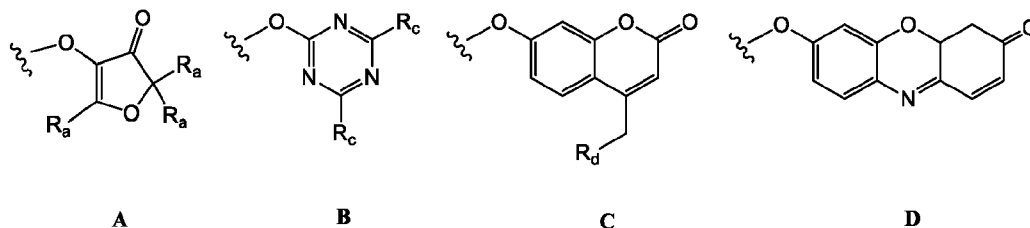
Tabla 3.

aceptor	producto
2'-PL	DFL
3'-SL	SFL
LNT	LNFP-II
LNT	LNFP-III
LNFP-I	LNDFH-I
LNFP-V	LNDFH-II
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuca α 1-3]Glc	LNDFH-III
LNH	FLNH-II
LnH	Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc
LnH	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc
pLNH	FpLNH-I
pLNH	FpLNH-II
pLNH	DFpLNH
pLNnH	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
pLNnH	Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
FpLNH-I	DFpLNH
FpLNH-II	DFpLNH
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	DFpLNnH
Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	DFpLNnH
FLNH-I	DFLNH-I
FLNH-II	DFLNH-II
Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc	DFLNnH
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc	DFLNnH
DFLNH-I	TFLNH
DFpLNnH	TFpLNnH
DFpLNH	TFpLNH-II
LST a	FLST a
LST c	FLST c
SLNH	FSLNH-III
SLNnH-II	FSLNnH-I
FSLNH	DFSLNH-I
FSLNH-II	DFSLNH-III
DSLNT	FDSLNT-I
DSLNH-II	FDSLNH-II
DSLNH-I	FDSLNH-III
DSLNnH	FDSLNnH

El fucosilo utilizado en el tercer aspecto de la invención puede ser cualquier compuesto de fucosilo a partir del cual la α 1-3/4 fucosidasa mutada es capaz de transferir el resto de fucosilo a un aceptor de hidrato de carbono como se describió anteriormente. Por consiguiente, el dador de fucosilo puede ser un sacárido de fucosilo α 1-3 o α 1-4, preferiblemente de 3 o 4 unidades de monosacárido que incluyen el resto de fucosilo, más preferiblemente 3-FL o DFL, o un compuesto de fórmula 3



5 en la que X se selecciona del grupo que consiste en azida, fluoro, fenoxi opcionalmente sustituido, piridiniloxi opcionalmente sustituido, grupo A, grupo B, grupo C y grupo D



10 en los que Ra es independientemente H o alquilo, o dos grupos Ra vecinales representan un grupo =C(Rb)₂, en el que Rb es independientemente H o alquilo, Rc se selecciona independientemente del grupo que consiste en alcoxi, amino, alquilamino y dialquilamino, Rb se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo y -C(=O) Re, en el que Re es OH, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, hidrazino, alquilhidrazino, dialquilhidrazino o trialquilhidrazino,

15 preferiblemente, X en la fórmula 3 se selecciona del grupo que consiste en grupo fenoxi, p-nitrofenoxi, 2,4-dinitrofenoxi, 2-cloro-4-nitrofenoxi, 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-iloxi, 4,6-dietoxi-1,3,5-triazin-2-iloxi, 2-etil-5-metil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi, 5-etil-2-metil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi y 2,5-dimetil-3-oxo-(2H)-furan-4-iloxi. Ventajosamente, el dador de fucosilo es 3-FL o DFL.

20 Una α 1-3/4 transfucosidasa mutada de la invención que comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No. 1, o que comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID NO 1, y mutación en la posición de aminoácido 174 y en la posición de aminoácido 135 o 168, es especialmente adecuada para obtener

- 25 - DFL, si el dador de fucosilo es 3-FL y el aceptor de hidrato de carbono es 2'-FL,
- LNFP-II, si el dador de fucosilo es 3-FL o DFL y el aceptor es LNT,
- LNFP-III, si el dador de fucosilo es 3-FL o DFL y el aceptor es LNnT,
- 30 - LNDFH-I, si el dador de fucosilo es 3-FL o DFL y el aceptor es LNFP-I,
- y el producto es Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc y/o DFLNnH, si el dador de fucosilo es 3-FL o DFL y el aceptor es LNnH,
- 35 - Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, si el dador de fucosilo es 3-FL o DFL y el aceptor es pLNnH.

Más preferiblemente, en una reacción de fucosilación, en la que el dador de fucosilo es 3-FL y el aceptor es

- 40 - LNnT para obtener LNFP-III,
- LNT para obtener LNFP-II,
- LNFP-I para obtener LNDFH-I,
- 45 - pLNnH para obtener Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, o
- 2'-FL para obtener DFL,

50 está especialmente favorecida la utilización de una α 1-3/4 transfucosidasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con SEQ ID No. 1, y mutación de tres aminoácidos en las posiciones 174, en las posiciones 135, y en la posición 413, y opcionalmente en 168, y que opcionalmente tiene una mutación adicional en la posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274,

55

o una α 1-3/4 transufosidasa que comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID No. 1 que tiene mutaciones de tres aminoácidos en la posición 174, en las posiciones 135, y en la posición 413, y opcionalmente en 168, y que opcionalmente tiene una mutación adicional en la posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274.

5

EJEMPLOS

En los ejemplos siguientes se probaron mutantes de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697; la o las posiciones de mutación son según SEQ ID No. 1. No todos los mutantes probados son según la invención, y los que no son según la invención se indican dentro de los ejemplos como "(comparativos)".

10

Ejemplo 1: rendimiento sintético mejorado de transufosidasa de mutantes

Se investigó la actividad de transufosidasa de mutantes en la reacción 3-FL + LNnT \rightleftharpoons LNFP-III + Lac, en la que se siguió la formación de LNFP-III.

15

La reacción se llevó a cabo a 30 °C en una escala de 150 μ l usando LNnT 200 mM y 3-FL 200 mM. Las muestras se tomaron típicamente después de 1 h, 2h, 4 h y 20 h, y la reacción se detuvo añadiendo 390 μ l de acetonitrilo/agua 1:1.

Se investigó la actividad hidrolítica de mutantes en un procedimiento similar utilizando LNFP-III (50 mM) como único sustrato, y se siguió el agotamiento de LNFP-III y la formación de LNnT a lo largo del tiempo.

20

Condiciones de HPLC: se utilizó una columna Kinetex 2,6 μ HILIC 100A (150x4,6 mm) con un caudal de 1,8 ml/min utilizando un 76 % de acetonitrilo y un 24 % de amortiguador de formiato de amonio 10 mM (pH 4). La elución de sustratos y productos se detectó a 195 nm. Para la cuantificación de LNnT y LNFP-III, las áreas de los picos se compararon con un patrón externo.

25

Los datos de actividad medidos se resumen en la tabla siguiente. El rendimiento sintético se calculó como la relación: síntesis [U/mg]/hidrólisis [U/mg], en la que 1 U = producción o hidrólisis de 1 μ mol de LNFP-III por minuto.

30

mutante	rendimiento sintético	mejora sobre WT
WT (<i>tipo salvaje</i>) (comparativo)	0,031	1
W135E (comparativo)	3,3	\approx 100x
A174H (comparativo)	27	\approx 850x
S168E-A174H-E413R (comparativo)	110	\approx 3500x
W135E-A174F-V221A (comparativo)	75	\approx 2400x
W135E-A174F (comparativo)	225	\approx 7300x
W135E-A174F-E413R (comparativo)	65	\approx 2100x
W135E-S168E-A174F (comparativo)	45	\approx 1500x
W135E-A174F-E237H-E413R (comparativo)	23	\approx 750x
W135E-S168E-A174F-E237H (comparativo)	10	\approx 320x
W135E-A174F-E237H (comparativo)	9	\approx 290x
W135F-A174N-E413R	21	\approx 700x
W135F-A174N-N274A-E413R	30	\approx 1000x
W135F-A174N-R232A-E413R	23	\approx 750x
W135F-P165E-A174N-E413R	28	\approx 900x
W135F-A174N-D260P-E413R	23	\approx 750x
W135F-A174N-Q258R-E413R	26	\approx 850x

Ejemplo 2: Actividad hidrolítica reducida de mutantes

La actividad hidrolítica de los mutantes se investigó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

35

mutante	hidrólisis [U/mg]
WT (comparativo)	208
W135E (comparativo)	0,3
A174H (comparativo)	0,011
S168E-A174H-E413R (comparativo)	0,011
W135E-A174F-V221A (comparativo)	0,008
W135E-A174F (comparativo)	0,004
W135E-A174F-E413R (comparativo)	0,01
W135E-S168E-A174F (comparativo)	0,01
W135E-A174F-E237H-E413R (comparativo)	0,01

mutante	hidrólisis [U/mg]
W135E-S168E-A174F-E237H (comparativo)	0,01
W135E-A174F-E237H (comparativo)	0,01
W135F-A174N-E413R	0,04
W135F-A174N-N274A-E413R	0,04
W135F-A174N-R232A-E413R	0,05
W135F-P165E-A174N-E413R	0,05
W135F-A174N-D260P-E413R	0,04
W135F-A174N-Q258R-E413R	0,05

Ejemplo 3: Termoestabilidad mejorada de mutantes

5 La temperatura de fusión (T_m) es la temperatura a la cual permanece el 50 % de la actividad inicial de la enzima después de 15 minutos de incubación a temperaturas elevadas.

Las actividades se midieron mediante análisis de HPLC de la reacción $3\text{-FL} + \text{LNnT} \rightleftharpoons \text{LNFP-III} + \text{Lac}$, en la que se siguió la formación de LNFP-III.

10 Condiciones de HPLC: véase anteriormente

Aumento de la termoestabilidad (T_m) de la proteína de tipo salvaje de SEQ ID No. 1:

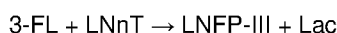
		1 mutación (comparativo)		2 mutaciones (comparativo)		3 mutaciones (comparativo)
<i>WT</i> : 52 °C	→	S168E: 58 °C	→	S168E-E413R: 61 °C	→	S168E-E237H-E413R: 63 °C
		E237H: 57 °C		E237H-E413R: 61 °C		
		E413R: 58 °C				

15 Aumento de la termoestabilidad de mutantes diseñados para un mayor rendimiento sintético de transufosidasa o una actividad hidrolítica reducida:

A174H: 58 °C (comparativo)	→	S168E-A174H-E413R: 62 °C (comparativo)	→	S168E-A174H-E237H-E413R: 66 °C (comparativo)
W135E-A174F: 51 °C (comparativo)	→	W135E-A174F-E413R (comparativo): 54 °C	→	W135E-A174F-E237H-E413R (comparativo): 58 °C
		W135E-S168E-A174F (comparativo): 55 °C		W135E-S168E-A174F-E237H (comparativo): 60 °C
		W135E-A174F-E237H (comparativo): 56 °C		
W135F-A174N-E413R: 58 °C	→	W135F-A174N-Q258R-E413R: 60 °C		
		W135F-P165E-A174N-E413R: 61 °C		
		W135F-A174N-D260P-E413R: 61 °C		
		W135F-A174N-N274A-E413R: 62 °C		
		W135F-A174N-R232A-E413R: 62 °C		

Ejemplo 4: Actividad de transufosidasa de mutantes puntuales únicos, no según la invención

20 A) Se detectó mutagénesis por saturación en las posiciones 134, 135, 174 y 282 en las siguientes reacciones:



25 $3\text{-FL} + \text{LNFP-I} \rightleftharpoons \text{LNDFH-I} + \text{Lac}$

30 La prueba se realizó en un amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH= 6,5, 37 °C, 150 µl), [3-FL] = 200 mM, [LNnT] = 200 mM, [LNFP-I] = 200 mM, con 10 µl de extracto enzimático bruto. Las conversiones se midieron después de 15 min, 30 min, 60 min y 20 horas. Las tablas siguientes muestran las conversiones (%) después de 30 min, 20 horas, y la conversión máxima durante el transcurso. Los valores de WT están en cursiva.

ES 3 013 132 T3

		conversión de LNFP-III (%)											
		P134			W135			A174			V282		
		30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.
A	Ala	34	8	42	30	18	46	6	0	14	4	0	12
R	Arg	8	42	42	1	37	37	31	44	55	13	17	35
N	Asn	6	20	29	5	45	45	32	41	50	5	0	16
D	Asp	2	37	37	21	36	51	3	39	39	28	0	28
C	Cys	37	7	38	0	0	0	26	51	51	7	0	18
Q	Gln	1	27	27	2	27	27	2	23	23	0	0	0
E	Glu	24	0	24	17	35	51	19	54	54	23	0	23
G	Gly	23	24	45	0	25	25	30	8	30	4	0	15
H	His	0	0	0	7	44	44	30	59	61	5	0	13
I	Ile	9	18	30	9	40	40	6	51	51	4	0	11
L	Leu	25	0	26	4	47	47	25	46	60	4	0	8
K	Lys	4	39	39	4	46	46	32	49	55	16	15	32
M	Met	30	7	41	5	42	42	6	50	50	8	6	14
F	Phe	22	10	34	22	26	46	21	54	54	22	7	35
P	Pro	6	0	14	1	31	31	1	18	18	2	15	15
S	Ser	38	10	44	1	34	34	23	5	24	14	0	28
T	Thr	36	7	40	4	38	38	19	22	35	11	0	22
W	Trp	2	27	27	6	0	14	10	55	55	20	7	34
Y	Tyr	15	10	23	40	5	43	21	48	48	14	0	14
V	Val	35	7	35	14	27	44	24	22	43	6	0	14

		conversión de LNDFH-I (%)											
		P134			W135			A174			V282		
		30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.	30 min	20 h	conv. máx.
A	Ala	14	0	17	19	0	20	0	0	0	0	0	0
R	Arg	23	41	41	4	19	19	0	0	2	10	0	41
N	Asn	3	5	9	18	16	31	26	19	35	0	0	0
D	Asp	0	4	4	26	5	32	3	8	6	0	0	4
C	Cys	19	0	19	0	0	0	35	0	37	0	0	0
Q	Gln	11	9	16	9	38	38	0	0	0	0	0	0
E	Glu	35	5	38	20	4	26	12	9	12	0	0	0
G	Gly	22	0	22	2	27	27	10	0	13	0	0	0
H	His	0	0	0	3	31	31	8	21	21	0	0	0
I	Ile	7	0	9	14	21	25	0	5	5	0	0	0
L	Leu	10	0	10	2	27	27	4	19	19	0	0	0
K	Lys	36	31	40	3	22	22	0	4	4	0	0	12
M	Met	17	0	18	11	24	24	0	14	14	3	5	6
F	Phe	13	0	13	31	0	31	26	12	34	17	0	17
P	Pro	0	0	0	0	3	3	0	6	6	6	0	6
S	Ser	16	0	16	4	16	16	5	0	6	0	0	0
T	Thr	16	0	16	12	11	18	11	6	17	0	0	0
W	Trp	3	12	12	0	0	0	7	20	20	10	0	10
Y	Tyr	9	0	9	15	0	20	30	27	37	0	0	0
V	Val	6	0	8	14	5	18	22	0	22	0	0	0

B) En la reacción 3-FL + LNnT \rightleftharpoons LNFP-III + Lac

- 5 La prueba se realizó en un amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH= 6,5, 37 °C, 200 µl), [3-FL] = 200 mM, [LNnT] = 200 mM, extracto enzimático = 2 o 0,5 mg/ml.

Condiciones de HPLC: se utilizó TSK Gel amide 80 (Tosoh, 3 µm, 150 x 4,6 mm) con un caudal de 1 ml/min utilizando 56 % de acetonitrilo y 44 % de agua. La elución de sustratos y productos se detectó mediante CAD y/o detección UV a 195 nm.

10

Las tablas muestran la formación de LNFP-III (%) en función del tiempo.

ES 3 013 132 T3

Concentración del extracto enzimático: 2 mg/ml							
	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	22 horas
N216D	29,73	23,27	4,83	2,51	0,44	0,33	0,00
V221A	24,19	16,40	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V282K	27,29	31,51	38,10	28,07	30,81	25,63	10,92
P134A	40,46	37,37	32,85	27,17	19,58	14,86	6,16
W135F	42,53	43,66	44,57	42,06	37,76	31,71	19,52
W135A	45,58	44,14	40,11	35,03	27,97	23,01	14,20
W135E	27,22	38,91	44,19	43,59	39,49	35,53	26,51
W170F	40,06	32,92	29,91	24,04	14,04	8,79	2,11
A174S	38,40	34,58	30,90	26,98	20,28	16,55	9,51
A174H	48,05	49,32	49,16	49,30	48,60	48,10	46,17
Q244K	10,61	3,48	3,48	1,46	0,25	0,00	0,00

Concentración del extracto enzimático: 0,5 mg/ml							
	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	7 horas	20 horas
N216D	29,00	28,00	28,00	22,50	14,60	3,00	0,00
V221A	26,00	22,00	20,50	14,60	7,80	2,00	0,00
V282K	7,70	9,20	13,80	21,60	27,00	21,00	17,80
P134A	27,80	30,00	32,00	32,00	27,60	12,00	9,60
W135F	7,60	10,40	17,40	25,25	34,20	30,40	28,50
W135A	17,60	21,90	30,00	36,00	35,30	18,00	15,60
W135E	7,00	10,40	18,90	27,90	36,30	31,80	29,30
W170F	27,30	28,70	29,90	32,00	28,80	9,80	7,70
A174S	21,20	23,40	23,30	27,30	25,20	7,30	7,20
A174H	17,20	19,90	26,30	34,00	42,00	44,00	44,00
Q244K	22,50	21,25	15,90	12,10	6,50	0,00	0,00

C) En la reacción 3-FL + LNT \rightleftharpoons LNFP-II + Lac

- 5 La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 nM, [LNT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNFP-II (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
N216D	43,9	39,7	34,2	28,8	20,7	16,3	5,4
V221A	35,6	31,7	25,8	18,0	10,7	6,2	0,7
V282K	20,8	27,6	31,8	30,2	39,7	38,6	25,9
P134A	13,4	19,7	26,7	34,6	36,4	34,6	23,2
W135F	44,5	44,1	41,7	37,4	31,2	29,5	23,7
W135A	21,5	25,8	31,7	39,5	45,4	46,1	40,7
W135E	39,4	43,2	45,2	45,6	42,2	39,7	29,2
W170F	17,2	22,8	30,0	38,6	45,9	46,7	41,2
A174S	45,1	44,0	43,0	40,0	32,6	29,9	16,0
A174H	40,1	40,7	39,9	36,9	32,1	28,5	18,8
Q244K	37,6	41,2	45,1	48,8	50,5	50,5	50,2

- 10 D) En la reacción 3-FL + LNnH == Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc + Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc + DFLNnH + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNnH] = 100 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). Las tablas muestran la formación de LNnH monofucosilada y difucosilada (%), respectivamente, en función del tiempo.

- 15

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
N216D	0,0	4,8	11,8	10,8	0,0	0,0	n.d.
V282K	33,6	37,1	37,2	40,5	38,1	38,2	27,1
P134A	16,1	25,1	29,7	31,8	26,7	23,0	13,5
W135F	40,6	45,3	44,2	45,8	45,9	46,0	38,1
W135A	31,6	33,5	40,4	37,2	37,7	33,4	20,9
W135E	41,7	41,0	41,7	44,8	47,8	46,7	45,1
W170F	0,0	4,6	22,0	17,7	14,7	7,5	1,8

ES 3 013 132 T3

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
A174S	0,0	0,0	5,2	8,3	n.d.	6,0	3,8
A174H	49,6	49,8	49,4	48,4	49,6	49,2	49,7

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
N216D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.d.
V282K	3,2	5,7	6,4	7,2	6,3	5,1	2,3
P134A	0,0	2,0	3,0	4,0	3,5	1,8	0,0
W135F	9,1	13,7	12,5	14,7	16,3	13,8	6,3
W135A	3,4	4,1	8,9	7,3	6,3	4,5	0,3
W135E	10,2	9,1	8,4	11,2	16,1	16,3	11,4
W170F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A174S	0,0	0,0	0,0	0,0	n.d.	0,0	0,0
A174H	22,2	25,3	24,3	27,1	26,6	26,8	25,4

E) En la reacción 3-FL + pLNnH \rightleftharpoons Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc + Lac

- 5 La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 100 o 200 mM, [pLNnH] = 100 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). Las tablas muestran la formación de pLNnH fucosilada (%) en función del tiempo.

[3-FL] = 100 mM							
	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	25 horas
V282K	3,5	4,8	5,3	5,6	n.d.	2,0	0,0
P134A	1,4	1,6	2,3	3,7	1,5	0,0	0,0
W135F	11,6	11,2	10,4	9,5	9,5	9,5	6,3
W135A	1,8	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
W135E	11,9	9,6	11,4	11,0	10,0	10,2	10,2
W170F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A174S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A174H	38,0	40,0	43,0	44,0	44,0	44,0	40,0
Q244K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[3-FL] = 200 mM							
	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
V282K	27,0	35,5	31,0	34,7	30,8	29,5	7,8
P134A	10,6	20,8	28,5	25,7	19,6	14,0	6,4
W135F	43,8	47,7	49,0	48,0	43,9	39,1	21,2
W135A	21,8	28,9	36,1	32,6	25,8	19,0	10,2
W135E	46,0	42,3	45,6	46,0	35,2	41,5	25,2
W170F	0,0	4,3	7,3	3,1	2,7	1,0	0,0
A174S	0,0	3,0	2,7	4,3	1,8	1,2	0,0
A174H	57,6	60,1	59,8	60,7	60,7	60,6	58,1
Q244K	1,1	1,1	0,0	1,5	0,9	0,8	13,7

10

F) En la reacción 3-FL + LNFP-I \rightleftharpoons LNDFH-I + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNFP-I] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNDFH-I (%) en función del tiempo.

15

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
N216D	43,3	40,9	28,3	35,7	30,6	26,8	18,2
V221A	35,5	35,2	20,9	28,5	23,5	16,5	7,6
V282K	11,0	14,6	17,4	24,3	30,7	34,1	36,8
P134A	38,7	41,7	43,7	45,3	44,8	43,3	39,2
W135F	18,9	22,0	24,9	32,4	41,1	45,6	51,9
W135A	23,1	29,7	33,0	37,3	42,7	44,3	43,3
W135E	9,5	13,1	16,9	25,2	35,8	39,6	50,7
W170F	47,3	42,4	44,5	42,0	38,0	35,6	29,0
A174S	21,8	24,5	25,6	28,7	29,9	30,7	31,7
A174H	0,9	2,0	2,7	2,9	29,4	6,5	15,7

ES 3 013 132 T3

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6,5 horas	25 horas
Q244K	42,8	38,4	39,3	38,4	33,4	29,0	22,9

Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 30 °C, 140 µl), [3-FL] = 50 mM, [LNFP-I] = 50 mM, extracto enzimático = 10 µl. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la formación de LNDFH-I (%) en función del tiempo.

5

	15 min	4,5 horas
<i>WT</i>	10	0
P134A	33	17
P134V	20	11
W135F	20	37
W135A	21	25
W135E	14	37
W170F	33	8
A236D	38	26
A236H	39	14
E237N	13	38
Q244L	42	14
Q244H	42	12
Q244K	36	11
Q244G	41	12
Q244R	31	8
Q245E	36	12

G) En la reacción $DFL + LNnT \rightleftharpoons LNFP-III + 2'-FL$

10

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 µl), [DFL] = 200 mM, [LNnT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNFP-III (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	7 horas	25 horas
N216D	11,5	11,5	16,8	8,6	6,7	1,0	0,0
V282K	4,3	5,4	7,2	9,3	11,8	4,2	4,5
P134A	8,5	11,8	13,3	13,4	13,0	5,4	5,7
W135F	5,7	7,1	10,4	14,7	19,3	16,8	13,6
W135A	8,2	8,7	13,6	13,7	16,7	6,5	6,2
W135E	5,2	6,4	10,4	15,5	18,9	16,7	15,0
W170F	11,0	11,1	11,0	9,5	10,2	5,3	5,3
A174S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A174H	0,0	0,0	1,7	3,3	4,4	5,9	9,8
Q244K	5,9	5,5	4,5	4,3	3,5	2,2	1,0

15

H) En la reacción $3-FL + 2'-FL \rightleftharpoons DFL + Lac$

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 µl), [3-FL] = 200 mM, [2'-FL] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de DFL (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	25 horas
N216D	43,0	46,0	46,0	45,0	41,0	40,0	32,0
V282K	16,0	22,0	27,0	32,0	39,0	42,0	51,0
P134A	45,0	47,0	51,0	54,0	54,0	54,0	50,0
W135F	17,0	30,0	31,0	37,0	45,0	49,0	59,0
W135A	34,0	39,0	42,0	47,0	50,0	52,0	52,0
W135E	19,0	22,0	28,0	36,0	46,0	51,0	59,0
W170F	45,0	47,0	48,0	46,0	44,0	42,0	35,0
A174S	30,0	33,0	35,0	37,0	41,0	39,0	40,0
A174H	6,0	7,7	10,0	13,0	16,0	18,0	30,0
Q244K	31,0	33,0	33,0	32,0	31,0	30,0	19,0

20

Ejemplo 5: Mutantes multipuntuales

ES 3 013 132 T3

A) En la reacción 3-FL + LNnT \rightleftharpoons LNFP-III + Lac

5 La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNnT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNFP-III (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	23 horas
S168E-A174H-E413R (comparativo)	19,8	25,21	32,09	40,69	47,05	50,15	51,15
S168E-A174F (comparativo)	6,58	7,4	11,32	15,11	25,47	31,36	49,16
S168E-A174H-V282E (comparativo)	23,29	29,99	38,16	45,65	50,29	51,55	50,1
S168E-A174H-V221A (comparativo)	10,75	16,22	23,99	34,66	46,91	50,33	51,0
S168E-A174H-V221A-V282H (comparativo)	28,89	33,6	39,95	47,55	49,95	51,08	50,89
W135E-A174F-V221A (comparativo)	6,86	9,96	16,67	27,29	41,29	47,34	52,77
S168E-A174F-V221A-V282R (comparativo)	16,32	24,15	31,23	41,0	48,14	50,29	52,12
S168E-A174H-N216D (comparativo)	21,47	24,91	31,2	39,08	46,3	49,34	51,65
W135E-A174F-N216D-V221A (comparativo)	40,38	41,75	44,09	47,96	49,18	50,01	48,95
S168E-A174H (comparativo)	17,47	21,52	28,17	36,21	43,01	46,31	51,08

10 Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 150 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,67 mg/ml. Se tomaron muestras después de 3, 10, 15, 20, 30, 45, 61 y 115 min. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la actividad en [U/mg], en la que 1 U = producción de 1 μ mol de LNFP-II por min.

	LNFP-III [U/mg]
W135F-A174N-E413R	0,83
W135F-A174N-N274A-E413R	1,20
W135F-A174N-R232A-E413R	1,17
W135F-P165E-A174N-E413R	1,39
W135F-A174N-Q258R-E413R	1,32
W135F-A174N-D260P-E413R	0,90

15 B) En la reacción 3-FL + LNT \rightleftharpoons LNFP-II + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNFP-II (%) en función del tiempo.

20

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	23 horas
S168E-A174H-E413R (comparativo)	14,8	24,9	32,4	41,1	46,8	47,8	48,7
S168E-A174F (comparativo)	3,7	5,6	9,2	14,4	23,3	29,1	46,1
S168E-A174H-V282E (comparativo)	17,33	25,95	37,76	48,0	48,03	48,49	48,19
S168E-A174H-V221A (comparativo)	7,8	13,29	21,81	32,89	44,53	46,99	48,74
S168E-A174H-V221A-V282H (comparativo)	23,98	32,38	39,9	45,98	48,32	48,49	47,43
W135E-A174F-V221A (comparativo)	5,2	9,31	14,94	25,29	37,21	43,67	47,45
S168E-A174F-V221A-V282R (comparativo)	13,71	21,95	31,93	40,91	46,97	48,14	48,08
S168E-A174H-N216D (comparativo)	19,91	25,1	32,9	39,71	46,39	47,89	47,58
W135E-A174F-N216D-V221A (comparativo)	34,4	38,56	42,29	46,53	47,56	47,59	44,94
S168E-A174H (comparativo)	16,07	21,65	29,02	36,21	42,63	44,8	48,08

25 Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 150 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNT] = 200 mM, extracto enzimático = 0,67 mg/ml. Se tomaron muestras después de 3, 10, 15, 20, 30, 45, 61 y 115 min. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la actividad en [U/mg], en la que 1 U = producción de 1 μ mol de LNFP-II por min.

	LNFP-II [U/mg]
W135F-A174N-E413R	0,92
W135F-A174N-N274A-E413R	1,16

ES 3 013 132 T3

	LNFP-II [U/mg]
W135F-A174N-R232A-E413R	1,39
W135F-P165E-A174N-E413R	1,28
W135F-A174N-Q258R-E413R	1,31
W135F-A174N-D260P-E413R	1,09

C) En la reacción 3-FL + pLNnH \rightleftharpoons Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc + Lac

5 La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 100, [pLNnH] = 100 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de pLNnH fucosilada (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	23 horas
S168E-A174H-E413R (comparativo)	26,1	32,25	40,54	45,64	49,44	50,79	50,0
S168E-A174F (comparativo)	9,08	9,17	15,73	24,1	35,3	41,27	48,94
S168E-A174H-V282E (comparativo)	21,4	31,55	39,69	46,61	50,64	50,6	49,09
S168E-A174H-V221A (comparativo)	13,14	21,01	30,18	42,49	49,8	50,74	50,13
S168E-A174H-V221A-V282H (comparativo)	34,96	38,79	46,77	49,0	51,02	50,24	48,07
W135E-A174F-V221A (comparativo)	9,71	14,7	22,21	33,64	45,31	50,31	52,07
S168E-A174F-V221A-V282R (comparativo)	19,62	28,51	38,66	46,41	49,41	50,42	51,53
S168E-A174H-N216D (comparativo)	29,14	34,9	40,1	46,49	50,9	50,66	49,0
W135E-A174F-N216D-V221A (comparativo)	42,31	45,09	46,34	46,87	46,67	47,23	42,6
S168E-A174H (comparativo)	26,69	32,46	41,38	45,87	48,6	n.d.	n.d.

10 D) En la reacción 3-FL + LNFP-I \rightleftharpoons LNDFH-I + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 200 μ l), [3-FL] = 200 mM, [LNFP-I] = 200 mM, extracto enzimático = 0,5 mg/ml. HPLC: véase el Ejemplo 4 B). La tabla muestra la formación de LNDFH-I (%) en función del tiempo.

	15 min	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	23 horas
S168E-A174F (comparativo)	3,17	3,65	5,22	6,91	10,78	12,72	25,72
S168E-A174H-V221A (comparativo)	2,68	2,99	5,12	6,42	10,67	12,52	24,75
W135E-A174F-V221A (comparativo)	3,52	6,76	8,44	12,52	19,4	22,98	41,21
W135E-A174F-N216D-V221A (comparativo)	10,89	11,97	12,95	16,97	21,65	25,23	38,46

15 Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C 150 μ l), [3-FL] = 100 mM, [LNFP-I] = 50 mM, extracto enzimático = 10 μ l de extracto crudo. HPLC: véase el ejemplo 1. La tabla muestra la formación de LNDFH-I (%) en función del tiempo.

	7 min	220 min
W135E-A174F-E413R (comparativo)	6	40
W135Y-A174V-E413R (comparativo)	3	45
W135F-A174F-E413R	15	41
W135Y-A174F-E413R	28	52
W135Y-A174G-E413R (comparativo)	9	43
W135F-A174N-E413R	19	58
W135Y-A174N-E413R	20	57
W135Q-A174N-E413R (comparativo)	13	56
W135Y-A174S-E413R (comparativo)	14	47
W135F-A174S-E413R (comparativo)	11	52

20

ES 3 013 132 T3

Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 30 °C, 140 µl), [3-FL] = 50 mM, [LNFP-I] = 50 mM, extracto enzimático = 10 µl. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la formación de LNDFH-I (%) en función del tiempo.

	15 min	4,5 h
W135E-A174F-A236E (comparativo)	14	50
W135E-A174F-L238A (comparativo)	17	51
W135E-A174F-T239H (comparativo)	21	53
W135E-A174F-E241H (comparativo)	19	52

5 Se realizó otra prueba en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 150 µl), [3-FL] = 200 mM, [LNFP-I] = 200 mM, extracto enzimático = 0,67 mg/ml. Se tomaron muestras después de 3, 10, 15, 20, 30, 45, 61 y 115 min. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la actividad en [U/mg], en la que 1 U = producción de 1 µmol de LNDFH-I por min.

10

	LNDFH-I [U/mg]
W135E-A174F (comparativo)	0,44
W135E-A174F-E241A (comparativo)	0,58
W135E-A174F-A236H (comparativo)	0,59
W135F-A174N-E413R	0,58
W135F-A174N-N274A-E413R	0,76
W135F-A174N-R232A-E413R	0,75
W135F-P165E-A174N-E413R	0,68
W135F-A174N-Q258R-E413R	0,45
W135F-A174N-D260P-E413R	0,64

E) En la reacción $3\text{-FL} + 2'\text{-FL} \rightleftharpoons \text{DFL} + \text{Lac}$

15 La prueba se realizó en amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5, 37 °C, 150 µl), [3-FL] = 200 mM, [2'-FL] = 200 mM, extracto enzimático = 0,67 mg/ml. Se tomaron muestras después de 3, 10, 15, 20, 30, 45, 61 y 115 min. HPLC: véase el Ejemplo 1. La tabla muestra la actividad en [U/mg], en la que 1 U = producción de 1 µmol de 2'-FL por min.

	LFD [U/mg]
W135F-A174N-E413R	0,39
W135F-A174N-N274A-E413R	0,84
W135F-A174N-R232A-E413R	0,69
W135F-P165E-A174N-E413R	0,85
W135F-A174N-Q258R-E413R	0,49
W135F-A174N-D260P-E413R	0,36

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una α 1-3/4 transfucosidasa mutada que tiene una termoestabilidad incrementada y un rendimiento sintético de transfucosidasa incrementado y/o una actividad hidrolítica significativamente reducida, en comparación con la α 1-3/4 transfucosidasa silvestre de SEQ ID No. 1, que tiene:
- una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con SEQ ID No. 1, y
 - una mutación en las posiciones de aminoácido 135 y 174, y al menos una mutación adicional en una posición de aminoácido seleccionada de 168, 237 y 413, siendo la numeración de dichos aminoácidos según SEQ ID No. 1,
- 10 donde:
- en la posición 135, Trp (W) está sustituido por Phe (F) o Tyr (Y);
 - en la posición 168, Ser (S) está sustituida por Glu (E);
 - en la posición 174, Ala (A) está sustituida por Asn (N), His (H) o Phe (F);
 - en la posición 237, Glu (E) está sustituido por His (H);
 - en la posición 413, Glu (E) está sustituido por Arg (R).
- 15
- 20 2. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia de SEQ ID No. 1 que tiene las mutaciones citadas en la reivindicación 1.
- 25 3. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una mutación en la posición de aminoácido 168 o 413.
4. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 3, que tiene una mutación adicional en la posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274.
- 30 5. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 4, en la que la mutación en la posición de aminoácido seleccionada de 165, 232, 258, 260 y 274 se selecciona de las siguientes:
- en la posición 165, P165E,
 - en la posición 232, R232A,
 - en la posición 258, Q258R,
 - en la posición 260, D260P,
 - en la posición 274, N274A.
- 35
- 40 6. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 1, que tiene
- un porcentaje de identidad de al menos 96% con SEQ ID No. 1.
7. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 6, que tiene un porcentaje de identidad de al menos 97% con SEQ ID No. 1.
- 45
8. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 7, que tiene un porcentaje de identidad de al menos 98% con SEQ ID No. 1.
9. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según la reivindicación 8 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 99% con SEQ ID No. 1.
- 50
10. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la mutación en la posición 135 es W135F.
- 55 11. La α 1-3/4 transfucosidasa mutada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la α 1-3/4 transfucosidasa mutada es un mutante de la α 1-3/4 transfucosidasa silvestre aislada de *Bifidobacterium longum* subesp. *Infantis* ATCC 15697, y las mutaciones consisten en W135F, A174N, E413R y opcionalmente una única mutación adicional seleccionada del grupo que consiste en P165E, D260P, N274A y R232A.
- 60 12. Un procedimiento para elaborar una α 1-3/4 transfucosidasa mutada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una secuencia de ADN que codifica la α 1-3/4 transfucosidasa mutada, y a continuación
 - (b) expresar la α 1-3/4 transfucosidasa mutada en una célula anfitriona transformada con la secuencia de ADN obtenida en la etapa (a).
- 65

13. Un método para sintetizar un carbohidrato fucosilado que comprende la etapa de hacer reaccionar un donante de fucosilo y un aceptor de carbohidrato en presencia de un mutante de α 1-3/4 transfucosidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para transferir el residuo de fucosilo del donante de fucosilo al aceptor de carbohidrato;

5 preferiblemente donde el oligosacárido fucosilado es un α 1-3 o un α 1-4-fucosiloligosacárido, preferiblemente en el que el residuo de fucosilo está unido al resto glucosa del oligosacárido con un enlace α 1-3 o a un resto GlcNAc del oligosacárido con un enlace α 1-3 o α 1-4, más preferiblemente a un GlcNAc;
 10 más preferiblemente donde el oligosacárido fucosilado es un oligosacárido de leche humana, preferiblemente un oligosacárido de leche humana fucosilado en el que el residuo de fucosilo está unido al resto GlcNAc con un enlace α 1-3 o α 1-4, o DFL o SFL.

14. El método según la reivindicación 13, en el que el donante de fucosilo se selecciona de 3-FL o DFL y

- 15 - el aceptor es LNnT para formar LNFP-III;
 - el aceptor es LNT para formar LNFP-II;
 - el aceptor es LNFP-I para formar LNDFH-I;
 - el aceptor es LNnH para formar Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc y/o DFLNnH,
 20 - el aceptor es pLNnH para formar Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, o el donante es 3-FL y el aceptor es 2'-FL para formar DFL, y donde la α 1-3/4 transfucosidasa mutada es como se define en la reivindicación 3.

15. El método según la reivindicación 14, en el que el donante de fucosilo es 3-FL y el aceptor es

- 25 - LNnT para formar LNFP-III;
 - LNT para formar LNFP-II;
 - LNFP-I para formar LNDFH-I;
 - pLNnH para formar Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,
 30 - 2'-FL para formar DFL,

y donde la α 1-3/4 transfucosidasa mutante es como se define en la reivindicación 3 o 4.