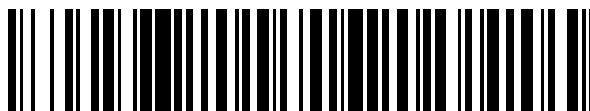


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 172**

51 Int. Cl.:

C12P 19/28 (2006.01)

C12P 19/30 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09832761 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2379735**

54 Título: **Biosíntesis de ácido CMP-legionamínico a partir de fructosa-6-P**

30 Prioridad:

16.12.2008 US 122973 P

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

16.12.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)**

**Building M-58, EG-06B 1200 Montreal Road
Ottawa, ON K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

**SCHOENHOFEN, IAN, C. y
LOGAN, SUSAN, M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 554 172 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

Biosíntesis de ácido CMP-legionamínico a partir de fructosa-6-P

5 Antecedentes de la invención

Los ácidos siálicos son una familia diversa de azúcares α -ceto que comparten un esqueleto estructural definido de 9 carbonos y normalmente son el resto más sobresaliente de los oligosacáridos sobre los glicolípidos y glicoproteínas de vertebrados. Generalmente están unidos a una cadena de azúcar subyacente a través de un enlace α -glicosídico entre su posición 2 (Fig. 1) y el grupo 3- o 6-hidroxilo de galactosa o *N*-acetilgalactosamina, el grupo 6-hidroxilo de *N*-acetilglucosamina, o pueden también existir como homopolímeros unidos en α 2,8 (Lehman et al., 2006). Con la presencia de varias sustituciones en sus posiciones 4, 5, 7, 8 y 9 (Varki y Varki, 2007), sus diversos enlaces, así como su prominente y accesible localización, no es sorprendente que esta diversa familia de azúcares media y/o modula una multitud de interacciones celulares. La adhesión y señalización intercelular a menudo es el resultado de proteínas de unión específica al ácido siálico, o lectinas, presentes en las superficies de las células de mamífero, más observadas por su importancia en la regulación del sistema inmunitario y en el desarrollo neuronal. Por ejemplo, las Siglecs (lectinas de la superfamilia de *Ig* que reconocen Sia) MAG y CD22 están implicadas en la unión de las células de la glía a los gangliósidos, que es crucial en la estabilidad a largo plazo de la mielina, así como la inhibición del sobrecrecimiento de neuritas, y en la regulación negativa de la función de los linfocitos B, respectivamente (Varki y Angata, 2006; Crocker et al., 2007; Varki, 2007). Además, la molécula de adhesión a las células neurales (NCAM) posee ácido polisialico unido por enlaces α 2,8, que es importante para el desarrollo del cerebro y la regeneración neural, aunque su expresión se correlaciona con un mal pronóstico para varios tumores neuroendocrinos (Bork et al., 2004). Otro ejemplo de ácido siálico que tiene significado pronóstico en el cáncer humano es la expresión potenciada de ácido siálico unido por enlaces α 2,6 sobre los N-glicanos, lo que se correlaciona con la progresión del cáncer, la diseminación metastásica y un mal pronóstico para el cáncer de colon, de mama y cervical, por citar algunos (Hedlund et al., 2008).

Es posible que la importancia de los ácidos siálicos en los seres humanos haya contribuido a la abundancia de los patógenos que exhiben, se unen o catabolizan ácido siálico. De hecho, actualmente los ácidos siálicos se reconocen como los receptores o ligandos más usados por los virus, las bacterias y protozoos patógenos (Lehman et al., 2006). Adicionalmente, las bacterias patógenas han obtenido la capacidad para exhibir ácidos siálicos en su superficie, bien mediante síntesis *de novo* o bien a través de mecanismos de secuestro específicos, que se cree que influyen sobre la patogenia a través de la evasión, adhesión e invasión inmunitaria (Hsu et al., 2006; Severi et al., 2007). Por ejemplo, las cápsulas de ácido polisialico de *Neisseria meningitidis* B y *Escherichia coli* K1 son poco inmunogénicas, probablemente debido a su mimetismo molecular con el ácido polisialico que se encuentra en NCAM. Además de usar los ácidos siálicos del huésped como fuentes de nutrientes, muchas bacterias patógenas poseen lectinas específicas de ácido siálico que ayudan a las interacciones huésped-patógeno y, en última instancia, a la patogenia. Es interesante destacar que también pueden desplegar lectina solubles, o toxinas, que se unen a sialoglicoconjugados, tales como la toxina del cólera AB₅ que reconoce el gangliósido GM1 (Angstrom et al., 1994; Merrit et al., 1998) y la toxina pertussis que reconoce el gangliósido GD1a (Hausman y Burns, 1993; Stein et al., 1994). Por último, se ha encontrado que un número creciente de patógenos protozoarios usan lectinas específicas de ácido siálico, tal como *Plasmodium* spp., el agente causante del paludismo (Lehman et al., 2006). Además, los tripanosomas poseen una trans-sialidasa en la superficie celular que permite que estos organismos se recubran con el ácido siálico derivado de mamíferos (Pontes de Carvalho et al., 1993).

Además de presentar ácidos siálicos en su superficie, las bacterias pueden incorporar azúcares de tipo ácido siálico (derivados de 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexo- α -nonulosonato) en su superficie celular asociados a virulencia, glicoconjugados como lipopolisacárido (LPS), polisacárido capsular, pelos y flagelos (Schoenhofen et al., 2006b). Estos azúcares (Fig. 1) son únicos de los microorganismos y pueden exhibir diferencias configuracionales en comparación con el ácido siálico. Un azúcar de tipo ácido siálico en particular, el ácido legionamínico (ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexo- α -D-glicero-D-galacto-nonulosónico; X), tiene la misma configuración absoluta como ácido siálico. El ácido legionamínico se identificó por primera vez en 1994 como componente de LPS de *Legionella pneumophila* del serogrupo 1, de ahí su nombre (Knirel et al., 1994). No obstante, no fue hasta 2001 que se obtuvo su estereoquímica correcta usando métodos sintéticos (Tsvetkov et al., 2001). *L. pneumophila*, el agente causante de la enfermedad del legionario, invade y se replica dentro de los macrófagos alveolares y produce una neumonía debilitante y en ocasiones mortal (Kooistra et al., 2002). El papel del ácido legionamínico en la progresión de esta enfermedad puede ser significativo, ya que se ha sugerido que el LPS es un determinante clave en la capacidad de *L. pneumophila* para inhibir la fusión de los fagosomas con los lisosomas (Fernandez-Moreira et al., 2006). El EPS de *L. pneumophila* de serogrupo 1 contiene tanto ácido legionamínico como su isómero 4-epímero el ácido 4-epi-legionamínico (Fig. 1), aunque la mayoría parece ser un homopolímero unido por enlaces α 2,4 de ácido legionamínico (Knirel et al., 2003). Es interesante el hecho de que el primer informe de un proteoglicano que contiene ácido legionamínico (X) era el reciente descubrimiento de este azúcar sobre las flagelinas del patógeno gastrointestinal *Campylobacter coli* (McNally et al., 2007). En el presente documento se ha identificado que una serie de genes de *Campylobacter* es crítica para su síntesis mediante detección selectiva de mutantes isogénicos de la presencia de metabolitos de ácido CMP-legionamínico (XI).

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- 5 (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, dinucleótido de nicotinamida adenina. (NAD) y LegB comprendidos en un vaso de reacción suministrado,
(b) recuperar de GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-alfa-D-xilo-hexos-4-ulosa.

- 10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar LegC, piridoxal-fosfato (PLP), y un donante de amino adicional comprendido en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- 15 (a) hacer reaccionar GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa, LegC, piridoxal-fosfato (PLP) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
(b) recuperar GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc.

- 20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, el donante de amino es el ácido L-glutámico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar una N-acetiltransferasa y acetil-CoA comprendido en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc.

- 25 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc, una N-acetiltransferasa, y acetil-CoA comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
30 (b) recuperar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la N-acetiltransferasa es LegH.

- 35 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar LegG y agua comprendidos en el recipiente de reacción, y en el que se recupera 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- 40 (a) hacer reaccionar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc, LegG y agua comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
(b) recuperar 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

- 45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente que comprende además hacer reaccionar LegI y fosfoenol piruvato (PEP), y en el que se recupera ácido legionamínico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente que comprende además hacer reaccionar trifosfato de citidina (CTP) y Me^{2+} , y en el que se recupera ácido legionamínico.

- 50

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- 55 (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, LegB, LegC, una N-acetiltransferasa, LegG, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), agua, acetil-CoA, piridoxal-fosfato (PLP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,
(b) convertir GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa con la LegB (deshidratasa) y NAD,
(c) convertir GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc con LegC, PLP y el donante de amino,
60 (d) convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc con N-acetiltransferasa y acetil-CoA,
(e) convertir GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con LegG y agua,
65 (f) convertir 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con LegI y PEP, y
(g) recuperar el ácido legionamínico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), LegB, LegC, piridoxal-fosfato (PLP), un donante de amino, una N-acetiltransferasa, acetil-CoA, LegG, agua, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), LegF, citidina trifosfato (CTP) y Me^{2+} comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,
- (b) convertir la GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa con LegB (deshidratasa) y NAD,
- (c) convertir GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc con LegC, PLP y el donante de amino,
- (d) convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc con N-acetiltransferasa y acetil-CoA,
- (e) convertir GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con LegG y agua,
- (f) convertir 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con LegI y PEP,
- (g) convertir ácido legionamínico en ácido CMP-legionamínico con LegF, Me^{2+} y CTP,
- y
- (h) recuperar ácido CMP-legionamínico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la N-acetiltransferasa es de este modo LegH.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa purificada o aislada.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un uso de LegB para convertir GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un uso de LegC para convertir GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc.

De acuerdo con otro aspecto mas de la invención, se proporciona un uso de LegH para convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de LegG para convertir GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un uso de LegG para convertir GDP-GlcNAc en ManNA.

Como se usa en el presente documento, ' Me^{2+} ' se refiere a cualquier catión divalente, por ejemplo, pero de ninguna manera se limita a, Mg^{2+} , Mn^{2+} y similares.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructuras de ácido siálico y azúcares de tipo ácido siálico. Se muestran ácido siálico (Neu5Ac; configuración D-glicero-D-galacto), ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac; configuración L-glicero-L-mano), ácido legionamínico (Leg5Ac7Ac; configuración D-glicero-D-galacto), ácido 4-epi-legionamínico (4eLeg5Ac7Ac; configuración de D-glicero-D-talo), y ácido 8-epi-legionamínico (8eLeg5Ac7Ac; configuración L-glicero-D-galacto). Se representan los anómeros termodinámicamente más estables, con grupos carboxilo ecuatoriales. Como referencia, se numeran los 9 átomos de carbono de ácido siálico.

Figura 2. La ruta biosintética del ácido CMP-legionamínico en *C. jejuni*. Esta ruta biosintética implica dos segmentos: 1) síntesis de un bloque componente de GDP-azúcar (a la izquierda de la línea discontinua), y 2) síntesis del CMP-nonulosonato final (a la derecha de la línea de puntos), que están unidos por la etapa enzimática que se muestra en gris. Las enzimas y compuestos intermedios biosintéticos de la ruta del ácido CMP-legionamínico en orden son: PtmA y PtmF, glutaminasa e isomerasa, respectivamente, que comprenden una GlcN-6-P sintasa; PgmL, fosfoglucosamina mutasa; PtmE, GlcN-1-P guanililtransferasa; GlmU, N-acetiltransferasa; LegB, 4,6-dehidratasa dependiente de NAD; LegC, aminotransferasa dependiente de PLP; LegH, N-acetiltransferasa; LegG, NDP-azúcar hidrolasa/2-epimerasa; LegI, ácido legionamínico sintasa; LegF, ácido CMP-legionamínico sintetasa; y (I) Fru-6-P; (II) GlcN-6-P; (III) GlcN-1-P (IV) GDP-GlcN; (V) GDP-GlcNAc; (VI) GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa; (VII) GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc; (VIII) GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-glucopiranososa; (IX) 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manopiranososa; (X) ácido legionamínico; (XI) ácido CMP-legionamínico. La asignación de números a cada compuesto es coherente con las designaciones de etiquetas que se encuentran en todo el texto. Por

simplicidad, todos los azúcares se muestran en forma 4C_1 , a excepción de los nonulosonatos y de Fru-6-P.

Figura 3. Una selección de las modificaciones de azúcar extracitoplasmático de la célula *Campylobacter*.

Estructuras glicosiladas representados son lipooligosacárido (cián), glicoproteínas periplásmicas unidos a *N* (púrpura), peptidoglicano (naranja y azul) y flagelos, un polímero de glicoproteínas flagelina unidas a *O* (verde y rojo). Los azúcares que se encuentran dentro de los recuadros difieren solo por su aducto de nucleótidos, una herramienta probablemente discriminadora para estas rutas de glicosilación. Cabe destacar aún no se han identificado las glicosiltransferasas responsables de la unión *O*-glicano a la flagelina. Las designaciones números romanos son coherentes con las que se encuentran en todo el texto y se refieren a los intermedios de ácido CMP-legionamínico identificados en este estudio. Las enzimas (números en gris) y los nombres de azúcar alternos se encuentran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Figura 4. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (12,5 %) de las enzimas biosintéticas de ácido CMP-legionamínico de *Campylobacter jejuni* 11168 después de la purificación en níquel-ácido nitrilotriacético. Calle 1, PtmAHis₆ (punta de flecha) y His₆PtmF (flecha); calle 2, PgmLHis₆; calle 3, His₆PtmE; calle 4, His₆GlmU; calle 5, LegBHis₆; calle 6, His₆LegC; calle 7, His₆LegH; calle 8, His₆LegG; calle 9, His₆LegI, calle 10, LegFHis₆. Los patrones de masa molecular se muestran a la izquierda en kDa.

Figura 5. Análisis por electroforesis capilar análisis de una reacción enzimática "en un solo recipiente" formando GDP-GlcN a partir de Fru-6-P. Una reacción PTME control (A) contenía inicialmente GlcN-1-P. (III), GTP, y His₆PtmE, mientras que la reacción "en un solo recipiente". (B) contenía Fru-6-P (I), GTP y cada uno de His₆PtmF, PtmAHis₆, PgmLHis₆ y His₆PtmE. Las ubicaciones de GTP, IV y el GDP- α -D-Glc también se indican en la figura. u.a., unidades arbitrarias.

Figura 6. Análisis por electroforesis capilar de los productos de reacción obtenidos después de la adición secuencial de LegBHis₆ (A), His₆LegC (B), His₆LegH (C), His₆LegGr (D) a GDP- α -D-GlcNAC. Las reacciones contenían GDP- α -D-GlcNAC 1 mM, NAD 0,5 mM, PLP, 8 mM L-Glu 0,8 mM, y acetil-CoA 1,5 mM según sea necesario. Las ubicaciones de GDP- α -D-GlcNAC (V), GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa (VI), GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAC (VII), GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII), NAD, CoA y GDP se indican en la figura. u.a., unidades arbitrarias.

Figura 7. Cinética y especificidad de sustrato de His₆LegG. (A) La reacción His₆LegG con GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII) se monitorizó directamente con espectroscopia de RMN de 1H . Los espectros de de RMN de 1H se adquirieron con el tiempo (min), como se indica, y se muestra la región de protones C-6 CH₃ de sustrato (VIII) y de producto (IX). (B) Análisis por electroforesis capilar de la reacción de His₆Leg con UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc después de la incubación durante 90 minutos a 37 °C y luego 16 horas a 25 °C; utilizando ~ 10 veces más enzima que en A. Las ubicaciones de UDP y UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc se indican dentro de la figura, donde u.a. son unidades arbitrarias.

Figura 8. Espectro de 1H y espectro de correlación de 1H - ^{13}C HSQC de ácido CMP-legionamínico (XI). Los espectros se registraron en un espectrómetro de 500 MHz Varian INOVA UNITY con secuencias de pulso estándar Varian en D₂O a 25 °C, con 4 exploraciones para el espectro 1H y 32 exploraciones para HSQC. C, citosina; R, ribosa; L, ácido legionamínico; NAC, regiones CH₃ de 5-NHAc y 7-NHAc de ácido legionamínico; y acetona se incluyó como referencia interna.

Figura 9. Flexibilidad del sustrato de His₆PtmE después de una incubación de 30 minutos a 37 °C.

Figura 10. Análisis CE-EM (modo de ion negativo) de la reacción His₆GlmU. (A) conversión del GDP-GlcN (IV) en GDP-GlcNAC (V). La reacción contenía inicialmente GDP-GlcN, acetil-CoA y His₆GlmU. (B) La conversión de GlcN-1-P (III) en GlcNAC-1-P. La reacción se llevó a cabo de forma similar a la anterior, excepto que se incluyó III en lugar de IV.

Figura 11. El producto formado a partir de la catálisis de His₆LegG de UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc. A partir de los datos preliminares de RMN de 1H y ^{13}C , el producto parece ser 6-desoxi-2,4-diacetamidoglucal.

Figura. 12. Las reacciones catalizadas por PtmA y PtmF. PtmF es una isomerasa que convierte la fructosa-6-fosfato (I) en glucosa-6-fosfato. PtmF en combinación con la glutaminasa PtmA, y en presencia de L-glutamina, también llevará a cabo una reacción de amidación que resulta en la conversión de fructosa-6-fosfato (I) en glucosamina-6-fosfato (II). Aunque estas reacciones enzimáticas no son nuevas, el hecho de que estos dos dominios enzimáticos se producen naturalmente como dos polipéptidos separados, PtmF y PtmA, es único.

Figura. 13. Las reacciones catalizadas por PgmL. PgmL es un fosfoglucosamina mutasa que convertirá glucosamina-6-fosfato (II) en glucosamina-1-fosfato (III), así como la glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato, sin adición exógena de glucosa-1,6- difosfato o glucosamina-1,6-difosfato que normalmente se requiere para otras enzimas fosfoglucosamina mutasa. PgmL junto con PtmF, PtmA y PtmE permitieron una síntesis en un solo recipiente del GDP-glucosamina (IV) a partir de fructosa-6-fosfato (I), una función importante para la producción *in vivo*.

Figura. 14. Las reacciones catalizadas por PtmE. PtmE es una NDP-azúcares pirofosforilasa o nucleotidiltransferasa que convertirá *N*-acetil-glucosamina-1-fosfato en CDP-*N*-acetil-glucosamina, el GDP-*N*-acetil-glucosamina (V) y TDP-*N*-acetil-glucosamina usando los nucleótidos CTP, GTP y TTP, respectivamente. También convertirá la glucosa-1-fosfato en GDP-glucosa utilizando el nucleótido GTP. Por último, cuando se usa un aceptor de azúcar de glucosamina-1-fosfato, es específico para GTP, se forma GDP-glucosamina (IV). Es esta última función la que probablemente sea su papel *in vivo*, y, por lo tanto, esta enzima puede denominarse glucosamina-1-fosfato guanililtransferasa. Según los conocimientos de los inventores, la función glucosamina-1-fosfato guanililtransferasa específica y eficiente es nueva.

Figura. 15. La reacción catalizada por GlmU. GlmU es bifuncional, siendo *N*-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa y glucosamina-1-fosfato (III) *N*-acetil-transferasa. Es una enzima bien establecida que convierte glucosamina-1-fosfato (III) en UDP-*N*-acetil-glucosamina en dos etapas. Los inventores notifican por primera vez que GlmU también puede convertir la GDP-glucosamina (IV) en GDP-*N*-acetil-glucosamina (V) catalizando la transferencia de *N*-acetilo a partir de acetil-CoA.

Figura. 16. La reacción catalizada por LegB. LegB es una GDP-*N*-acetil-glucosamina-4,6-deshidratasa dependiente de NAD⁺ que convertirá GDP-*N*-acetil-glucosamina (V) en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-*xilo*-hexos-4-ulosa (VI). Según los conocimientos de los inventores, tanto la actividad como el producto de LegB son nuevos.

Figura. 17. La reacción catalizada por LegC. LegC es una GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-*xilo*-hexos-4-ulosa aminotransferasa dependiente de PLP que convertirá GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-*xilo*-hexos-4-ulosa (VI) en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc (VII) en presencia de PLP y L-glutamato. Según los conocimientos de los inventores, la actividad, el sustrato y el producto de LegC son nuevos.

Figura. 18. La reacción catalizada por LegH. LegH es una GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc *N*-acetil-transferasa que convertirá GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc (VII) en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII) en presencia de acetil-CoA. Según los conocimientos de los inventores, la actividad, el sustrato y el producto de LegH son nuevos.

Figura. 19. La reacción catalizada por LegG. LegG es una GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc 2-epimerasa hidrolizante que convertirá GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII) en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man (IX). Según los conocimientos de los inventores, la actividad específica y el producto de LegG son nuevos.

Figura. 20. La reacción catalizada por LegI. LegI es una ácido legionamínico sintasa que convertirá 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man (IX) en ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexoxi-D-*glicero*-D-*galacto*-nonulosónico ácido o ácido legionamínico (X) por condensación de IX con piruvato, utilizando PEP y liberando fosfato inorgánico. Esta enzima proporciona una producción muy superior de X de lo indicado anteriormente.

Figura. 21. La reacción catalizada por LegF. LegF es una ácido CMP-legionamínico sintetasa que convertirá el ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexoxi-D-*glicero*-D-*galacto*-nonulosónico en ácido legionamínico (X) en ácido CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexoxi-D-*glicero*-D-*galacto*-nonulosónico o ácido CMP-legionamínico (XI) usando el CTP donante de NTP y liberando de pirofosfato.

Descripción detallada

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

El ácido legionamínico azúcar de importancia médica es difícil de sintetizar químicamente; por ejemplo, el uso de 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man y ácido oxaloacético da lugar a rendimientos de ácido legionamínico de sólo el 7 %. Sin embargo, utilizando los métodos descritos en el presente documento, se pueden obtener rendimientos sustancialmente cuantitativos, y en algunas realizaciones esencialmente cuantitativos, de ácido legionamínico (X) y ácido CMP-legionamínico (XI) a partir de GDP-GlcNAc *in vitro* y a partir de fructosa-6-P (I) *in vivo*. También se describe la participación de intermediarios unidos a GDP únicos, así como las enzimas biosintéticas PtmE, LegB, LegC, LegH y LegG que dan como resultado eficiencias biosintéticas enormemente mejoradas. Este método también permite una producción superior de 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man (IX), ácido legionamínico (X) y ácido CMP-legionamínico (XI) como se trata a continuación.

Como se discute en el presente documento, las enzimas en las rutas de síntesis descritas en el presente documento se denominan por sus designaciones de *Campylobacter* (Tabla 2). Sin embargo, como entenderá un experto en la técnica, hay otras especies conocidas que producen ácido legionamínico, por ejemplo, pero de ninguna manera se limita a, *Legionella*, *Clostridium*, *Campylobacter* y *Vibrio*. De acuerdo con lo anterior, debe entenderse que las enzimas a las que se hace referencia en el presente documento se refieren a actividades enzimáticas, no necesariamente a las enzimas específicas de *Campylobacter*. Por ejemplo, PtmF es una isomerasa y PtmA es una glutaminasa y PtmA/PtmF juntos son una glucosamina-6-fosfato sintasa con actividades de isomerasa y amidotransferasa. De un modo similar, PgmL se refiere a una fosfoglucomutasa o fosfoglucomutasa; PtmE se refiere a una NDP-azúcar pirofosforilasa o nucleotidiltransferasa, y dentro de las rutas descritas anteriormente, específicamente es una glucosamina-1-fosfato guanidiltransferasa; GlmU se refiere a una GDP-glucosamina *N*-acetiltransferasa; LegB se refiere a una GDP-*N*-acetil-glucosamina 4,6-deshidratasa dependiente de NAD; LegC se refiere a una GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-*xilo*-hexos-4-ulosa aminotransferasa dependiente de PLP; LegH se refiere a una GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc *N*-acetiltransferasa; LegG se refiere a una GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc-2-epimerasa hidrolizante; LegI se refiere a una ácido legionamínico sintasa; y LegF se refiere a una ácido CMP-legionamínico sintetasa. De acuerdo con lo anterior, las enzimas que tienen actividades similares de otros organismos capaces de la síntesis de ácido legionamínico pueden sustituirlas y están dentro del alcance de la invención. Es de notar que tales enzimas adecuadas pueden identificarlas fácilmente un experto en la técnica mediante diversos medios, por ejemplo, mediante la búsqueda en cualquiera de diversas

bases de datos, ya sea utilizando palabras clave o según la homología de secuencia. Por ejemplo, los números Cj para las enzimas biosintéticas de AEG son los mismos para los organismos *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. En la cepa Langeland de tipo F de *Clostridium botulinum*, los homólogos son:
PtmE – CLI_2778; LegB – CLI_2770; LegC – CLI_2769; LegG – CLI_2777; LegI – CLI_2775; LegF – CLI_2773.

5

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) y LegB comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,
- 10 (b) recuperar de GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-alfa-D-xilo-hexos-4-ulosa.

10

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar LegC, piridoxal-fosfato (PLP), y un donante de amino adicional comprendido en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc.

15

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- 20 (a) hacer reaccionar GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa, LegC, piridoxal-fosfato (PLP) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
- (b) recuperar GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc.

20

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el donante de amino es el ácido L-glutámico.

25

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar una N-acetiltransferasa y acetil-CoA comprendido en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc.

30

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc, una N-acetiltransferasa, y acetil-CoA comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
- (b) recuperar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc.

35

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la N-acetiltransferasa es LegH.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente, que comprende además hacer reaccionar LegG y agua comprendidos en el recipiente de reacción, y en el que se recupera 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

40

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc, LegG y agua comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y
- 45 (b) recuperar 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

45

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente que comprende además hacer reaccionar LegI y fosfoenol piruvato (PEP), y en el que se recupera ácido legionamínico.

50

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis como se ha descrito anteriormente que comprende además hacer reaccionar trifosfato de citidina (CTP) y Me²⁺, y en el que se recupera ácido legionamínico.

55

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, LegB, LegC, una N-acetiltransferasa, LegG, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), agua, acetil-CoA, piridoxal-fosfato (PLP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,
- 60 (b) convertir la GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa con LegB (deshidratasa) y NAD,
- (c) convertir la GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc con LegC, PLP y el donante de amino,
- (d) convertir la GDP-4-amino-4,6-didesoxi-α-D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc con la N-acetiltransferasa y la acetil-CoA,
- 65 (e) convertir la GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-α-D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con el

LegG y el agua,

(f) convertir 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con LegI y PEP, y

(g) recuperar el ácido legionamínico.

5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de síntesis que comprende:

(a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), LegB, LegC, piridoxal-fosfato (PLP), un donante de amino, una N-acetiltransferasa, acetil-CoA, LegG, agua, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), LegF, citidina trifosfato (CTP) y Me^{2+} comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,

10 (b) convertir la GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa con LegB (deshidratasa) y NAD,

(c) convertir la GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc con LegC, PLP y el donante de amino,

15 (d) convertir la GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc con la N-acetiltransferasa y la acetil-CoA,

(e) convertir la GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con el LegG y el agua,

(f) convertir 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con LegI y PEP,

20 (g) convertir el ácido legionamínico en ácido CMP-legionamínico con LegF, Me^{2+} y el CTP,

y
(h) recuperar ácido CMP-legionamínico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la N-acetiltransferasa es de este modo LegH.

25 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa purificada o aislada.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc. El GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc puede haberse producido mediante uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Cabe destacar que usos adecuados para la GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc purificada o aislada incluyen, pero de ninguna manera es limitante, la fabricación de composiciones farmacéuticas para uso como antivirales.

35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc. Como se usa en el presente documento, "aislado" significa que el compuesto en cuestión ha sido 'aislado', es decir, retirado, de su entorno nativo. Como se usa en el presente documento, "purificada" no necesariamente significa que el compuesto está en pureza absoluta sino que se ha purificado por ejemplo al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o similar. El GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc se puede sintetizar de acuerdo con uno cualquiera de los métodos adecuados descritos en el presente documento. Cabe destacar que usos adecuados para la GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc purificado o aislado incluyen, pero de ninguna manera es limitante, la fabricación de composiciones farmacéuticas para uso como antivirales.

45 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de LegB para convertir GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa. Preferiblemente, el uso se lleva a cabo *in vitro* o en una célula huésped recombinante como se discute en el presente documento.

50 En otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de LegC para convertir GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc. Preferiblemente, el uso se lleva a cabo *in vitro* o en una célula huésped recombinante como se discute en el presente documento.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de LegH para convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc. Preferiblemente, el uso se lleva a cabo *in vitro* o en una célula huésped recombinante como se discute en el presente documento.

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de LegG para convertir GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man. Preferiblemente, el uso se lleva a cabo *in vitro* o en una célula huésped recombinante como se discute en el presente documento.

60 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de LegG para convertir GDP-GlcNAc en -ManNA. Preferiblemente, el uso se lleva a cabo *in vitro* o en una célula huésped recombinante como se discute en el presente documento. Específicamente, como se usa en el presente documento, una "célula huésped recombinante" se refiere a una célula que normalmente no expresa LegG o es una célula que se ha modificado, por ejemplo, a través de la transformación de tal manera que el LegG se sobreexpresa, es decir, se presenta a niveles más altos en comparación con una célula silvestre o control o no transformada.

65 El 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man se puede convertir en ácido legionamínico con LegI en presencia de

fosfoenol piruvato (PEP) y se recupera el ácido legionamínico. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

Antes de la recuperación del ácido legionamínico, el ácido legionamínico se convierte en ácido CMP-legionamínico con LegF en presencia de trifosfato de citidina (CTP) y Me^{2+} y se recupera el CMP-legionamínico. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

La GDP-glucosamina se puede convertir en GDP-*N*-acetil-glucosamina con GlmU en presencia de acetil-CoA. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

Cabe destacar que los usos adecuados para el 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man recuperado, es decir aislado o purificado, ácido legionamínico o ácido CMP-legionamínico sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero de ningún modo se limitan a, la fabricación de composiciones farmacéuticas para uso como antivirales.

La *N*-acetil-glucosamina-1-fosfato se puede convertir en NDP-*N*-acetil-glucosamina con PtmE en presencia de nucleótido trifosfato (NTP), Me^{2+} y una pirofosfatasa. Específicamente, *N*-acetil-glucosamina-1-fosfato, en presencia de GTP, CTP o TTP, se convierte en GDP-GlcNAc, CDP-GlcNAc y TDP-GlcNAc respectivamente. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

La glucosamina-1-fosfato se puede convertir en GDP-glucosamina con PtmE en presencia de trifosfato de guanosina (GTP), Me^{2+} y una pirofosfatasa. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

La glucosamina-6-fosfato se puede convertir en glucosamina-1-fosfato con PgmL. Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

La fructosa-6-fosfato se puede convertir en glucosamina-6-fosfato con PtmA y PtmF en presencia de un donante de nitrógeno. El donante de nitrógeno puede ser cualquier donante de nitrógeno adecuado, por ejemplo, L-glutamina (Gln) amoníaco o L-asparagina (Asn). Como apreciará un experto en la técnica, en algunas realizaciones, por ejemplo ciertas realizaciones *in vitro*, se puede añadir un agente reductor, por ejemplo, pero de ninguna manera limitado a, ditionitrotol (DTT). Esta etapa adicional se puede aplicar a otros métodos de síntesis apropiados descritos en el presente documento.

El 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man se puede convertir en ácido legionamínico con LegI en presencia de fosfoenol piruvato (PEP) y se recupera el ácido legionamínico.

Antes de la recuperación del ácido legionamínico, el ácido legionamínico puede convertirse en ácido CMP-legionamínico con LegF en presencia de trifosfato de citidina (CTP) y Me^{2+} y se recupera el CMP-legionamínico.

El ácido legionamínico se puede convertir en ácido CMP-legionamínico con LegF en presencia de CTP y Me^{2+} y se recupera el CMP-legionamínico.

La *N*-acetiltransferasa se refiere a una enzima tal como, por ejemplo LegH o PgLD, que lleva a cabo la reacción de *N*-acetilación enzimática o a métodos químicos de acetilación que son bien conocidos para un experto en la técnica. Específicamente, los métodos químicos adecuados para la acetilación de los compuestos en cuestión pueden optimizarlos fácilmente con experimentación de rutina un experto en la técnica. Como apreciará un experto en la técnica, se pueden hacer sustituciones de las enzimas mencionadas anteriormente, siempre que la enzima sustituyente tenga suficiente afinidad por el sustrato de manera que la eficiencia de la síntesis global no se vea comprometida en una medida indeseable.

Como apreciará un experto en la técnica, el 'recipiente de reacción' puede ser un sistema de síntesis *in vitro* o una célula huésped recombinante diseñada para comprender las enzimas apropiadas según lo indicado anteriormente. En realizaciones en las que la síntesis es *in vitro*, el recipiente de la reacción puede incluir además o comprender un tampón de reacción adecuado como será bien conocido por los expertos en las técnicas bioquímicas. Como apreciará un experto en la técnica, esto se puede realizar mediante el diseño de la célula huésped para expresar las enzimas no nativas enumeradas anteriormente para el método de síntesis. La célula huésped recombinante puede ser procarionte o eucariote. En una realización preferida, la célula huésped recombinante es una célula bacteriana, más preferiblemente la célula huésped recombinante es de una cepa bacteriana que tiene UDP-GlcNAc usando rutas pero que normalmente no produce los productos finales mencionados anteriormente. En otras realizaciones, se proporciona la condición de que la célula huésped no sea una célula productora de forma natural de ácido legionamínico, tales como *Pneumophila Legionella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* o *Clostridium botulinum*. Sin embargo, como apreciará un experto en la técnica, como resultado de los métodos descritos en el presente documento, las células huésped recombinantes de estos organismos en los que una o más de las enzimas mencionadas anteriormente se sobreproducen, es decir, se sintetizan o expresan a un nivel mayor que en una célula de tipo silvestre comparable pueden diseñarse dentro del alcance de la invención.

Dado que muchas rutas de biosíntesis de carbohidratos bacterianos, incluyendo el metabolismo de hexosamina, proceden a partir de fructosa-6-fosfato, los genes biosintéticos o métodos de síntesis descritos anteriormente se pueden utilizar para el diseño de células recombinantes productoras de GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII), ácido legionamínico (X) o ácido CMP-legionamínico (XI), por ejemplo, células de *Escherichia coli*, aunque como apreciará un experto en la técnica también se pueden usar otros organismos adecuados, como se ha tratado anteriormente. Puesto que los inventores han descrito los genes necesarios para la conversión de fructosa-6-fosfato en VIII, X o XI, las materias primas adecuadas industriales, tales como glucosa, fructosa, glicerol, maltosa o N-acetil-glucosamina, se pueden utilizar para esta producción *in vivo* de *E. coli*. Las células de *E. coli* diseñadas por ingeniería pueden ser similares a las de Lundgren y Boddy (2007), sin embargo las células incorporarían los genes de los inventores para la producción de I-VIII, IX o I-XI.

El ácido legionamínico azúcar de tipo ácido siálico se encuentra como glicoconjugado de superficie asociado con la virulencia asociada en *Legionella pneumophila* y *Campylobacter coli*. En este trabajo, los inventores han purificado y caracterizado bioquímicamente once enzimas biosintéticas candidatas a partir de *C. jejuni*, de modo que reconstituyen completamente la biosíntesis de ácido legionamínico (X) y su forma CMP activada (XI), a partir de fructosa-6-P (I). Esta ruta implica intermediarios unidos a GDP únicos y proporciona un medio fácil para la eficiente síntesis a gran escala de un mimético de ácido siálico importante (Figura 2; Tablas 1 y 2).

El esclarecimiento de la ruta del ácido legionamínico dentro de *Campylobacter* se basó en gran medida en un enfoque "holístico" que implica análisis bioinformáticos, de genómica comparativa, metabolómicos y funcionales. Una de las ideas más importantes fue la consideración de que esta ruta puede implicar intermediarios unidos nucleótidos alternativos. Como está bien documentado que los diferentes nucleótidos dentro de los NDP-azúcares permiten la separación de las rutas biosintéticas y esto es importante porque proporciona un medio para su control y regulación independientes, se creía que la ruta del ácido legionamínico dentro de *Campylobacter* puede ser selectiva para NDP distintos de UDP. Esto facilitaría su separación de las rutas de *Campylobacter* similares que usan UDP coexistentes, tales como las de ácido pseudamínico y 2,4-diacetamido-bacilosamina (Fig. 3). Varios hallazgos iniciales apoyaron esta hipótesis y son como sigue. En primer lugar, Cj1329, se encontró que un miembro del locus de glicosilación de la flagelina de *Campylobacter* (Cj1293-Cj1344) exhibía similitud de secuencia con NDP-azúcar pirofosforilasas o nucleotidiltransferasas, y, en particular, posee motivos similares al activador característico (G-X-G-T-R-X₂-P-X-T) y los dominios de unión de azúcar ((E-E-K-P) encontrados dentro de las NDP-glucosa pirofosforilasas (Silva et al., 2005). Además de los componentes esperados de la ruta Cj1328, Cj1327 y Cj1331 (homólogos NeuC, B y A), también se encontró que los productos génicos Cj1329, Cj1330 y Cj1332 eran necesarios para la acumulación de ácido CMP-legionamínico (XI) en el metaboloma de *E. coli* (McNally et al., 2007). El requisito de una posible nucleotidiltransferasa apoyó la hipótesis de los inventores y sugirió que algunos miembros del locus Cj1293-Cj1344 pueden ser responsables de la producción de un precursor de azúcar-1-P. Tras un examen más intenso, se encontró que Cj1332 y Cj1330 compartían una similitud de secuencia muy limitada con los dominios en N-terminal de glutaminasa y en C-terminal de amidación / isomerasa, respectivamente, de la glucosamina-6-P sintasa, una enzima clave del metabolismo de la hexosamina (Mouilleron et al., 2006). Esto fue muy sorprendente, ya que la glucosamina-6-P sintasa contiene ambos de estos dominios dentro de un polipéptido, y las enzimas Cj1330 / Cj1332 serían el primer informe en el que estos dominios se están produciendo de forma natural como dos polipéptidos separados. La hipótesis de los inventores fue respaldada por los rendimientos biosintéticos muy limitados de XI obtenidos al utilizar los homólogos NeuC, B y A de *Campylobacter* (Cj1328, Cj1327 y Cj1331) con intermediarios unidos a UDP derivados de la enzima Pgl (Fig. 3). Curiosamente, Glaze et al. (2008) informaron recientemente de dificultades similares, es decir malos rendimientos de XI, cuando se usan los mismos intermediarios unidos a UDP derivados de la enzima Pgl con los homólogos NeuC, B y A de *L. pneumophila*. En el resto de el presente documento se discutirán los hallazgos de análisis funcionales *in vitro* de once enzimas producidas de forma recombinante y purificadas por afinidad a partir de *C. jejuni* 11168 (Fig. 4). Para la nomenclatura correspondiente y la función enzimática asociada a determinados números de Cj, consulte **Tabla 2** y las Figs. 12–21.

Biosíntesis de GDP-glucosamina

Otra prueba de que Cj1330 (PtmF) y Cj1332 (PtmA) funcionan en tándem como glucosamina-6-P sintasa (GlcN-6-P sintasa) fue la estabilización observada de PtmF mediante copurificación con PtmA. Los intentos de aislar solamente PtmF dieron lugar a agregados que no pudieron entrar en los geles de poliacrilamida-SDS al 12,5 %. Cuando PtmF y PtmA se copurificaron, el péptido PtmF todavía parecía agregarse, como se indica por la presencia de una especie de mayor peso molecular adicional mediante SDS-PAGE (Fig. 4), aunque en un grado mucho menor. Como se observó para otras, las GlcN-6-P sintasas (Teplyakov et al., 1999), se encontró que PtmF y PtmA convertían de manera eficiente fructosa-6-P (I) en glucosamina-6-P (II) o glucosa-6-P dependiendo de la presencia o ausencia de L-glutamina, respectivamente (Fig. 12). Que se sepa, este es el primer informe de una GlcN-6-P sintasa cuyos dominios funcionales, glutaminasa e isomerasa, no se fusionan naturalmente, cuyo significado se desconoce actualmente.

La siguiente etapa comprometida en la biosíntesis bacteriana de hexosamina implicaría la conversión de IIa en glucosamina-1-P (III) por un mutasa fosfoglucosamina. La mutasa apropiada estaba clara, y como tal, se tuvo que buscar fuera del locus de glicosilación flagelar. Dado que la GlcN-6-P sintasa es la enzima limitante de la velocidad

en el metabolismo de la hexosamina, se creía que una mutasa "constitutiva" general podría ser suficiente para realizar las interconversiones necesarias para la glicosilación de la flagelina. Originalmente, se analizaron Cj0360 o GlrNM, una proteína mutasa anotada. Aunque, sólo parecía acumular GlcN-1,6-diP a partir de de **II**. Sorprendentemente, el gen Cj1407c también fue anotado como una fosfoglucomutasa, que causalmente está yuxtapuesta a *fljL* (Cj1408), un componente flagelar que se localiza en la cara citoplasmática del anillo MS del cuerpo basal flagelar en *Campylobacter*. Cj1407c, ahora anotada como PgmL por su implicación en la ruta del ácido legionamínico, catalizó la interconversión de **II** en **III** (Fig. 13) sin la adición exógena de Glc-1,6-diP o GlcN-1,6-diP que normalmente se requiere para las enzimas GlmM (Mengin-Lecreux y van Heijenoort, 1996; Jolly et al., 1999), y permitió una síntesis enzimática "en un solo recipiente" de GDP-GlcN (**IV**) (véase más adelante). Cj1407c o PgmL también pudieron convertir Glc-6-P en Glc = 1-P (Fig. 13).

Al determinar el nucleótido utilizado por la ruta del ácido legionamínico, inicialmente los inventores buscaron en la especificidad de la nucleotidiltransferasa. Se encontró que Cj1329, o PtmE, eran absolutamente específicos de GTP en las reacciones que implican **III** (Figs. 9 y 14). Cabe destacar que esto permitió la producción a gran escala y purificación de **GDP-GlcN (IV)** (Fig. 5a y Tabla 5). Además, cuando se utiliza GlcNAc-1-P como un aceptor de azúcar, PtmE exhibió promiscuidad con respecto a los donantes de NTP activador (Figs. 9 y 14). Esto permitió la producción a gran escala y la purificación de GDP-GlcNAc (**V**), CDP-GlcNAc y TDP-GlcNAc (Tablas 1y 5) para realizar más pruebas dentro de la ruta. Dado que los eucariotas acumulan GlcNAc-1-P principalmente debido a las acciones de una glucosamina-6-P *N*-acetiltransferasa (Buse et al., 1996), los inventores se sorprendieron de la promiscuidad del donante de NTP de PtmE con un aceptor de azúcar GlcNAc-1-P. Sin embargo, los inventores supusieron que las células bacterianas, posiblemente, acumulan **GlcN-1-P** en lugar de GlcNAc-1-P debido a la naturaleza bifuncional de la enzima GlmU formadora de UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreux y van Heijenoort, 1994), y que tal vez la función natural de PtmE dentro de la ruta del ácido legionamínico es la formación de GDP GlcN (**IV**) a partir de GlcN-1-P (**III**). Si este escenario es correcto, se esperaría que la ruta del ácido legionamínico utilizara precursores de nucleótidos de guanina. En última instancia, esto se conformó mediante análisis adicional de los componentes de la ruta (véase más adelante). Además, PtmE exhibió especificidad para la configuración C4 de Glc porque no observó ninguna actividad cuando se utiliza GalN-1-P (Fig. 9), pero se observó actividad con Glc-1-P, GlcN-1-P y GlcNAc-1-P (Fig. 14). Cabe destacar que *ptmE* contiene una secuencia adicional aguas arriba de función desconocida llamada un dominio CBS (originalmente encontrada en cistationina beta-sintasa), que puede estar involucrada en algún nivel de regulación.

La eficiencia de estas enzimas NDP-hexosamina se demostró mediante la producción de **IV** a partir de una reacción enzimática en "un solo recipiente" que implica PtmF, PtmA, PgmL y PtmE, comenzando desde **I** (Fig. 5). Además de **IV**, la acumulación de GDP-Glc también se observó en la reacción "en un solo recipiente", una consecuencia de la producción por PtmF/PtmA de Glc-6-P tras la depleción de L-glutamina, así como la promiscuidad de las enzimas aguas abajo. Las identidades de los dos productos observados en la Fig. 5b se confirmaron mediante purificación adicional y CE-EM análisis, análisis de RMN (Tabla 5) y comparaciones con una preparación de control de **IV** (Fig. 5a).

40 Conversión de GDP-GlcN en GDP-GlcNAc:

Dado que síntesis del ácido legionamínico (**X**) que cabría esperar para utilizar un azúcar 2,4-diacetamido-hexosa, la suposición era que un intermedio de GDP-HexNAc se introdujera en la ruta nonulosonato, reduciendo así el número de manipulaciones enzimáticas requeridas, es decir, **IV** no era el bloque componente nonulosonato inicial. Esto se confirmó después, ya que la enzima de la ruta de nonulosonato inicial mostraba preferencia por el grupo *N*-acetilo de **V** (véase más adelante). De todas las manipulaciones enzimáticas que conducen al precursor de la ruta de nonulosonato **V**, es esta etapa en la que los inventores tienen más inseguridad. Dado que la enzima bifuncional GlmU formadora de UDP-GlcNAc que es responsable de la conversión de **III** en GlcNAc-1-P con la posterior uridilación, es capaz de convertir UDP-GlcN en UDP-GlcNAc en eficiencias bajas (Pompeo et al., 2001), los inventores han tratado de determinar si GlmU de *Campylobacter* podía *N*-acetilar **IV**. Este GlmU se encontró que convertía **IV** en **V**, pero no hasta el final como se ve con una reacción control de *N*-acetilación utilizando su sustrato natural **III** en lugar de **IV** (Figs. 10 y 15). Actualmente, se están evaluando otras *N*-acetiltransferasas putativas del locus de glicosilación flagelar, tales como Cj1296/97, Cj1321 y Cj1322/23, para determinar su capacidad para catalizar la conversión eficiente de **IV** en **V**. Finalmente, los inventores no creen que la ruta inicialmente proceda **I** → **II** → **III** → GlcNAc-1-P → **V**, ya que la naturaleza promiscua de PtmE con GlcNAc-1-P probablemente daría lugar a la síntesis disminuida de **V**, pero no se puede descartar esta posibilidad. Es importante destacar que el esquema sugerido de los inventores (Figura 2) también permitiría que PtmE actuara sobre abundantes niveles de **III** endógeno.

60 Biosíntesis de ácido CMP-legionamínico a partir de GDP-GlcNAc.

El uso de los conocimientos adquiridos en la aclaración de la ruta del ácido CMP-pseudamínico en *Helicobacter pylori* (Schoenhofen, Lunin et al., 2006; Schoenhofen, McNally, Brisson et al., 2006; Schoenhofen, McNally, Vinogradov et al., 2006), los inventores comenzaron a desentrañar la ruta biosintética para **XI**, cuyos resultados se resumen en la Figura 2 y la Tabla 1. Recientes hallazgos metabólicos descartaron Cj1319 (LegB) y Cj1320 (LegC), la única deshidratasa putativa restante y aminotransferasa que queda en el locus de glicosilación flagelar de

Campylobacter, por tener un papel en la síntesis de ácido legionamínico (McNally et al., 2007), aunque los inventores encontraron que estas manipulaciones enzimáticas eran necesarias dentro de la ruta. Al examinar la capacidad de LegB para actuar como deshidratasa, los inventores descubrieron que realizaban la deshidratación en C4,6 de **V** (**Fig. 16**). Inicialmente sólo incluyeron reacciones **V** y LegB, pero fracasaron. Dado que NAD (P)⁺ normalmente está estrechamente acoplado a estas enzimas particulares y es un cofactor necesario para la reacción deshidratasa C4,6, los inventores han añadido NAD⁺ y NADP⁺ exógenamente en reacciones separadas. Al hacerlo, se encontró que LegB para catalizaba la rotación eficiente de **V** de un modo dependiente de NAD⁺ formando el producto de GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa (**VI**; **Figs. 6a y 16**). Cabe destacar que otras reacciones de LegB, en presencia o ausencia de NAD (P)⁺, con **IV**, UDP-GlcNAc, CDP-GlcNAc, TDP-GlcNAc y TDP-Glc no dieron un producto discernible.

Además, LegC catalizó la aminotransferencia eficiente de **VI**, formando GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc (**VII**) de una manera dependiente de PLP (**Figs. 6b y 17**). LegC es específico del intermedio GDP-ceto **VI**, ya que fue incapaz de convertir los intermedios UDP-ceto del ácido pseudamínico o las tutas de 2,4-diacetamido-bacilosamina (**Fig. 3**), lo que apoya adicionalmente su papel en la síntesis de ácido legionamínico. La discrepancia metabólica *in vivo* y enzimática *in vitro* de LegB/LegC puede explicarse por la posible comunicación de bajo nivel de los intermedios de la ruta dentro de Campylobacter. Esto se ve reforzado adicionalmente por la observación de los inventores de que se pueden obtener niveles bajos de **XI** por el uso de productos intermedios unidos a UDP de la ruta de Pgl 2,4-diacetamido-bacilosamina.

La siguiente etapa prevista en la síntesis de **XI** involucraría la *N*-acetilación de **VII** por una transferasa respectiva. Dado que hay varias de estas transferasas no caracterizadas en el locus de glicosilación de la flagelina de Campylobacter (Cj1296/97, Cj1298, Cj1321 y Cj1322/23), inicialmente los inventores intentaron reacciones con PglD, una *N*-acetiltransferasa implicada en la biosíntesis de Pgl 2,4-diacetamido-bacilosamina (**Fig. 3**) (Olivier et al., 2006). El sustrato normal de PglD es idéntico a **VII** solo está unido a UDP. Para sorpresa de los inventores, PglD fue capaz de catalizar la *N*-acetiltransferencia de **VII**, formando GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (**VIII**). Aunque, la eventual detección de Cj1298 (LegH) exhibió velocidades catalíticas mucho mayores, dando como resultado un 100 % de conversión de **VII** en **VIII** (**Figs. 6c y 18**). Como tal, LegH es probablemente un componente dedicado de la biosíntesis de ácido legionamínico. Es importante destacar que esta complementación cruzada *in vitro* de la función de LegH por PglD puede haber impedido su identificación inicial mediante detección metabólica *in vivo*. Es importante destacar que, sin la identificación *in vitro* de LegB, LegC y LegH, la producción enzimática eficiente de **VIII** y los intermedios / productos posteriores no serían posibles.

Probablemente, el punto de control más crítico entre las rutas de Pgl glicano y de ácido legionamínico dentro de Campylobacter es la reacción catalizada por el homólogo de NeuC Cj1328 (LegG). Cabe esperar que esta enzima realice una epimerización de C2 que resulta en la eliminación de NDP, y, de hecho, se encontró que LegG eliminaba de manera eficiente el NDP del sustrato **VIII** (**Fig. 6d**). Después de examinar el producto de azúcar formado, mediante la realización de reacciones de RMN "en tubo", se observó la catálisis eficiente de **VIII**, de tal manera que la formación de 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man (**IX**) estaba a punto de completarse en 75 minutos utilizando sólo 4 μ g de LegG (**Figs. 7a y 19**). Usando condiciones similares, **IX** no se observó cuando el producto de UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc, se utilizó como sustrato. Aunque, cuando los inventores aumentaron la cantidad de LegG 10 veces dentro de esta reacción, se observó la eliminación de UDP (**Fig. 7b**), pero no del producto **IX**. En cambio, los inventores observaron pequeñas cantidades de 6-desoxi-2,4-diacetamidoglucal (**Fig. 11**), un candidato poco probable para la siguiente reacción de condensación. Como los inventores fueron capaces de generar pequeñas cantidades de **XI** utilizando el intermedio unido a UDP anterior, similar a los hallazgos recientes de Glaze et al. (2008), es posible que el producto glucal, o cantidades no detectables de **IX**, puede condensarse ineficientemente con piruvato en la siguiente etapa enzimática. Sin embargo, se concluyó que la ruta sintética natural es como se resume en la **Figura 2**. Cabe destacar que LegG también se encontró que catalizaba el recambio de **V** con una eficacia moderada según la evaluación de CE, que puede ser un medio alternativo de acumular el precursor de ácido siálico ManNAc en Campylobacter. Esta es la razón por la cual la biosíntesis a gran escala de **X** de los inventores implicó dos "reacciones "en un solo recipiente" separadas (es decir, **V** $\rightarrow$ **VIII**, después **VIII** $\rightarrow$ **X**).

Por último, los papeles de los homólogos de Neub y Neua Cj1327 (LegI) y Cj1331 (LegF), respectivamente, se confirmaron. LegI catalizó la condensación de **IX** con piruvato para formar **X**, Mientras que LegF activó con CMP eficientemente el **X** (**Tabla 1**; **Figs. 20 y 21**).

En resumen, los inventores han descrito un método fácil y eficaz para la preparación enzimática de **XI** (**Fig. 8**) y los intermedios de la ruta correspondientes. Dado que los rendimientos sintéticos obtenidos a partir de métodos químicos son bajos, sólo el 7 % de la condensación de **IX** con ácido oxalacético (Tsvetkov et al., 2001), el método enzimático de los inventores proporciona una alternativa sintética atractiva. Y, ya que los inventores han definido las capas enzimáticas de NDP-hexosamina a partir de **I**, la ingeniería de las cepas productoras de *E. coli* es ahora posible (Lundgren y Boddy, 2007), con eficiencias de producción que superan con mucho las de los métodos enzimáticos *in vitro*.

Procedimientos experimentales

Expresión y purificación de la proteína marcada con His₆

La construcción y secuenciación de ADN plasmídico fueron similares a los métodos descritos previamente (Schoenhofen et al., 2006a; Schoenhofen et al., 2006b). El vector o los plásmidos recombinantes se transformaron por electroporación en células de *Escherichia coli* TTop10F' o DH10B electrocompetentes (Invitrogen) para fines de clonación o células *E. coli* BL21 [DE3] (Novagen) para la producción de proteínas, a excepción del clon de expresión pNRC51.1 que se sometió a electroporación en células de *E. coli* BL21 CodonPlus-[DE3]-RIL (Novagen). La PCR se usó para amplificar el ADN de *Campylobacter jejuni* 11168 para la posterior clonación. Una lista de los vectores de clonación y plásmidos recombinantes se proporciona en la **Tabla 6** y los oligonucleótidos correspondientes se proporcionan en **Tabla 7**. Los plásmidos de nueva construcción son: pNRC145.3, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1330 o PtmF; pNRC141.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en C-terminal de Cj1332 o PtmA; pNRC173.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en C-terminal de Cj1407c o PgmL; pNRC136.1; que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1329 o PtmE; pNRC175.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj0821 o GlmU; pNRC16.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en C-terminal de Cj1319 o LegB; pNRC83.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1320 o LegC; pNRC164.3, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1298 o LegH; pNRC134.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1328 o LegG; pNRC51.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en N-terminal de Cj1327 o LegI; y pNRC139.1, que codifica un derivado marcado con His₆ en C-terminal de Cj1331 o LegF.

Normalmente, cada cepa de expresión se cultivó en 1 a 2 l de triptona de levadura 2x (Schoenhofen et al., 2006a), dependiendo del nivel de expresión, ya sea con kanamicina 50 µg ml⁻¹, ampicilina (75 µg ml⁻¹) o ampicilina y cloranfenicol (100 µg ml⁻¹ y 40 µg ml⁻¹) para la selección. Los cultivos se cultivaron a 30 °C, se indujeron a una DO₆₀₀ de 0,6 con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido 0,1 mM y se recogieron 2,75 horas más tarde. Para las enzimas biosintéticas de la 'GDP-hexosamina' (PtmF, PtmA, PgmL, y PtmE), los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) que contenía imidazol 10 mM y mezcla completa de inhibidor de la proteasa, libre de EDTA (Roche Ciencias Aplicadas). Después de la adición de 10 µg ml⁻¹ de DNasal (Roche Applied Science), las células se rompieron mediante dos pases a través de un Emulsiflex C5 (20.000 psi = aprox. 138 x 10⁶ Pa). Los lisados se centrifugaron a 100.000 xg durante 50 min a 4 °C y la fracción sobrenadante se aplicó a una columna de 2 ml de níquel-ácido nitrilotriacético (Qiagen) equilibrada en de tampón de lisis de imidazol 10 mM, utilizando un caudal de 1 ml min⁻¹. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lisis imidazol 10 mM. Para eluir la proteína de interés, se aplicó un gradiente lineal de 10 a 100 mM de imidazol, en tampón de lisis, sobre 25 volúmenes de columna a la columna antes de un pulso final de 20 volúmenes de columna de tampón de lisis imidazol 200 mM. Las fracciones que contenían la proteína de interés purificada, según lo determinado mediante SDS-PAGE (12,5 %) y la tinción de Coomassie, se agruparon y se dializaron frente a tampón de diálisis (Tris 25 mM, pH 7,5) durante la noche a 4 °C. Al purificar PtmE para la producción "a gran escala" de NDP-azúcares, el tampón de diálisis contenía Tris 50 mM a pH 7,5. Además, PtmF y PtmA se purificaron combinando los respectivos sedimentos celulares se resuspendidos antes de la lisis celular. Para las enzimas biosintéticas de 'nonulosonato' (LegB, LegC, LegH, LegG, LegI y LegF) y GlmU, la purificación fue similar a la anterior, excepto que el tampón de lisis contenía fosfato de sodio 50 mM en lugar de Tris y el tampón de diálisis consistió en fosfato de sodio 25 mM, NaCl 25 mM. El pH se ajustó de 7,3 a 7,8, dependiendo de la pi teórica de cada proteína. Además, el tampón de diálisis para GlmU contenía adicionalmente β-mercaptoetanol 10 mM. La concentración de proteínas se midió por espectrofotometría utilizando valores de A₂₈₀ 0,1 % (PgmLHis₆, 0,693; His₆PtmE, 0,513; His₆GlmU, 0,517; LegBHis₆, 0,892; His₆LegC, 0,625; His₆LegH, 1,06; His₆LegG, 0,432; His₆LegI, 0,242; LegFHis₆, 0,385; y la concentración de proteínas se estimó para preparaciones de His₆PtmF/PtmAHis₆ utilizando un valor promedio al 0,1 % de 0,82). Los rendimientos de la proteína purificada fueron normalmente de 20 mg l⁻¹ de cultivo de células, a excepción de His₆LegC, His₆LegH y His₆LegI con rendimientos de 6, 2,5 y 7,5 mg l⁻¹ de cultivo celular, respectivamente.

Reacciones enzimáticas y purificación de metabolitos

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo durante 4,5 horas a 37 °C, y luego durante la noche a 25 °C, con aproximadamente 200 µg ml⁻¹ de la concentración de proteínas respectivas utilizando productos químicos de Sigma (a menos que se indique lo contrario). **Biosíntesis de GDP-glucosamina** La síntesis enzimática "en un solo recipiente" de GDP-GlcN a partir de Fru-6-P (I→IV) se consiguió usando una reacción de 3 ml que contenía His₆PtmF, PtmAHis₆, PgmLHis₆, His₆PtmE, Fru-6-P (I) 5 mM, L-Gln 10 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM, 0,8 U ml⁻¹ de pirofosfatasa, y GTP 2,5 mM en Tris 25 mM a pH 7,5. La síntesis enzimática a gran escala de GDP-GlcN (IV) se consiguió usando una reacción de 12 ml que contenía Tris 50 mM a pH 7,5, GTP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,8 U ml⁻¹ de pirofosfatasa, GlcN-1-P (III) 1,2 mM y aproximadamente 4,8 mg de His₆Ptm. La síntesis enzimática a gran escala de GDP-GlcNAc se realizó de forma similar a la anterior, excepto que la escala se incrementó cinco veces y se usó GlcNAc-1-P en lugar de GlcN-1-P (III). La evaluación de la especificidad de sustrato de His₆PtmE se realizó utilizando 9 reacciones de 80 µl cada una, que contenían Tris 50 mM a pH 7,5, MgCl₂ 2 mM, 50 µg de His₆PtmE, y diversas combinaciones de azúcar-1-P 10 mM (GalN-1-P, GlcN-1-P o GlcNAc-1-P) y NTP (CTP, GTP, o TTP) 0,2 mM. **Conversión de GDP-GlcN en GDP-GlcNAc:** La reacción de His₆GlmU se realizó con usando GDP-GlcN (IV) 1 mM, acetil-CoA 1,2 mM y His₆GlmU en fosfato de sodio 25 mM a pH 7,8, NaCl 25 mM, β-mercaptoetanol 10

mM. Además, se realizó una reacción de control que contiene GlcN-1-P (III) 1 mM en lugar de IV. *Biosíntesis de ácido legionamínico a partir de GDP-GlcNAc*. La síntesis enzimática gradual de intermedios o productos se llevó a cabo en 2 etapas (V→VI→VII→VIII, y luego VIII→IX→X) usando 1 mM de V, NAD 0,5 mM, PLP 0,8 mM, L-Glu 8 mM, acetil-CoA 1,2 mM, PEP 1,2 mM, LegBHis₆, His₆LegC, His₆LegH, His₆LegG, y His₆LegI según sea adecuado, en fosfato de sodio 25 mM a pH 7,3, NaCl 25 mM. La evaluación de la actividad de His₆LegG implicó la monitorización de la cinética de la reacción mediante RMN de ¹H (véase *Espectroscopia de RMN*) durante 75 min usando GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII) 0,75 mM, 4 μ g de His₆LegG en 200 μ l de fosfato de sodio 25 mM a pH 7,3, NaCl 25 mM a 25 °C. Además, la flexibilidad de de sustrato de His₆LegG se evaluó mediante una reacción de 300 μ l que contenía 40 μ g de His₆LegG, fosfato de sodio 25 mM a pH 7,3, NaCl 25 mM y UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc 0,75 mM, con incubación a 37 °C durante 1,5 h, y después durante la noche a 25 °C. *Biosíntesis de ácido CMP-legionamínico*. La activación con CMP de ácido legionamínico (X→XI) se llevó a cabo usando una reacción de 20 ml que contiene aproximadamente 0,2 mM de X, MgCl₂ 50 mM, CTP 3 mM y 15 mg de LegFHis₆ en fosfato de sodio 25 mM a pH 7,8, NaCl 25 mM, con incubación a 37 °C durante 5 horas, y luego a 25 °C durante 72 horas. *Purificación de metabolitos*. Normalmente, las reacciones se hicieron pasar a través de una membrana de filtro Amicon Ultra-15 (10.000 de peso molecular de corte) o Ultra-4 (5.000 de peso molecular de corte) antes del análisis. Cuando fuera necesario, los preparaciones de NDP-azúcar (GDP-Glc, GDP-GlcN, GDP-GlcNAc, CDP-GlcNAc, TDP-GlcNAc, y CMP-Leg) se liofilizaron y desalaron / purificaron utilizando una columna Superdex Péptido 10/300 GL (Amersham Biosciences) en bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7,9. Para mayor pureza, las muestras de NDP-azúcar anteriores se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q 4.6/100 PE, Amersham Biosciences) usando bicarbonato de amonio a pH 7,9. La cuantificación de las preparaciones de NDP-azúcar se determinó utilizando los coeficientes de extinción molar de CMP (ϵ_{260} = 7,400), GDP (ϵ_{260} = 11.500), TDP (ϵ_{260} = 8.700), y UDP (ϵ_{260} = 10.000).

Análisis CE y CE-EM

Se realizó un análisis CE utilizando un sistema P/ACE 5510 o P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Mississauga, ONT) con detección por red de diodos. Los capilares fueron sílice desnuda 50 μ m x 50 cm, con un detector a 50 cm, y el tampón de recorrido fue tetraborato sódico 25 mM a pH 9,4. Las muestras se introdujeron mediante inyección a presión durante 6 segundos, y la separación se realizó a 18 kV durante 20 minutos. La integración de los picos se realizó utilizando el software de la estación Beckman P/ACE.

CE-EM se realizó usando un sistema Prince CE (Prince Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas QTRAP 4000 (Applied Biosystems / MDS Sciex). Las separaciones se obtuvieron en un capilar de sílice desnuda de ~ 90 cm usando morfolina 30 mM en agua desionizada, pH 9. Una tensión de separación de 20 kV, junto con una presión de 500 mbar se utilizó para el análisis rápido CE-EM. El voltaje de ionización por electropulverización -5,2 kV se utilizó para la detección de modo de iones negativos.

Espectroscopia de RMN

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en tubos de RMN de 3 mm a 25 °C en 10 % de D₂O y se controlaron a través de la adquisición del espectro de ¹H a varios intervalos de tiempo (indicado en minutos) usando un espectrómetro Varian Inova 500 MHz (¹H) con una sonda de 3 mm de gradiente Z Varian. Para la caracterización estructural de los compuestos, las reacciones enzimáticas filtradas o el material purificado se intercambiaron en 100 % de D₂O. Se realizó el análisis estructural usando un espectrómetro Varian 600 MHz (1 H) con una sonda refrigerada criogénicamente de resonancia de triple gradiente Z Varian 5 mm para una sensibilidad óptima. Todos los espectros hicieron referencia a un patrón de acetona interno (δ_H 2,225 ppm y δ_C 31,07 ppm).

Referencias

- Angström J, Teneberg S, Karlsson KA. 1994. Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11859–11863.
- Bork K, Gagiannis D, Orthmann A, Weidemann W, Kontou M, Reutter W, Horstkorte R. 2007. Experimental approaches to interfere with the polysialylation of the neural cell adhesion molecule in vitro and in vivo. *J Neurochem*. 103:65–71.
- Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Mueckler, M. 1996. Differential effects of GLUT1 or GLUT4 overexpression on hexosamine biosynthesis by muscles of transgenic mice. *J Biol Chem*. 271:23197–23202.
- Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, Buchrieser C. 2008. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res*. 18:431–441.
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*.

7:255–266.

- 5 Delputte PL, Van Breedam W, Delrue I, Oetke C, Crocker PR, Nauwynck HJ. 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J Virol.* 81:9546–9550.
- 10 Fernandez-Moreira E, Helbig JH, Swanson MS. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun.* 74:3285–3295.
- 15 Glaze PA, Watson DC, Young NM, Tanner ME. 2008. Biosynthesis of CMP-N,N'-Diacetyllegionaminic Acid from UDP-N,N'-Diacetylbaucillosamine in *Legionella pneumophila*. *Biochemistry.* 47:3272–3282.
- 20 Hausman SZ, Burns DL. 1993. Binding of pertussis toxin to lipid vesicles containing glycolipids. *Infect Immun.* 61:335–337.
- 25 Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM. 2008. α 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res.* 68:388–394.
- 30 Hsu KL, Pilobello KT, Mahal LK. 2006. Analyzing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach. *Nat Chem Biol.* 2:153–157.
- 35 Jolly L, Ferrari P, Blanot D, van Heijenoort J, Fassy F, Mengin-Lecreux D. 1999. Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 262:202–210.
- 40 Knirel YA, Rietschel ET, Marre R, Zähringer U. 1994. The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem.* 221:239–245.
- 45 Knirel YA, Shashkov AS, Tsvetkov YE, Jansson PE, Zähringer U. 2003. 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexynon-2-ulonic acid in bacterial glycopolymers: chemistry and biochemistry. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 58:371–417.
- 50 Kooistra O, Lüneberg E, Knirel YA, Frosch M, Zähringer U. 2002. N-Methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Identification of 5-(N,N-dimethylacetimidoyl)amino and 5-acetimidoyl(N-methyl)amino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradexynon-2-ulonic acid in the O-chain polysaccharide. *Eur J Biochem.* 269:560–572.
- 55 Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. 2006. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci.* 63:1331–1354.
- 60 Lundgren BR, Boddy CN. 2007. Sialic acid and N-acyl sialic acid analog production by fermentation of metabolically and genetically engineered *Escherichia coli*. *Org Biomol Chem.* 5:1903–1909.
- 65 McNally DJ, Aubry AJ, Hui JP, Khieu NH, Whitfield D, Ewing CP, Guerry P, Brisson J-R, Logan SM, Soo EC. 2007. Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *J Biol Chem.* 282:14463–14475.
- 70 Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J. 1994. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Bacteriol.* 176:5788–5795.
- 75 Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J. 1996. Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271:32–39.
- 80 Merritt EA, Kuhn P, Sarfaty S, Erbe JL, Holmes RK, Hol WG. 1998. The 1.25 Å resolution refinement of the cholera toxin B-pentamer: evidence of peptide backbone strain at the receptor-binding site. *J Mol Biol.* 282:1043–1059.
- 85 Mouilleron S, Badet-Denisot MA, Golinelli-Pimpaneau B. 2006. Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase. *J Biol Chem.* 281:4404–4412.
- 90 Olivier NB, Chen MM, Behr JR, Imperiali B. 2006. In vitro biosynthesis of UDP-N,N'-diacetylbaucillosamine by enzymes of the *Campylobacter jejuni* general protein glycosylation system. *Biochemistry.* 45:13659–13669.
- 95 Pompeo F, Bourne Y, van Heijenoort J, Fassy F, Mengin-Lecreux D. 2001. Dissection of the bifunctional

Escherichia coli N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase enzyme into autonomously functional domains and evidence that trimerization is absolutely required for glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity and cell growth. *J Biol Chem.* 276:3833–3839.

Pontes de Carvalho LC, Tomlinson S, Vandekerckhove F, Bienen EJ, Clarkson AB, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. 1993. Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J Exp Med.* 177:465–474.

Schoenhofen IC, Lunin W, Julien JP, Li Y, Ajamian E, Matte A, Cygler M, Brisson J-R, Aubry A, Logan SM, et al. 2006. Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 281:8907–8916.

Schoenhofen IC, McNally DJ, Brisson JR, Logan SM. 2006. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology.* 16:8C–14C.

Schoenhofen IC, McNally DJ, Vinogradov E, Whitfield D, Young NM, Dick S, Wakarchuk WW, Brisson J-R, Logan SM. 2006. Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *J Biol Chem.* 281:723–732.

Severi E, Hood DW, Thomas, GH. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology.* 153:2817–2822.

Silva E, Marques AR, Fialho AM, Granja AT, Sá-Correia I. 2005. Proteins encoded by *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 *rmA* and *ugpG* genes, involved in gellan gum biosynthesis, exhibit both dTDP- and UDP-glucose pyrophosphorylase activities. *Appl Environ Microbiol.* 71:4703–4712.

Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Heerze LD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. 1994. Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. *Nat Struct Biol.* 1:591–596.

Teplyakov A, Obmolova G, Badet-Denisot MA, Badet B. 1999. The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Sci.* 8:596–602.

Tsvetkov YE, Shashkov AS, Knirel YA, Zähringer U. 2001. Synthesis and identification in bacterial lipopolysaccharides of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradecy-D-glycero-D-galacto- and -D-glycero-D-talo-non-2-ulonic acids. *Carbohydr Res.* 331:233–237.

Varki A. 2007. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature.* 446: 1023–1029.

Varki A and Angata T. 2006. Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology.* 16:1R–27R.

Varki NM and Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 87:851–857.

Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, et al. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis.* 186:127–128.

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN δ (ppm) para los azúcares de los compuestos V a XI.

Compuesto	^1H	^{11}B (ppm)	^{13}C	δ_c (ppm)
V	H1	5,51	C1	95,1
	H2	3,99	C2	54,5
	H3	3,81	C3	71,7
	H4	3,55	C4	70,3
	H5	3,92	C5	73,8
	H6	3,82/3,86	C6	61,2
VI	H1	5,45	C1	95,3
	H2	4,10	C2	53,5
	H3	3,82	C3	72,4

	H5	4,11	C5	70,9
	H6	1,21	C6	12,4
VII	H1	5,50	C1	95,6
	H2	4,06	C2	55,0
	H3	3,87	C3	69,1
	H4	2,96	C4	58,6
	H5	4,21	C5	68,0
	H6	1,32	C6	18,0
VIII	H1	5,50	C1	95,4
	H2	4,05	C2	55,2
	H3	3,80	C3	69,8
	H4	3,68	C4	57,9
	H5	4,05	C5	69,3
	H6	1,16	C6	18,0
		α/β		α/β
IX	H1	5,11/4,96	C1	94,0/94,0
	H2	4,30/4,46	C2	53,8/54,8
	H3	4,06/3,84	C3	67,7/71,7
	H4	3,77/3,66	C4	54,8/54,5
	H5	3,97/3,51	C5	68,1/72,6
	H6	1,19/1,21	C6	18,0/18,0
X	H3a	1,83	C3	40,8
	H3e	2,22		
	H4	3,96	C4	68,5
	H5	3,72	C5	53,8
	H6	4,24	C6	70,4
	H7	3,86	C7	54,3
	H8	3,86	C8	67,5
	H9	1,16	C9	20,4
XI	H3a	1,63 (J _{3a,4} 11,9; J _{3a,P} 5,8)	C3	42,6
	H3e	2,48 (J _{3c,4} 4,7; J _{3c,3a} 13,4)		
	H4	3,98 (J _{4,5} 10,3)	C4	68,3
	H5	3,72 (J _{5,6} 10,3)	C5	53,7
	H6	4,33 (J _{6,7} 1,5)	C6	72,3
	H7	3,77 (J _{7,8} 9,5)	C7	55,3
	H8	4,03 (J _{8,9} 6,4)	C8	66,9
	H9	1,10	C9	19,5

Tabla 2. Enzimas caracterizadas funcionalmente en este estudio. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido CMP-legionamínico se muestran en orden secuencial, en el que cada producto es un sustrato para la siguiente etapa biosintética. El sustrato inicial para la ruta es Fructosa-6-P (I).

5

Número Cj	Nomenclatura recomendada	Nomenclatura(s) previas	Función enzimática <i>in vitro</i>	Producto(s) biosintéticos
Cj1330	PtmF	PtmF	isomerasa	GlcN-6-P (II)
Cj1332	PtmA	PtmA	glutaminasa	
Cj1407c	PgmL		fosfoglucosamina mutasa	GlcN-1-P (III)
Cj1329	PtmE	PtmE	GlcN-1-P guanililtransferasa	GDP-GlcN (IV)
Cj0821	GlmU	GlmU	N-acetiltransferasa	GDP-GlcNAc (V)

Cj1319	LegB		4,6-deshidratasa	GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa (VI)
Cj1320	LegC		aminotransferasa	GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc (VII)
Cj1298	LegH		N-acetiltransferasa	GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc (VIII)
Cj1328	LegG	NeuC2, PtmD	2-epimerasa / NDP-azúcar hidrolasa	2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man (IX)
Gj1327	LegI	NeuB2, PtmC	AEG sintasa	Ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexoxi-D-glicero- β -D-galacto-nonulosónico (X, LeG)
Cj1331	LegF	NeuA3, PtmB	CMP-Leg sintetasa	CMP-Leg (XI)

Tabla 3. Descripciones enzimáticas para la Figura 3.

Número	Número Cj	Nombre del gen	Función enzimática
1	1366c	glmS	glucosamina-6-P sintasa
2	1330	ptmF	isomerasa
3	1332	ptmA	glutaminasa (2 y 3 equivalentes a 1)
4	0360	glmM	fosfoglucoamina mutasa
5	1407c	pgmL	fosfoglucoamina mutasa
6	0821	glmU	nucleotidiltransferasa / N-acetiltransferasa
7	1142	neuC1	2-epimerasa hidrolizante
8	1141	neuB1	Ácido siálico sintasa
9	1143	neuA1	Ácido CMP-siálico sintetasa
10	1140	cstIII	sialiltransferasa
11	1120c	pglF	deshidratasa
12	1121c	pglE	aminotransferasa
13	1123c	pglD	N-acetiltransferasa
14	1124c	pglC	glicosiltransferasa
15	1125c	pglA	glicosiltransferasa
16	1127c	pglJ	glicosiltransferasa
17	1129c	pglH	glicosiltransferasa
18	1128c	pglI	glicosiltransferasa
19	1130c	pglK	flipasa
20	1126c	pglB	oligosacariltransferasa
21	0858c	murA	enolpiruvil transferasa
22	1676	murB	reductasa
23	1054c	murC	L-Ala ligasa
24	0432c	murD	D-Glu ligasa
25	1641	murE	L-Lis (o A2pm) ligasa
26	0795c	murF	D-Ala-D-Ala ligasa
27	0433c	mraY	glicosiltransferasa (lípidio I sintasa)
28	1039	murG	glicosiltransferasa (lípidio II sintasa)
29	1293	pseB	deshidratasa / epimerasa
30	1294	pseC	aminotransferasa
31	1313	pseH	N-acetiltransferasa
32	1312	pseG	UDP-azúcar hidrolasa
33	1317	psel	Ácido pseudamínico sintasa
34	1311	pseF	Ácido CMP-pseudamínico sintetasa
35	1329	ptmE	nucleotidiltransferasa
36	1319	legB	deshidratasa
37	1320	legC	aminotransferasa
38	1298	legH	N-acetiltransferasa
39	1328	legG	2-epimerasa hidrolizante

40	1327	legI	Ácido legionamínico sintasa
41	1331	legF	Ácido CMP-legionamínico sintetasa

Tabla 4. Nomenclatura alterna de carbohidratos alternativo para la Figura 3. CMP, citidina-5'-monofosfato; GDP, guanosina-5'-difosfato; UDP, uridina-5'-difosfato

Nomenclatura abreviada de carbohidratos	Nomenclatura completa de carbohidratos
(I) Fru-6-P	D-fructosa-6-fosfate
(II) GlcN-6-P	D-glucosamina-6-fosfato
(III) GlcN-1-P	α -D-glucosamina-1-fosfato
GlcNAc-1-P	N-acetil- α -D-glucosamina-1-fosfato
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetil- α -D-glucosamina
ManNAc	N-acetil-D-manosamina
Sia	Ácido 5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- β -D-galacto-nonulosónico (ácido siálico)
CMP-Sia	Ácido CMP-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- β -D-galacto-nonulosónico (ácido CMP-siálico)
UDP-4-keto-6-desoxi-GlcNAc	UDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa
UDP-4-amino-6-desoxi-GlcNAc	UDP-4-amino-4,6-didesoxi-N-acetil- α -D-glucosamina
UDP-2,4-diNAc-6-desoxi-Glc	UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-glucosa
UDP-4-keto-6-desoxi-AltNAc	UDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- β -L-arabino-hexos-4-ulosa
UDP-4-amino-6-desoxi-AltNAc	UDP-4-amino-4,6-didesoxi-N-acetil- β -L-altrosamina
UDP-2,4-diNAc-6-desoxi-Alt	UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- β -L-altrosa
2,4-diNAc-6-desoxi-Alt	2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-L-altrosa
Pse	Ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeseoxi-L-glicero- α -L-manno-nonulosónico (ácido pseudamínico)
CMP-Pse	Ácido CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeseoxi-L-glicero- α -L-manno-nonulosónico (ácido CMP-pseudamínico)
(IV) GDP-GlcN	GDP- α -D-glucosamina
(V) GDP-GlcNAc	GDP-N-acetil- α -D-glucosamina
(VI) GDP-4-keto-6-desoxi-GlcNAc	GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa
(VII) GDP-4-amino-6-desoxi-GlcNAc	GDP-4-amino-4,6-didesoxi-N-acetil- α -D-glucosamina
(VIII) GDP-2,4-diNAc-6-deoxy-Glc	GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-glucosa
(IX) 2,4-diNAc-6-deoxy-Man	2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-manosa
(X) Leg	Ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeseoxi-D-glicero- β -D-galacto-nonulosónico (ácido legionamínico)
(XI) CMP-Leg	Ácido CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeseoxi-D-glicero- β -D-galacto-nonulosónico (ácido CMP-legionamínico)

5

Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN δ (ppm) para los azúcares de los compuestos IV, así como GDP- α -D-Glc, CDP- α -D-GlcNAc Y TDP- α -D-GlcNAc.

Compuesto	1H	δ H (ppm)	13C	δ C (ppm)
IV	H1	5,56	C1	97,3
	H2	2,76	C2	56,3
	H3	3,63	C3	74,3
	H4	3,44	C4	70,5
	H5	3,89	C5	74,3
	H6	3,74,3,84	C6	61,4
Guanina: 8:1-138,5; 117,3; 153,8 ppm				
GDP-Glc	H1	5,58	C1	96,6

	H2	3,50	C2	72,7
	H3	3,88	C3	73,9
	H4	3,43	C4	70,5
	H5	3,76	C5	73,9
	H6	3,73,3,83	C6	61,5
	Guanina: 8,09–138,4; 117,3; 152,7 ppm			
CDP–GlcNAc	H1	5,52	C1	95,7
	H2	3,99	C2	54,8
	H3	3,81	C3	72,1
	H4	3,55	C4	70,7
	H5	3,92	C5	74,1
	H6	3,80,3,86	C6	61,4
	Cltidina: 6,12–97,7; 7,94; acetato 2,07/23,3 ppm			
TDP–GlcNAc	H1	5,51	C1	95,8
	H2	3,99	C2	54,8
	H3	3,81	C3	72,1
	H4	3,55	C4	70,7
	H5	3,93	C5	74,1
	H6	3,81,3,86	C6	61,5
	Timidina: H–6:7,73; Me 1,94–12,7; N–acetato 2,08/23,3 ppm			

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Fuente / referencia
pCR2.1	Apr, Knr, oriColE1, promotor lac, utilizado para la clonación	Invitrogen
pET30a	Knr, oriColE1, promotor de T7, utilizado para la expresión de proteínas marcadas con His6 en C-terminal	Novagen
pFO4	Derivado de pET15b, Apr, oriColE1, promotor de T7, utilizado para la expresión de proteínas marcadas con His6 en N-terminal	Schoenhofen et al., 2006a
pNRC145.3	cj1330 BamHI–EcoRI En pFO4 codifica His6PtmF de C. jejuni	Este estudio
pNRC141.1	cj1332 NdeI–XhoI in pET30a codifica PtmAHis6 de C. jejuni	Este estudio
pNRC173.1	cj1407c NdeI–XhoI en pET30a codifica PgmLHis6 de C. jejuni	Este estudio
pNRC136.1	cj1329 BamHI–EcoRI En pFO4 codifica His6PtmE de C. jejuni	Este estudio
pNRC175.1	cj0821 in pFO4, codifica His6GlmU de C. jejuni	Este estudio
pNRC16.1	cj1319 NdeI–XhoI en pET30a codifica LegBHis6 de C. jejuni	Este estudio
pNRC83.1	cj1320BamHI–EcoRI En pFO4 codifica His6LegC de C. jejuni	Este estudio
pNRC164.3	cj1298 BamHI–EcoRI en pFO4, codifica His6LegH de C. jejuni	Este estudio
pNRC134.1	cj1328 BamHI–EcoRI En pFO4 codifica His6LegGde C. jejuni	Este estudio
pNRC51.1	cj1327BamHI–EcoRI En pFO4 codifica His6LegI de C. jejuni	Este estudio
pNRC139.1	cj1331 NdeI–XhoI en pET30a codifica LegFHis6 de C. jejuni	Este estudio
pNRC152.1	cj1123c NdeI–XhoI en pET30a codifica PglDHis6 de C. jejuni	Este estudio

5

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligo	Secuencia (5'→ 3')	Objetivo
NRC239 NRC240	GGATCCAAAGTCTTAATCATAGGCTTTGGAAGC GAATTCTCAGCCATTTTTTTCCTTACTTCATC	Clonación de pNRC145.3
NRC231 NRC232	CATATGCTTGAAAATAAAATCATCTTTGTAGCAG CTCGAGTAAGCCCCATCCATCATCTACC	Clonación de pNRC141.1
NRC300 NRC301	CATATGAATTTGAAGGAAAAATGTTAGATGTGATTTTATG CTCGAGATTCTTAAATCTAGCTTTTATATCATTAAACAAAGTAAATAC	Clonación de pNRC173.1

NRC221 NRC222	GOATCCGATATAAACAAACTCAAACACCCCC GAATTCTCATTTAAATCCTCATTTGGCTTTTAAAAAC	Clonación de pNRC136.1
NRC296 NRC297	GGATCCAAAACCTTCTATTTGATTTTAGCGGCAGG GAATTCTCATTTTGAATTTCTTATAATAAATCTTTATCATTTTATG	Clonación de pNRC175.1
NRC39 NRC40	CATATGAOAAATATTTTAGTTACAGGTGC CTCGAGAACATTATAAAGCTCGCTTTTATAATTTTC	Clonación de pNRC16.1
NRC139 NRC140	GGATCCATGTTTTAAAAAGAAATTTCTTTTATAAAAAGTC GAATTCTCATTCCTTTTTATTGCTATTCTAAC	Clonación de pNRC83.1
NRC280 NRC281	GGATCCAAATATTTACTTGAATTTGAAAATAAAAAATACTCCAC GAATTCTTAATATATTGTATCATAATTTTCTATTAGAATTGTTTGG	Clonación de pNRC164.3
NRC217 NRC218	GGATCCAGTAAAAGAAAAATTTGTATAGTCAGTGCAAC GAATTCTTATAAATCGATGAAATTTTATGTAAAATTGTATC	Clonación de pNRC134.1
NRC99 NRC100	GGATCCATGAAAAAACTTTAATCATCGCAGAAG GAATTCTTACTCACGGATAAGCTCATCTTC	Clonación de pNRC51.1
NRC227 NRC228	CATATGGCTGAAATTTTATGTACTATTTGTGC CTCGAGAAAATCCTTTGGCGATAAATTTTTTAAAGAG	Clonación de pNRC139.1
NRC253 NRC254	CATATGGCAAGAACTGAAAAAATTTATATTTATGGTG CTCCAGCATCCTTTTTGCAGGTACTCCC	Clonación de pNRC152.1
T7-F T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación de construcciones de pET30a
NRC175 NRC160	TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación de construcciones de pFO4

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> National Research Council of Canada
	<120> Biosíntesis de ácido CMP-legionamínico a partir de fructosa-6-P, y los respectivos intermedios de la ruta, usando nuevos precursores unidos a GDP
10	<130> 12317-PT-WO-EP
	<140> 0983276.1
	<141> 16-12-2009
15	<150> US 61/122973
	<151> 16-12-2008
	<160> 28
20	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
	<211> 33
	<212> ADN
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> cebador
30	<400> 1
	ggatccaaag tcttaatcat aggctttgga agc 33
	<210> 2

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 2
 gaattctcag ccatttttt tccttacttc atc 33

10 <210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 3
 catatgcttg aaaataaaat catctttgta gcag 34

20 <210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 ctcgagtaag ccccatccat catctacc 28

30 <210> 5
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 5
 catatgaatt tgaaggaaaa aatgtagat gtgatttta g 41

40 <210> 6
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 ctcgagattc ttaaacttag cttttatattc attaaacaaa gtaaatac 48

50 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 7
 ggatccgata taaacaaact caaactcacc cc 32

60 <210> 8

65 <210> 8

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 gaattctcat ttaaaatcct cattggcttt taaaaac 37
 10 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 20 ggatccaaaa ctctatctt gatttagcg gcagg 35
 <210> 10
 <211> 51
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 10
 gaattctcat tttgaaatt tcttataata ataactttt atcattttat g 51
 <210> 11
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 11
 catatgagaa atattttagt tacaggtgc 29
 <210> 12
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 12
 ctcgagaaca ttataaagct cgctttata attttc 36
 55 <210> 13
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 65 ggatccatgt taaaaaaga aatttcttt ataaaaagtc 40
 <210> 14

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 14
 gaattctcat tccttttat ttgctattct aac 33

10 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 15
 ggatccatgt ttaaaaaaga aatttctttt ataaaaagtc 40

20 <210> 16
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 16
 gaattcttaa tatattgtat cataatttc tattagaatt gtttgg 46

30 <210> 17
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 17
 ggatccagta aaagaaaaat ttgtatagtc agtgcaac 38

40 <210> 18
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 18
 gaattcttat aaatcgatga aatttttatg taaaattgta tc 42

50 <210> 19
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 19
 ggatccatga aaaaaacttt aatcatcgca gaag 34

60 <210> 20

65

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 gaattcttac tcacggataa gctcatcttc 30
 10 <210> 21
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 20 catatggctg aaatttatg tactattgt gc 32
 <210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 22
 ctcgagaaaa tccttggcg ataaatttt taaagag 37
 <210> 23
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 23
 catatggcaa gaactgaaaa aatttatatt tatgggtg 37
 <210> 24
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 24
 ctcgagcatc cttttgcag gtactccc 28
 55 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 65 taatacgact cactataggg 20
 <210> 26

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 26
 gctagttatt gctcagcgg 19
 10 <210> 27
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 27
 20 ttaatacgac tcactatagg ggaattg 27
 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 28
 ggttatgcta gttattgctc agcgg 25

REIVINDICACIONES

1. Un método de síntesis que comprende:

- 5 (a) hacer reaccionar GDP-*N*-acetil-glucosamina, dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) y LegB (4,6-deshidratasa dependiente de NAD) comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, (b) recuperar GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa.

10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer reaccionar LegC (aminotransferasa dependiente de PLP), piridoxal-fosfato (PLP), y un donante de amino adicional comprendidos en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc.

3. Un método de síntesis que comprende:

- 15 (a) hacer reaccionar GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa, LegC, piridoxal-fosfato (PLP) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y (b) recuperar GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc.

20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el donante de amino es ácido L-glutámico.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además hacer reaccionar una N-acetiltransferasa y acetil-CoA comprendidos en el recipiente de reacción, y en el que se recupera GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc.

25 6. Un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc, una N-acetiltransferasa, y acetil-CoA comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y (b) recuperar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc.

30 7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que la N-acetiltransferasa es LegH (GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc N-acetiltransferasa).

35 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además hacer reaccionar LegG (NDP-azúcar hidrolasa/2-epimerasa y agua comprendidos adicionalmente en el recipiente de reacción, y en el que se recupera 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

9. Un método de síntesis que comprende:

- 40 (a) hacer reaccionar GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc, LegG y agua comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado, y (b) recuperar 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.

45 10. El método de la reivindicación 8 o 9, que comprende además hacer reaccionar LegI (ácido legionamínico sintasa) y fosfoenolpiruvato (PEP), y en el que se recupera ácido legionamínico.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además hacer reaccionar LegF (ácido CMP-legionamínico sintasa), citidina trifosfato (CTP), y Me^{2+} (catión divalente), y en el que se recupera ácido CMP-legionamínico.

50 12. Un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-*N*-acetil-glucosamina, LegB, LegC, una N-acetiltransferasa, LegG, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), agua, acetil-CoA, piridoxal-fosfato (PLP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y un donante de amino comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,

55 (b) convertir la GDP-*N*-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa con la LegB y NAD,

(c) convertir la GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc con la LegC, PLP y el donante de amino,

60 (d) convertir la GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc con la N-acetiltransferasa y la acetil-CoA,

(e) convertir la GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con la LegG y el agua,

(f) convertir la 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con la LegI y PEP, y

(g) recuperar el ácido legionamínico.

65

13. Un método de síntesis que comprende:

- (a) hacer reaccionar GDP-N-acetil-glucosamina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), LegB, LegC, piridoxal-fosfato (PLP), un donante de amino, una N-acetiltransferasa, acetyl-CoA, LegG, agua, LegI, fosfoenol piruvato (PEP), LegF, citidina trifosfato (CTP) y Me^{2+} comprendidos en un recipiente de reacción proporcionado,
- 5 (b) convertir la GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa con la LegB (deshidratasa) y NAD,
- (c) convertir la GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc con la LegC, PLP y el donante de amino,
- 10 (d) convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc con la N-acetiltransferasa y la acetyl-CoA,
- (e) convertir la GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man con la LegG y el agua,
- (f) convertir la 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man en ácido legionamínico con la LegI y PEP,
- 15 (g) convertir el ácido legionamínico en ácido CMP-legionamínico con la LegF, Me^{2+} y el CTP,
- y
- (h) recuperar ácido CMP-legionamínico.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que la N-acetiltransferasa es LegH.
- 20 15. Una GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa purificada o aislada.
16. Un GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc purificado o aislado.
17. Un GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc purificado o aislado.
- 25 18. Uso de LegB para convertir GDP-N-acetil-glucosamina en GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa.
- 30 19. Uso de LegC para convertir GDP-2-acetamido-2,6-didesoxi- α -D-xilo-hexos-4-ulosa en GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc.
20. Uso de LegH para convertir GDP-4-amino-4,6-didesoxi- α -D-GlcNAc en GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc.
- 35 21. Uso de LegG para convertir GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi- α -D-Glc en 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-Man.
22. Uso de para convertir GDP-GlcNAc en ManNAc.

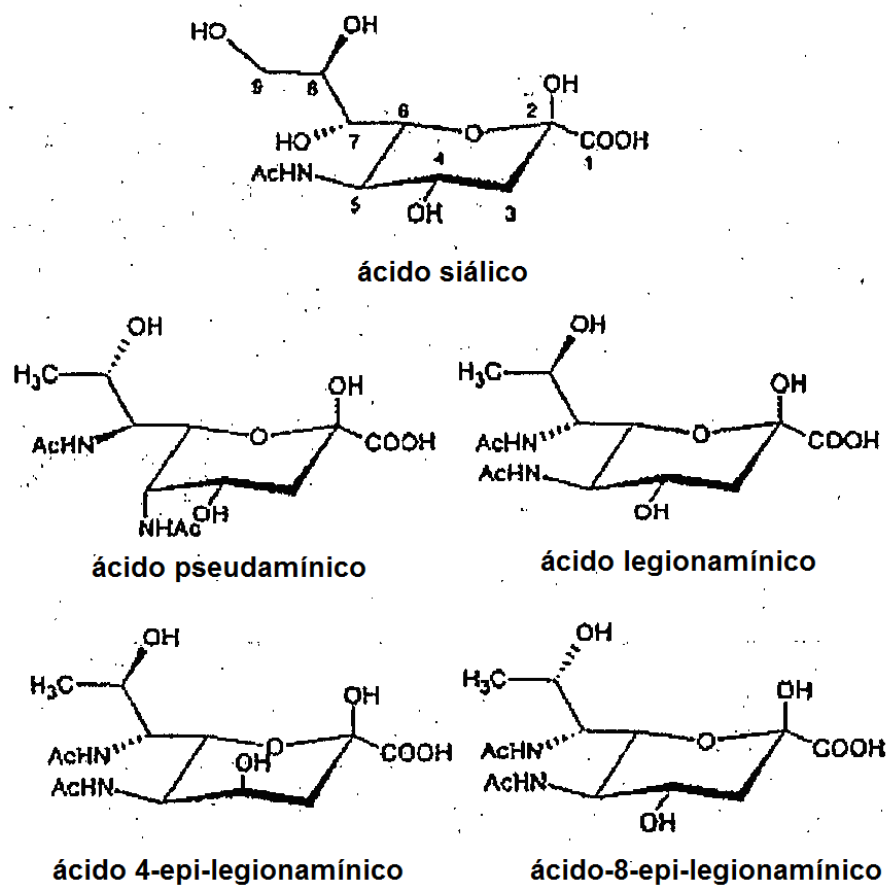


Fig 1

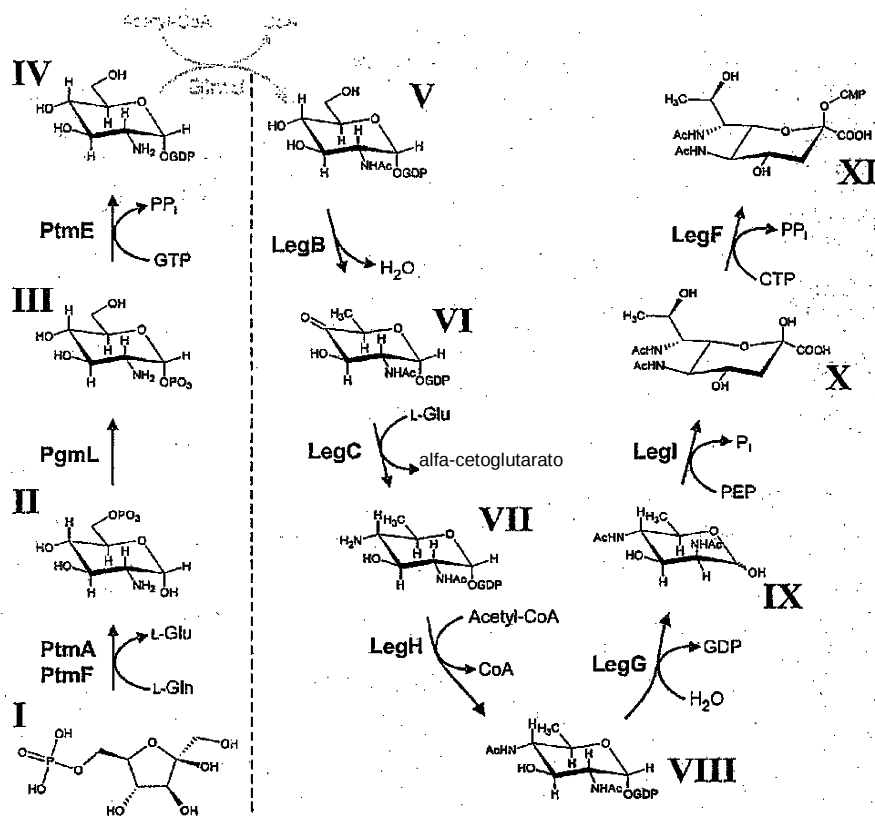


Fig 2

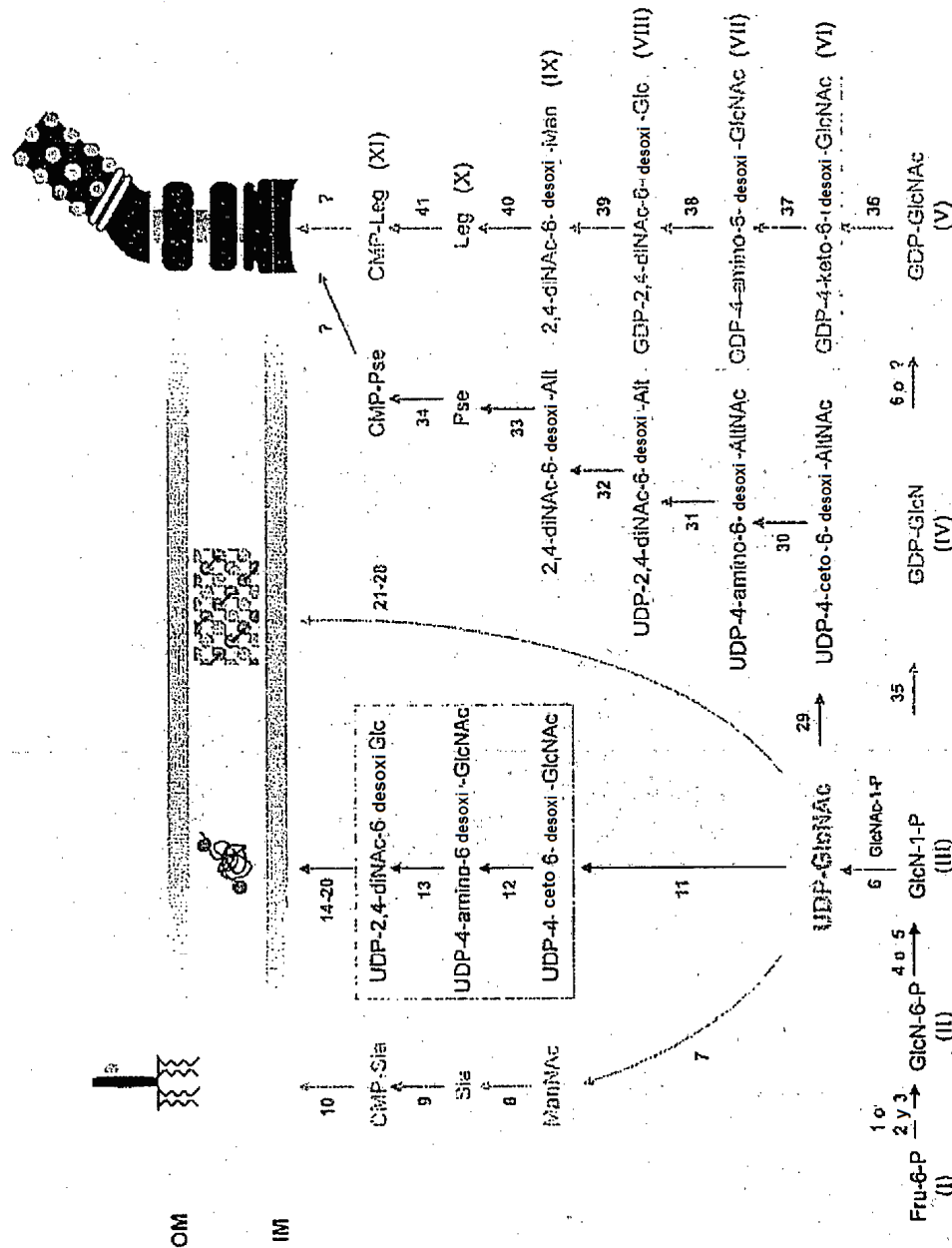


Fig 3

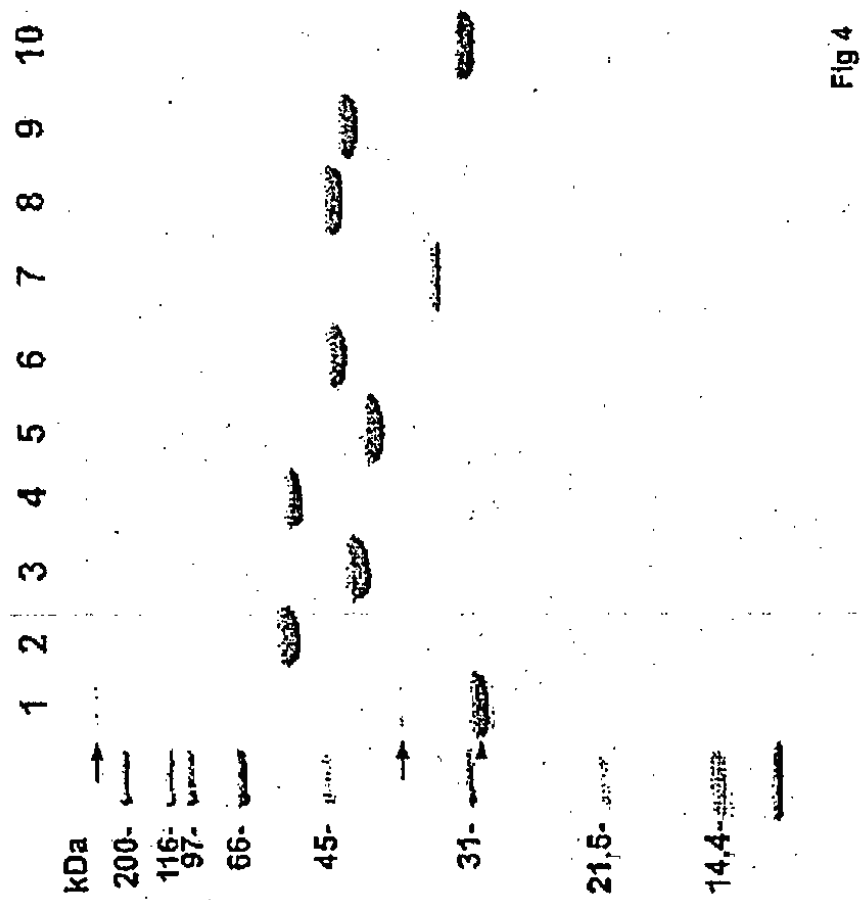


Fig 4

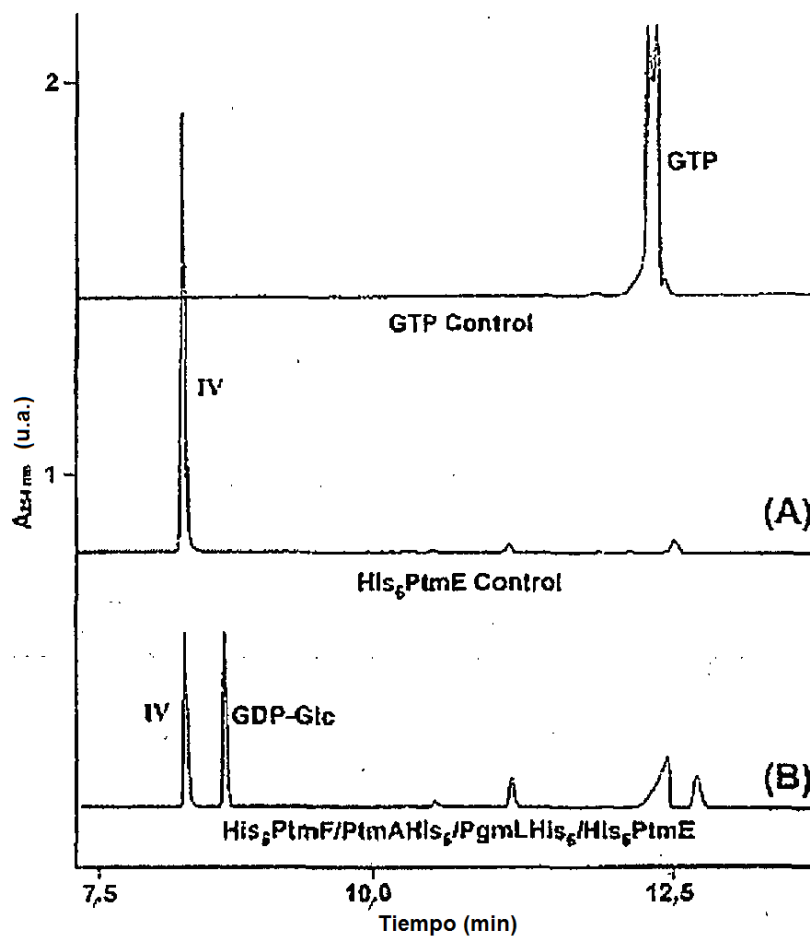


Fig 5

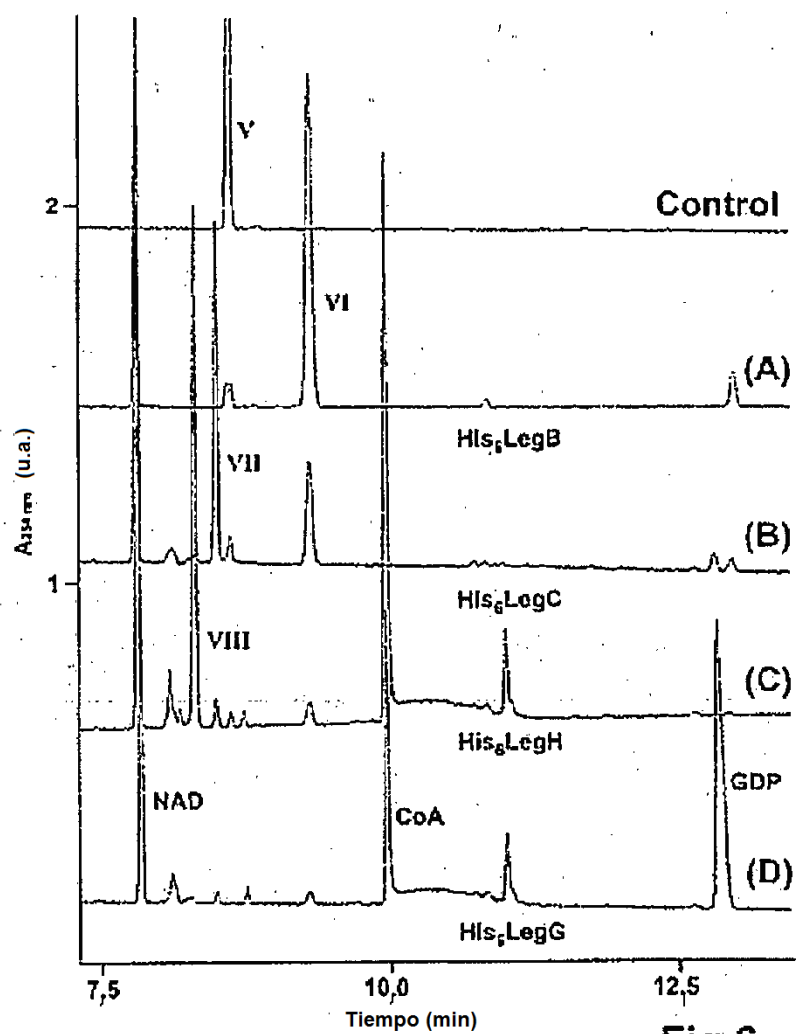


Fig 6

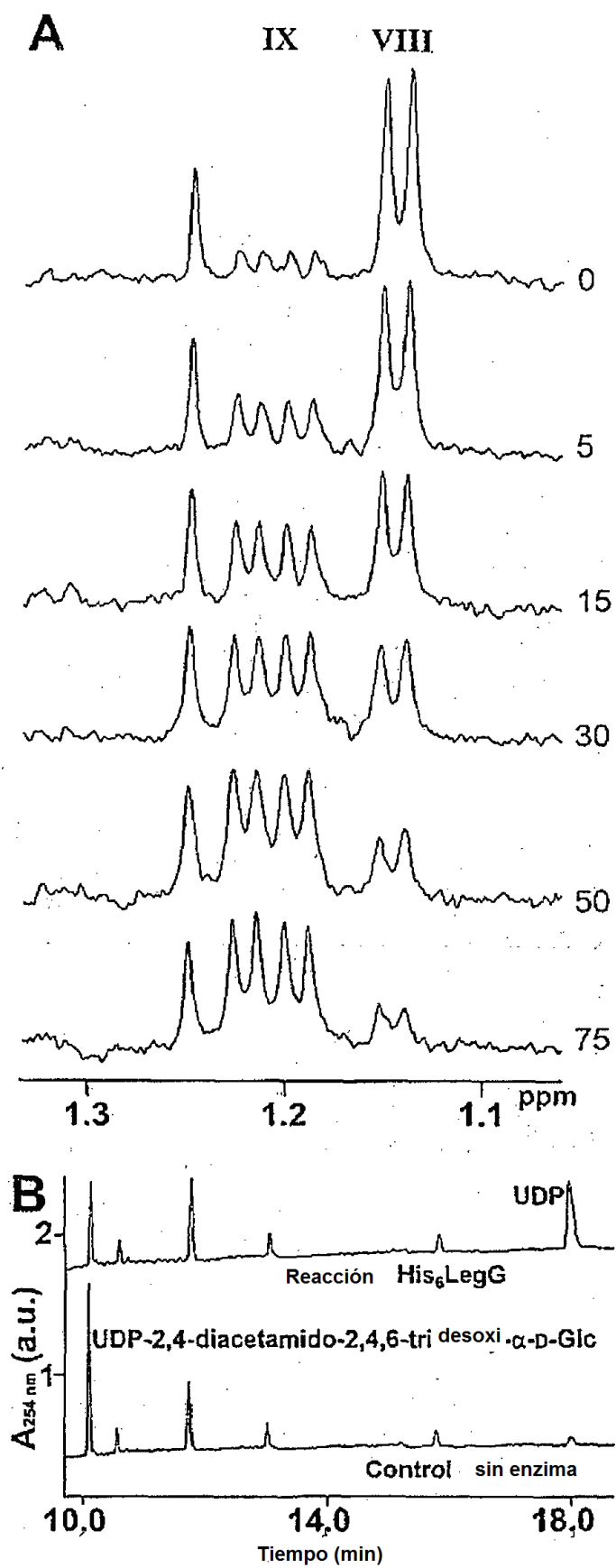


Fig 7

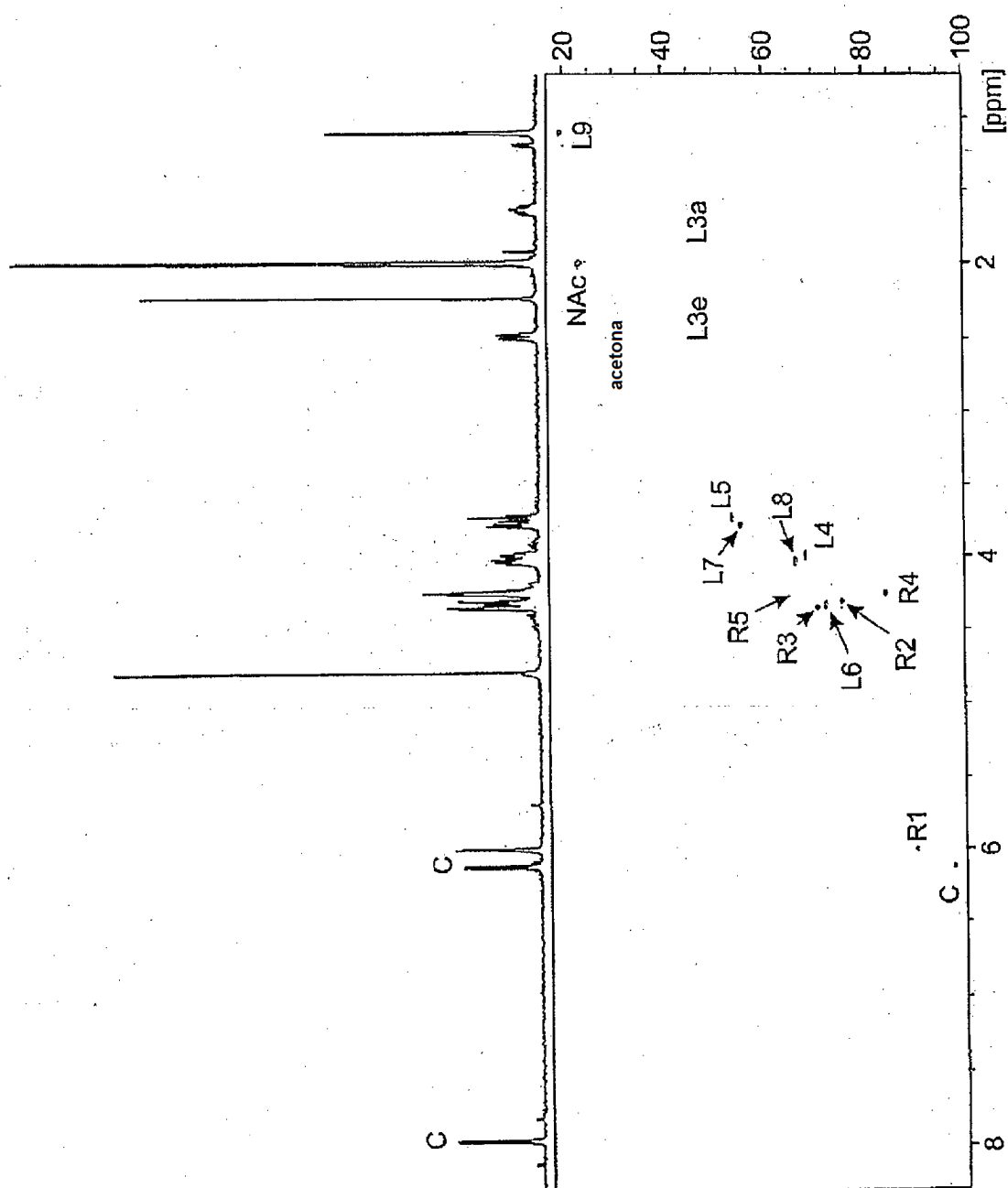


Fig 8

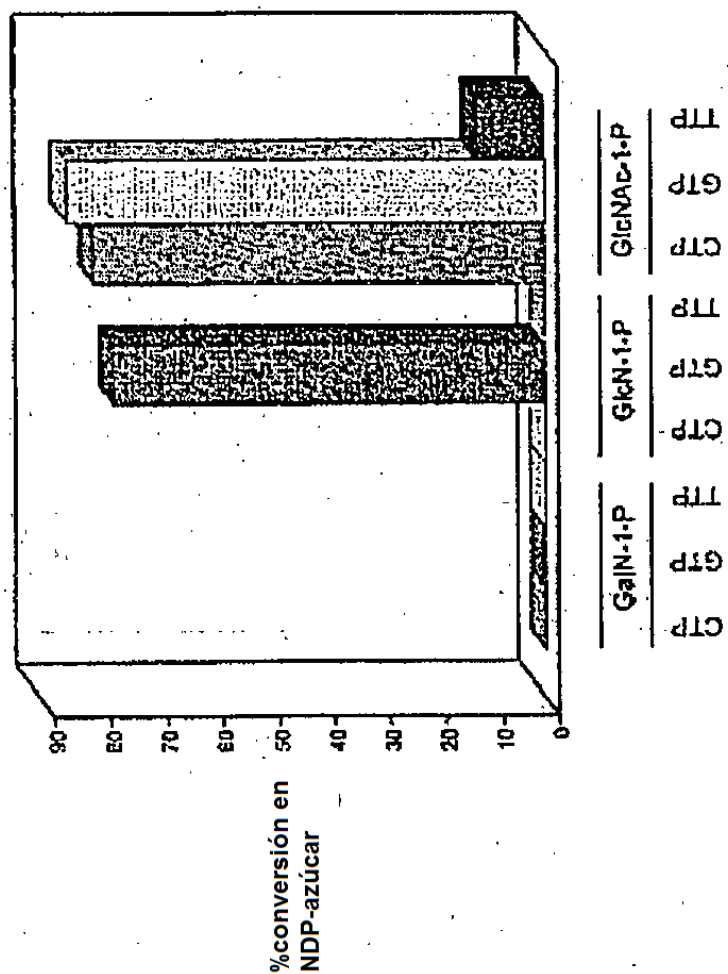


Fig 9

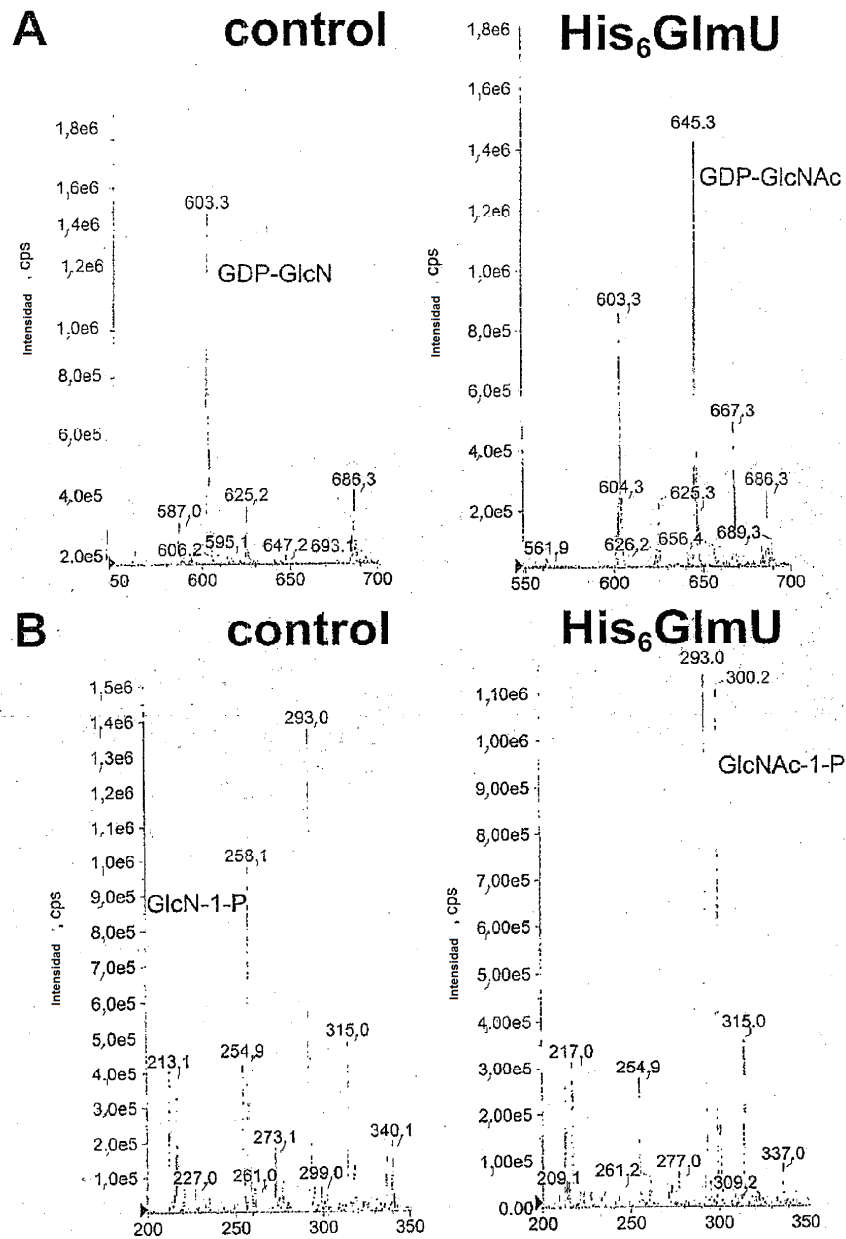
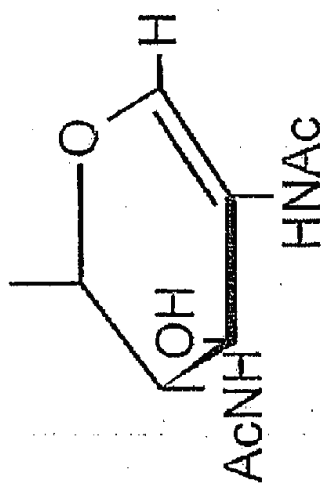


Fig 10



1	2	3	4	5	6
6.71		4.29	3.89	4.10	1.29
		68.2	56.0	75.5	17.4

 δ_H (ppm) δ_C (ppm)

Fig 11

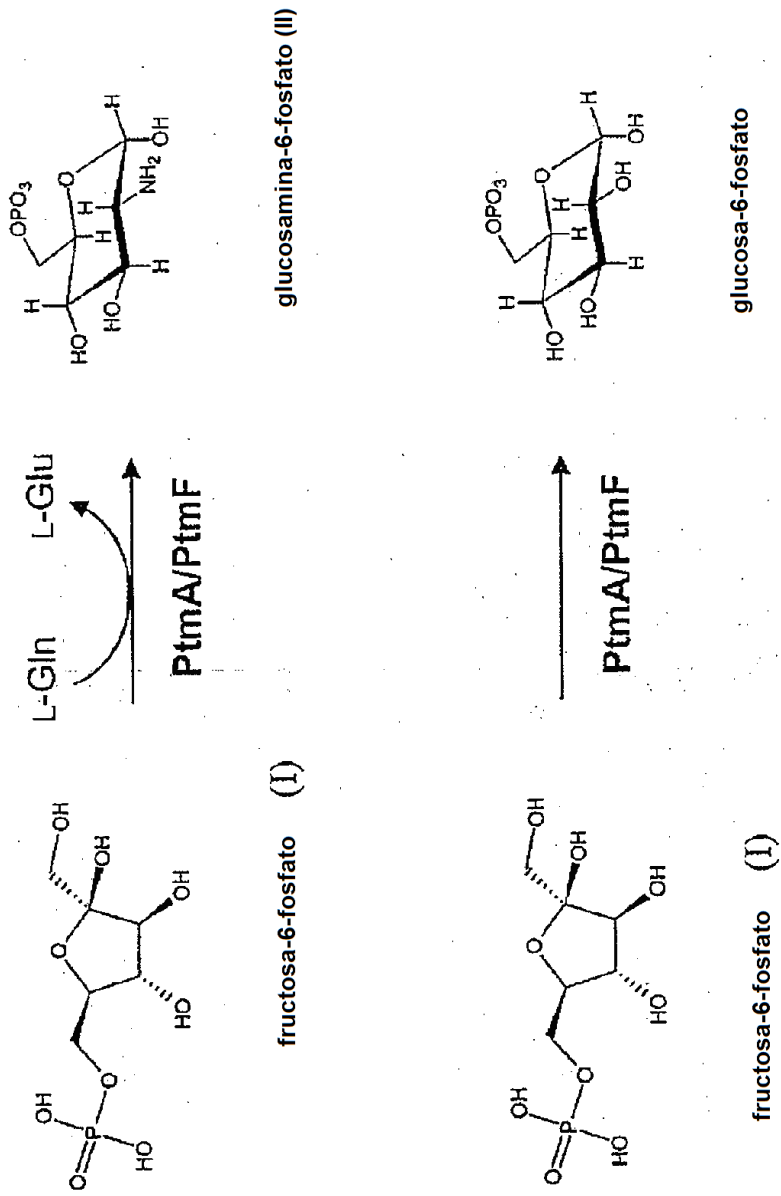


Figura 12

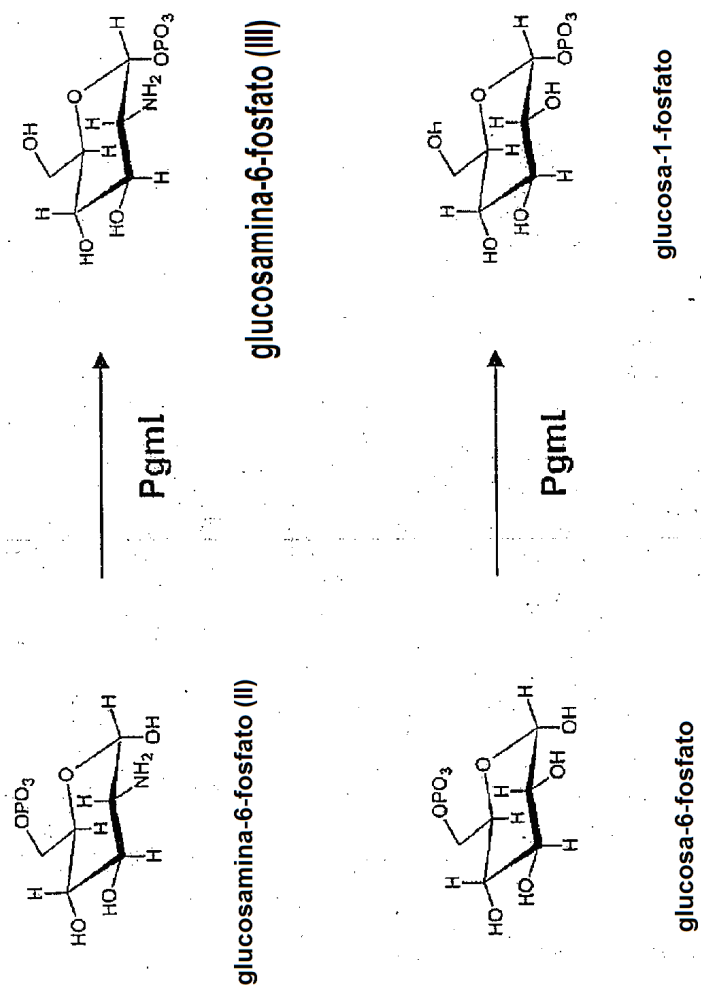
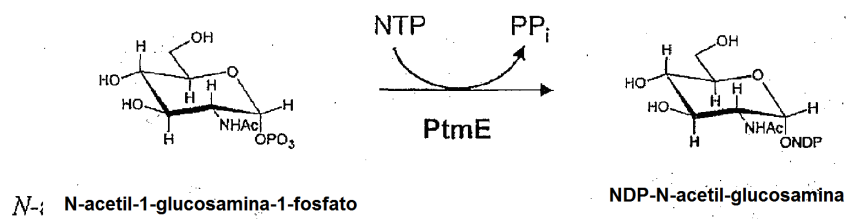


Figura 13



*** where NTP is either CTP, TTP, or GTP

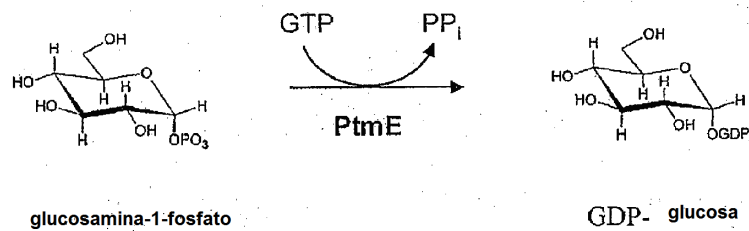
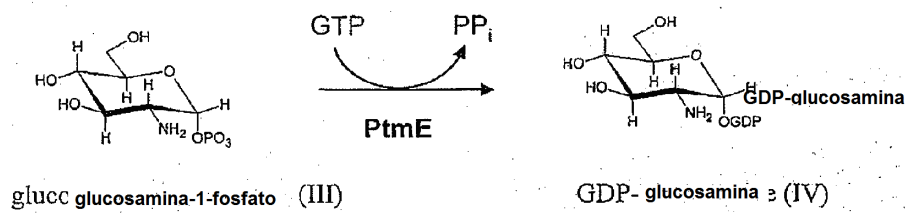


Figura 14

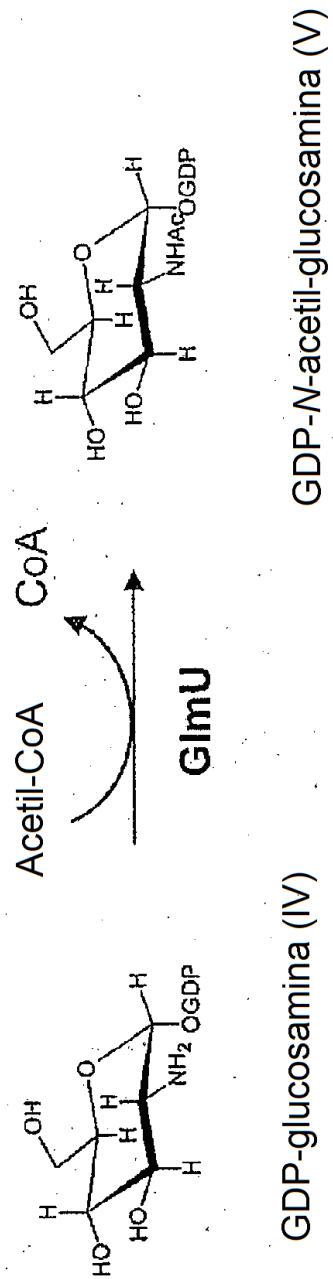
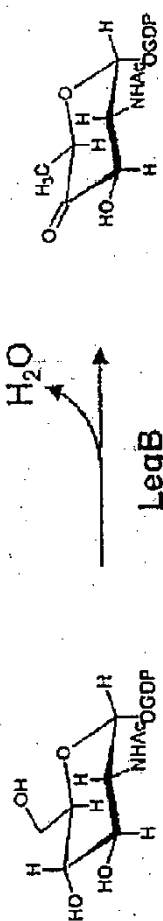


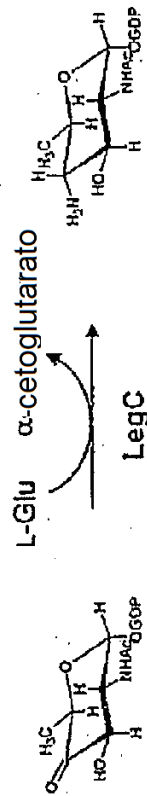
Figura 15



GDP-N-acetil-glucosamina (V)

GDP-2-acetamida-2,6-didesoxi-α-D-xilo-hexo-4-ulosa (VI)

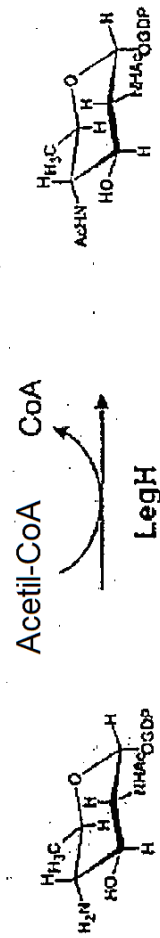
Figura 16



GDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-α-D-xilo hexo-4-ulosa (VI)

GDP-4-amino-4,6-dideoxy-α-D-GlcNaC (VII)

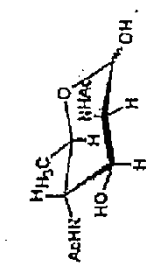
Figura 17



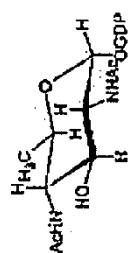
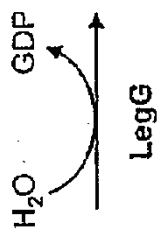
GDP-4-amino-4,6-dideoxy- α -D-GlcNAc (VII)

GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy- α -D-Glc (VIII)

Figura 18

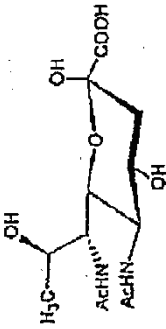


2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-Man (IX)

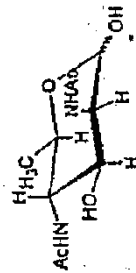
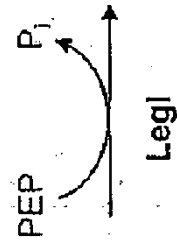


GDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy- α -D-Glc (VIII)

Figura 19

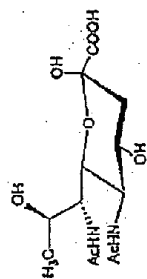


5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetrahydroxy-2,4,6-trideoxy-D-galactono-1,9-lactone (X) o ácido legionínico (X)

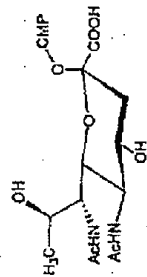
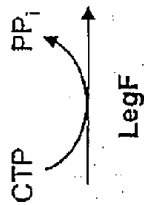


2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-Man (IX)

Figura 20



ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetrahydroxi-D-glicero-β-D-galacto-
nonulosónico
o ácido legionamínico (X)



ácido CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetrahydroxi-D-glicero-β-D-
galacto-nonulosónico
o ácido CMP-legionamínico (XI)

Figura 21