



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026998

(51)⁷ C12N 9/10

(13) B

(21) 1-2013-01142

(22) 07/10/2011

(86) PCT/EP2011/067538 07/10/2011

(87) WO/2012/049083 19/04/2012

(30) 10187167.1 11/10/2010 EP

(45) 25/01/2021 394

(43) 26/08/2013 305A

(73) JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (DE)

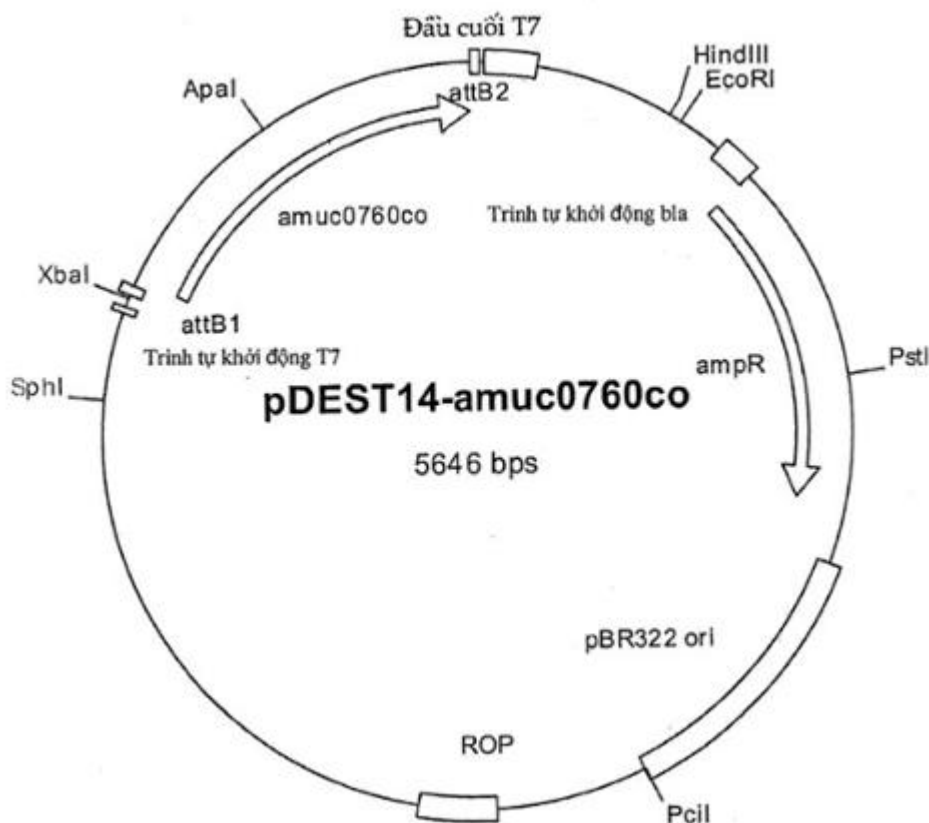
Maarweg 32 53619 Rheinbreitbach, DE.

(72) PARKOT, Julia (DE); HUEFNER, Eric (DE); JENNEWEIN, Stefan (DE).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT OLIGOSACARIT ĐƯỢC FUCOSYL HOÁ VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT FUCOSYLLACTOZA BẰNG CÁCH SỬ DỤNG TẾ
BÀO VẬT CHỦ VI KHUẨN HOẶC NẤM

(57) Sáng chế đề cập đến axit nucleic và trình tự axit amin từ *Akkermansia muciniphila* và từ *Bacteroides fragilis*, mã hóa/thể hiện các alpha-1,3-fucosyltransferaza mới. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng và các phương pháp để sử dụng các alpha-1,3-fucosyltransferaza để tạo thành các sản phẩm fucosyl hóa, như các oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit, cụ thể là 3-fucosyllactoza.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến fucosyltransferaza và việc ứng dụng của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rất nhiều (glyco)protein, (glyco)lipit hoặc oligosacarit cần sự có mặt của cấu trúc fucosyl hóa đặc biệt, để thể hiện hoạt tính sinh học cụ thể. Ví dụ, nhiều cơ chế nhận biết gian bào cần oligosacarit fucosyl hóa: ví dụ, để được liên kết bởi các phân tử kết dính tế bào, như L-selectin, các cấu trúc tế bào đặc biệt cần phải bao gồm carbohydrat fucosyl hóa. Ví dụ khác về các cấu trúc fucosyl hóa có chức năng sinh học là các cấu trúc tạo thành hệ nhóm máu AB0. Hơn nữa, các (glyco)protein dùng trong điều trị đại diện cho nhóm các chất phản ứng được lý tăng trưởng nhanh nhất, nhờ đó các tính chất được động học và độ ổn định được cho là do các glycan của chúng.

Do bản chất phức tạp và các tính chất hóa học vốn có của chúng, việc tổng hợp hóa học các glycoconjugate là thách thức lớn và có những khó khăn đáng kể. Không giống như các protein và các axit nucleic, việc tổng hợp chúng một cách tự động đã được ứng dụng trong thương mại, các glycan, chưa kể đến các glycoconjugate, không thể (chưa thể) được tổng hợp bằng cách sử dụng các hệ đã được sử dụng trong thương mại thông thường. Ngoài yêu cầu kiểm soát hóa học lập thể, việc tạo thành các liên kết đặc hiệu cũng rất khó khăn.

Xét về mức độ phức tạp của việc tổng hợp hóa học hoặc kết hợp tổng hợp enzym/hóa học các glycoconjugate, hướng tiếp cận hiện nay là sử dụng các glycosyltransferaza để tổng hợp bằng enzym các (glyco)protein và (glyco)lipit chứa các gốc oligosacarit.

Các fucosyltransferaza, thuộc nhóm enzym glycosyltransferaza, có mặt rộng rãi ở động vật có xương sống, động vật không có xương sống, thực vật và vi khuẩn. Chúng xúc tác việc vận chuyển các gốc fucoza từ thể cho, thông thường là guanosin-diphosphat fucoza (GDP-fucoza) đến thể nhận, bao gồm oligosacarit, các

(glyco)protein và (glyco)lipit. Các cơ chất thể nhận fucosyl hóa này có liên quan đến nhiều chu trình sinh học và bệnh học khác nhau.

Một số fucosyltransferaza đã được xác định, ví dụ trong vi khuẩn *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, ở động vật có vú, *Caenorhabditis elegans* và *Schistosoma mansoni*, cũng như trong thực vật, nhờ đó dựa vào vị trí bổ sung fucoza, các fucosyltransferaza được phân loại thành các alpha1,2, alpha1,3/4 và O-fucosyltransferaza.

Ở động vật có vú, GDP-Fucoza được tổng hợp trong tế bào chất qua việc tổng hợp de novo và chu trình salvage. Với việc tổng hợp de novo, GDP-mannoza được chuyển hóa thành GDP-fucoza qua hai enzym, trong khi đó chu trình salvage sử dụng xytosolic fucoza tự do làm cơ chất. Trong tế bào, GDP-fucoza trở nên đậm đặc trong các bao nhỏ và được nhận biết bởi các fucosyltransferaza dưới dạng cơ chất của thể cho.

Vì hoạt tính sinh học của nhiều oligosacarit quan trọng trong thương mại, các (glyco)protein và (glyco)lipit phụ thuộc vào sự có mặt của các gốc fucoza cụ thể, trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn cần tổng hợp hoặc điều chế một cách hiệu quả các glycoconjugate có (các) gốc oligosacarit mong muốn.

Vì vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất công cụ và phương pháp điều chế các cơ chất fucosyl hóa một cách hiệu quả, tiết kiệm thời gian và chi phí, có hiệu suất cơ chất mong muốn cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế, mục đích này được giải quyết, ngoài những cách khác, bằng cách đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit có hoạt tính alpha-1,3 fucosyltransferaza và bao gồm trình tự hoặc chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5 của danh mục trình tự đính kèm;
- b) trình tự axit nucleic bổ sung cho SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5;
- c) các trình tự axit nucleic lai trong điều kiện nghiêm ngặt thành các trình tự axit nucleic được định nghĩa trong mục a) và b) hoặc các chuỗi bổ sung của chúng.

Các polynucleotit theo sáng chế đại diện cho các fucosyltransferaza của các loài *Akkermansia muciniphila* và *Bacteroides fragilis*, trong đó SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự polynucleotit của fucosyltransferaza mới được xác định của *Akkermansia muciniphila*, và trong đó SEQ ID NO: 3 và 5 thể hiện các trình tự polynucleotit của hai fucosyltransferaza mới được xác định của *Bacteroides fragilis*.

Các fucosyltransferaza mới được xác định có hiệu quả đáng ngạc nhiên vì bằng cách sử dụng chúng các phản ứng có thể được thực hiện mà không xuất hiện trong tự nhiên: Trong phạm vi sáng chế này đã phát hiện ra rằng các fucosyltransferaza alpha-1,3 được xác định ở trên có khả năng sử dụng lactoza làm cơ chất và có khả năng tạo thành oligosacarit fucosyl hóa, cụ thể là 3-fucosyllactoza. Cho đến nay, không có fucosyltransferaza alpha-1,3 đã biết nào được phân lập từ vi khuẩn thể hiện việc sử dụng lactoza làm cơ chất tự nhiên để sản xuất fucosyllactoza. Vì vậy, thích hợp là các fucosyltransferaza được xác định được sử dụng để sản xuất oligosacarit fucosyl hóa gây ngạc nhiên lớn, và, vì vậy, việc sử dụng chúng là công cụ tuyệt vời để sản xuất một cách dễ dàng, hiệu quả và tiết kiệm chi phí, ví dụ, oligosacarit trong sữa mẹ (HMOs), như fucosyllactoza. Ngày nay, hơn 80 hợp chất, thuộc HMOs, đã được xác định cấu trúc; chúng đại diện nhóm oligosacarit phức tạp có chức năng như prebiotic. Ngoài ra, sự tương đồng về cấu trúc của HMO với các epitop biểu mô giúp bảo vệ chống lại các vi khuẩn gây bệnh. Trong đường tiêu hóa của trẻ sơ sinh, các HMO nuôi dưỡng một cách chọn lọc sự phát triển của các chủng vi khuẩn được chọn lọc và, vì vậy, là chất môi cho sự phát triển của một hệ vi sinh vật đường ruột đồng nhất ở trẻ bú sữa mẹ.

Vì cho đến nay, các cấu trúc phức tạp của các oligosacarit này đã cản trở quy trình tổng hợp chúng, nguồn chủ yếu HMO vẫn là sữa mẹ. Vì vậy, có nhu cầu thu được HMO một cách dễ dàng, bằng cách sử dụng các fucosyltransferaza thích hợp một cách đáng ngạc nhiên được trình bày ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Một số phương án theo sáng chế được minh họa trong các hình vẽ và được giải thích chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây. Trong các hình vẽ:

Fig.1 thể hiện biểu hiện của Amuc0760co từ pDEST14-amuc0760co trong *Escherichia coli* JM109(DE3); 15µg protein hòa tan từ dịch chiết thô được tách trên 15 % SDS-PAGE và nhuộm màu bằng Coomassie Brilliant xanh;

Fig.2 thể hiện việc phát hiện His-tagged Amuc0760co bằng phương pháp Western blot;

Fig.3 thể hiện bản đồ vectơ của pDEST14-amuc0760co, tức là gen được tối ưu codon *amuc0760co* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza Amuc0760co được nhân dòng vào pDEST14 (Invitrogen) bằng phản ứng Gateway (A); bản đồ vectơ của pDEST14-fucT6, tức là gen *fucT6* từ *Bacteroides fragilis* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza FucT6 được nhân dòng vào pDEST14 (Invitrogen, Đức) bằng phản ứng Gateway và (B); và bản đồ vectơ của pDEST14-fucT7, tức là gen *fucT7* từ *Bacteroides fragilis* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza FucT7 được nhân dòng vào pDEST14 (Invitrogen, Đức) bằng phản ứng Gateway (C).

Fig.4 thể hiện bản đồ vectơ của pACYC-amuc0760co, tức là gen được tối ưu codon *amuc0760co* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza Amuc0760co được nhân dòng vào pACYCDuet-1 (Novagen qua NcoI/PstI) (A); bản đồ vectơ của pACYC-fucT6, tức là gen được tối ưu codon *fucT6* từ *Bacteroides fragilis* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza FucT6 được nhân dòng vào pACYCDuet-1 (Novagen, UK) qua NcoI/BamHI (B); và bản đồ vectơ của pACYC-fucT7, tức là gen được tối ưu codon *fucT7* từ *Bacteroides fragilis* mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza FucT7 được nhân dòng vào pACYCDuet-1 (Novagen, UK) qua NcoI/EcoRI (C).

Fig.5 thể hiện trình tự ADN và trình tự axit amin của gen *amuc0760co* và protein Amuc0760co;

Fig.6 thể hiện trình tự ADN và trình tự axit amin của gen *fucT6* và protein FucT6.

Fig.7 thể hiện trình tự ADN và trình tự axit amin của gen *fucT7* và protein FucT7;

Fig.8 thể hiện việc phân tích tinh chế 3-fucosyllactosa qua sắc ký thẩm thấu gel BioGel P-2 sử dụng sắc ký lớp mỏng với pha động là butanol/axeton/axit

axetic/nước (35/35/7/23) và dung dịch pha tĩnh là diphenylamin anilin (2% diphenylamin, 2% anilin, 10% axit phosphoric, trong metanol); và

Fig.9 thể hiện sắc ký HPLC; tách bằng cột Phenomenex Rezex RCM Ca²⁺ với nước làm dung dịch rửa giải (0,6ml/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 80°C) và phát hiện bằng máy đo chỉ số khúc xạ (Shimadzu, Đức) (A); và sắc ký HPLC; tách bằng cột Dionex CarboPac PA1 với dung dịch NaOH 50mM làm dung dịch rửa giải (1ml/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 30°C) và phát hiện bằng máy phát hiện điện hóa DECADE II (Antec Leyden, Netherlands) (B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ "(các) polynucleotit" thông thường là dùng để chỉ polyribonucleotit hoặc polydeoxribonucleotit bất kỳ, có thể là ARN hoặc ADN không cải biến hoặc ARN hoặc ADN cải biến. "(Các) polynucleotit" bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chuỗi ADN đơn và đôi, ADN là hỗn hợp gồm các vùng chuỗi đơn và đôi hoặc các vùng chuỗi đơn và đôi và ba, ARN chuỗi đơn và đôi, và ARN là hỗn hợp gồm các vùng chuỗi đơn và đôi, các phân tử lai bao gồm ADN và ARN có thể là các vùng chuỗi đơn hoặc, thông thường hơn là, chuỗi đôi, hoặc chuỗi ba, hoặc hỗn hợp gồm các vùng chuỗi đơn và đôi. Ngoài ra, "polynucleotit" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chuỗi ba vùng bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Các chuỗi trong vùng này có thể từ cùng một phân tử hoặc từ các phân tử khác nhau. Vùng này có thể bao gồm toàn bộ một hoặc nhiều phân tử này, nhưng thông thường hơn là chỉ liên quan đến một vùng các phân tử này. Một trong số các phân tử này chứa vùng xoắn ba thường là một oligonucleotit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "(các) polynucleotit" cũng bao gồm các ADN hoặc các ARN như được mô tả ở trên chứa một hoặc nhiều bazơ cải biến. Vì vậy, các ADN hoặc các ARN có mạch chính được cải biến vì độ ổn định hoặc vì các lý do khác là "(các) polynucleotit" như thuật ngữ được sử dụng ở đây. Hơn nữa, các ADN hoặc các ARN bao gồm các bazơ bất thường, như inosin, hoặc các bazơ cải biến, như các bazơ tritylat hóa, được đưa ra đây làm hai ví dụ, là các polynucleotit như thuật ngữ được sử dụng ở đây. Cũng được đánh giá cao là nhiều cải biến lớn khác nhau được thực hiện với ADN và ARN tạo ra nhiều mục đích hữu ích đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Thuật ngữ "(các)

polynucleotit" như được sử dụng ở đây bao gồm các dạng cải biến hóa học, enzym hoặc chuyển hóa của các polynucleotit, cũng như các dạng hóa học của ADN và ARN đặc trưng của virus và tế bào, bao gồm, ví dụ, tế bào đơn và tế bào phức. Cũng như vậy, "(các) polynucleotit" cũng bao gồm các polynucleotit ngắn thường để chỉ (các) oligonucleotit.

"Các polypeptit" dùng để chỉ peptit hoặc protein bất kỳ bao gồm hai hoặc nhiều axit amin kết hợp với nhau bởi liên kết peptit hoặc liên kết peptit được cải biến. "Các polypeptit" dùng để chỉ cả các mạch ngắn, thông thường dùng để chỉ các peptit, oligopeptit và oligome và các mạch dài hơn thông thường là dùng để chỉ các protein. Các polypeptit có thể chứa các axit amin không phải là 20 axit amin được mã hóa gen. "Các polypeptit" bao gồm các chất được cải biến bởi các chu trình tự nhiên, như các cải biến trong chu trình và các cải biến sau phiên mã khác, và bởi các kỹ thuật cải biến hóa học. Các cải biến này đã được mô tả chi tiết trong các tài liệu cơ bản và trong các công trình nghiên cứu chi tiết hơn, cũng như trong các tài liệu nghiên cứu phong phú, và chúng đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Được đánh giá cao là các dạng cải biến này có thể có mặt ở cùng một hoặc nhiều mức độ khác nhau tại một số vị trí trong polypeptit đã cho. Cũng như vậy, polypeptit đã cho có thể chứa nhiều kiểu cải biến. Các cải biến có thể xuất hiện ở vị trí bất kỳ trong polypeptit, bao gồm mạch peptit chính, mạch bên axit amin, và đầu cuối amino hoặc carboxyl. Các cải biến bao gồm, ví dụ, axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amit hóa, gắn kết đồng hóa trị của flavin, gắn kết đồng hóa trị của gốc heme, gắn kết đồng hóa trị của nucleotit hoặc có nguồn gốc nucleotit, gắn kết đồng hóa trị của lipid hoặc có nguồn gốc lipid, gắn kết đồng hóa trị của phosphatidylinositol, liên kết ngang, đóng vòng, tạo liên kết disulfua, khử metyl hóa, tạo liên kết ngang hóa trị hai, tạo pyroglutamat, formyl hóa, gamma-carboxyl hóa, glycosyl hóa, tạo GPI anchor, hydroxyl hóa, iot hóa, metyl hóa, myristoyl hóa, oxy hóa, quy trình phân giải protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, racemic hóa, gắn lipid, sulfua hóa, gamma-carboxyl hóa các gốc axit glutamic, hydroxyl hóa và ADP-ribosyl hóa, selenoyl hóa, cộng trung gian ARN vận chuyển axit amin thành protein, như arginyl hóa và ubiquitin hóa. Các polypeptit có thể là mạch nhánh hoặc mạch vòng, có hoặc không có mạch nhánh.

Các polypeptit vòng, nhánh và vòng nhánh có thể được tạo thành từ các chu trình tự nhiên sau phiên mã và có thể được tạo thành hoàn toàn bằng phương pháp tổng hợp, cũng được.

"Được phân lập" có nghĩa là được biến đổi "bởi bàn tay của con người" từ trạng thái tự nhiên của nó, tức là, nếu nó có xuất hiện trong tự nhiên, thì nó có thể được thay đổi hoặc được loại bỏ khỏi môi trường gốc, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt trong tự nhiên trong tổ chức sống không "được phân lập", nhưng polynucleotit hoặc polypeptit này được phân lập từ các nguyên liệu đồng tồn tại ở trạng thái tự nhiên "được phân lập", đối với thuật ngữ được sử dụng ở đây. Tương tự, trình tự "tổng hợp", như thuật ngữ được sử dụng ở đây, có nghĩa là trình tự bất kỳ được tạo thành bằng cách tổng hợp và không được phân lập trực tiếp từ nguồn tự nhiên. "Thể tái tổ hợp" có nghĩa là ADN biến đổi gen được sản xuất bằng cách cấy ghép hoặc nối các gen từ một loài vào tế bào tổ chức vật chủ của loài khác. ADN này trở thành một phần của cấu trúc di truyền của vật chủ và được sao chép.

Thuật ngữ "polynucleotit mã hóa polypeptit" như được sử dụng ở đây bao gồm các polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, cụ thể là alpha-1,3-fucosyltransferaza có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4 và 6. Thuật ngữ này cũng bao gồm các polynucleotit chứa vùng liên tục đơn hoặc vùng không liên tục mã hóa polypeptit (ví dụ, bị gián đoạn bởi thể thực khuẩn tích hợp hoặc trình tự bổ sung hoặc sửa đổi) cùng với vùng bổ sung cũng có thể chứa trình tự mã hóa và/hoặc không mã hóa.

"(Các) biến thể" như thuật ngữ được sử dụng ở đây, là polynucleotit hoặc polypeptit lần lượt khác polynucleotit hoặc polypeptit tham khảo, nhưng giữ được các đặc tính cần thiết. Biến thể điển hình của polynucleotit khác về trình tự nucleotit với các polynucleotit khác, polynucleotit tham khảo. Sự thay đổi trong trình tự nucleotit của biến thể này có thể có hoặc có thể không thay đổi trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit tham khảo. Sự thay đổi nucleotit có thể dẫn đến thế đoạn, thêm đoạn, khuyết đoạn, hợp nhất và cắt đoạn axit amin trong polypeptit được mã hóa bởi trình tự tham khảo, như được mô tả dưới đây. Biến thể điển hình của polypeptit khác biệt trong trình tự axit amin với

các biến thể khác, polypeptit tham khảo. Thông thường là, sự khác nhau bị giới hạn sao cho các trình tự của polypeptit tham khảo và biến thể này tương tự nhau về tổng thể và, trong nhiều vùng, là tương đồng. Một biến thể và polypeptit tham khảo có thể khác nhau trong trình tự axit amin bởi một hoặc nhiều thể đoạn, thêm đoạn, khuyết đoạn trong kết hợp bất kỳ. Gốc axit amin thể hoặc chèn có thể là hoặc có thể không phải là gốc được mã hóa bởi mã di truyền. Biến thể của polynucleotit hoặc polypeptit có thể xuất hiện trong tự nhiên như biến thể alelic, hoặc có thể là biến thể không tìm thấy trong tự nhiên. Các biến thể không xuất hiện trong tự nhiên của các polynucleotit và polypeptit có thể được tạo thành bằng kỹ thuật đột biến gen, bằng các phương pháp tổng hợp khác và bằng phương pháp tái tổ hợp khác đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến.

Các thuật ngữ "alpha-1,3-fucosyltransferaza hoặc fucosyltransferaza" hoặc axit nucleic/polynucleotit mã hóa "alpha-1,3-fucosyltransferaza hoặc fucosyltransferaza" dùng để chỉ glycosyltransferaza xúc tác vận chuyển fucoza từ cơ chất thể cho, ví dụ, GDP-fucoza, đến phân tử thể nhận trong liên kết alpha-1,3. Phân tử thể nhận này có thể là carbohydrat, oligosacarit, protein hoặc (glyco)protein, hoặc lipid hoặc (glyco)lipit, và có thể là, ví dụ, N-axetylglucosamin, N-axetylactosamin, galactosa, fucoza, axit sialic, glucoza, lactosa hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Trong phạm vi của sáng chế, các biến thể đa hình, các allen, các dạng đột biến và các dạng đồng đẳng giữa các loài của axit nucleic/polynucleotit và polypeptit cũng được bao gồm trong thuật ngữ này, chúng có trình tự axit amin lớn hơn 60% trình tự axit amin tương đồng, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, tốt hơn là 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc nhiều hơn các trình tự axit amin, tốt hơn là trên một khu vực có các axit amin ít nhất khoảng 25, 50, 100, 200, 500, 1000, hoặc nhiều hơn, tương đồng với polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic được chọn từ SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5, hoặc trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6.

Ngoài ra, polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza có thể được thay đổi bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ các trình tự peptit để biến đổi tính chất của nó. Ví dụ, các trình tự polypeptit có thể được hợp nhất với polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza để tạo nên hoạt tính enzym bổ sung. Theo cách khác, axit amin có thể bị loại bỏ để

loại bỏ hoặc thay đổi hoạt tính của protein. Protein có thể được cải biến để thiếu hoạt tính enzym alpha-1,3-fucosyltransferaza nhưng giữ lại cấu trúc ba chiều của nó. Cải biến này hữu ích trong việc phát triển các kháng thể chống lại polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza.

Ngoài ra, các sản phẩm gen alpha-1,3-fucosyltransferaza có thể bao gồm các protein hoặc polypeptit đại diện cho các sản phẩm gen tương đương về chức năng. Các sản phẩm gen alpha-1,3-fucosyltransferaza tương đương này có thể chứa khuyết đoạn, thêm đoạn hoặc thế đoạn của các gốc axit amin trong trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự gen alpha-1,3-fucosyltransferaza được mô tả ở trên, nhưng có thay đổi thầm lặng, nhờ đó tạo thành sản phẩm gen alpha-1,3-fucosyltransferaza tương đương về chức năng. Việc thay thế axit amin có thể được thực hiện trên cơ sở tương đồng về tính phân cực, điện tích, độ hòa tan, độ kỵ nước, độ thân nước và/hoặc tính lưỡng cực của các gốc có liên quan. Ví dụ, axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan và methionin; axit amin trung tính hai chiều bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin và glutamin; axit amin điện tích dương (bazo) bao gồm arginin, lysin và histidin; và axit amin điện tích âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Trong nội dung sáng chế này, "tương đương về chức năng", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ polypeptit có khả năng thể hiện hoạt tính tương tự đáng kể *in vivo* để làm các sản phẩm gen alpha-1,3-fucosyltransferaza nội sinh được mã hóa bởi các trình tự gen alpha-1,3-fucosyltransferaza được mô tả ở trên, được đánh giá bởi các tiêu chí, bao gồm nhưng không giới hạn ở tính kháng nguyên, tức là, khả năng liên kết với kháng thể anti-alpha-1,3 -fucosyltransferaza, tính miễn dịch, tức là, khả năng tạo ra kháng thể có khả năng liên kết với alpha-1,3 -fucosyltransferaza protein hoặc polypeptit, cũng như hoạt tính enzym.

Thuộc phạm vi của sáng chế là các protein alpha-1,3-fucosyltransferaza, polypeptit, và các dẫn xuất (bao gồm các đoạn) được cải biến khác biệt trong hoặc sau quá trình vận chuyển. Hơn nữa, các chất đồng đẳng axit amin không thông thường hoặc axit amin hóa học có thể được đưa vào làm thế đoạn hoặc thêm đoạn vào trình tự polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza.

Polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza có thể được sản xuất bởi kỹ thuật tái tổ hợp ADN sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ có thể được sử dụng để tạo thành các vectơ biểu hiện chứa các trình tự mã hóa alpha-1,3-fucosyltransferaza và các tín hiệu kiểm soát vận chuyển phiên mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp gen *in vivo*. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

"Oligosacarit" là thuật ngữ được sử dụng ở đây và thông thường được hiểu như trong lĩnh vực kỹ thuật này, dùng để chỉ polyme sacarit chứa số lượng nhỏ, thông thường từ ba đến mười đường đơn, tức là monosacarit.

Theo phương án khác của sáng chế, vectơ được cung cấp, chứa trình tự axit nucleic làm polypeptit mã hóa có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza, trong đó trình tự axit nucleic này được liên kết với các trình tự kiểm soát được nhận biết bởi tế bào vật chủ được biến nạp với vectơ này. Trong phương án được đặc biệt ưu tiên, vectơ là vectơ biểu hiện, và, theo phương án khác của sáng chế, vectơ này có thể có mặt ở dạng plasmid, cosmit, thể thực khuẩn, liposom hoặc virut.

Để sản xuất thể tái tổ hợp, tế bào chủ có thể được biến đổi gen để kết hợp các hệ biểu hiện hoặc các phần của chúng hoặc các polynucleotit theo sáng chế. Việc đưa polynucleotit vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng các phương pháp được mô tả trong nhiều sách hướng dẫn trong phòng thí nghiệm tiêu chuẩn, như Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986), and Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Vì vậy, polynucleotit theo sáng chế, có thể, ví dụ, được bao gồm trong vectơ được biến nạp/chuyển nạp một cách ổn định vào tế bào chủ. Trong vectơ này, polynucleotit theo sáng chế được đặt dưới sự kiểm soát của, ví dụ, trình tự khởi động cảm ứng, nhờ đó biểu hiện của gen/polynucleotit có thể được nhắm tới một cách cụ thể, và, nếu muốn, gen này có thể được biểu hiện quá mức theo cách này.

Các hệ biểu hiện khác nhau có thể được sử dụng để sản xuất các polypeptit theo sáng chế. Các vectơ này bao gồm, ngoài các vectơ khác, chromosomal, episomal và các vectơ có nguồn gốc từ virus, ví dụ, các vectơ có nguồn gốc từ các plasmid vi khuẩn, từ các thực khuẩn, từ các gen nhảy, từ các episome nấm men, từ các yếu tố chèn, từ các yếu tố chromosomal nấm men, từ virus, và các vectơ có nguồn gốc từ kết hợp của chúng, như các vectơ có nguồn gốc từ plasmid và các yếu tố di truyền của thực khuẩn, như cosmit và phagemit. Các cấu trúc hệ biểu hiện có thể chứa vùng kiểm soát điều chỉnh cũng như tạo ra biểu hiện. Thông thường là, hệ hoặc vectơ bất kỳ thích hợp để duy trì, nhân giống hoặc biểu hiện các polynucleotit và/hoặc để biểu hiện polypeptit trong vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện trong trường hợp này. Trình tự ADN thích hợp có thể được chèn vào hệ biểu hiện bằng kỹ thuật thông thường đã biết bất kỳ, như, ví dụ, kỹ thuật được nêu trong Sambrook và các đồng tác giả, xem ở trên.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến polypeptit được phân lập có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6;
- b) trình tự axit amin của biến thể alelic có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6, trong đó biến thể alelic này được mã hóa bởi phân tử axit nucleic lai trong điều kiện nghiêm ngặt thành các chuỗi đối diện của phân tử axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5;
- c) trình tự axit amin của ortholog có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6, trong đó ortholog này được mã hóa bởi phân tử axit nucleic lai trong điều kiện nghiêm ngặt thành các chuỗi đối diện của phân tử axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 1, 3 hoặc 5; và
- (d) đoạn của trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6, trong đó đoạn này bao gồm ít nhất 10 axit amin liên tiếp, và trong đó đoạn này có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza.

Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" dùng để chỉ các điều kiện trong đó một mẫu dò sẽ lai thành trình tự đích của nó, nhưng không thành trình tự khác. Các điều kiện nghiêm ngặt phụ thuộc vào trình tự và sẽ khác nhau trong các hoàn cảnh khác nhau. Trình tự dài hơn sẽ lai đặc biệt ở nhiệt độ cao hơn. Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn thấp hơn khoảng 15°C so với điểm nóng chảy (T_m) đối với trình tự cụ thể ở cường độ ion và độ pH xác định trước. T_m là nhiệt độ (ở cường độ ion, độ pH và nồng độ axit nucleic xác định trước) ở đó 50% mẫu dò bổ sung cho trình tự đích lai thành trình tự đích ở trạng thái cân bằng. Các điều kiện nghiêm ngặt có thể ví dụ là: 50% formamit, 5x SSC và 1% SDS, ủ ở nhiệt độ 42°C, hoặc, 5x SSC, 1% SDS, ủ ở nhiệt độ 65°C, rửa trong 0,2x SSC, và 0,1% SDS ở nhiệt độ 65°C.

Cũng như vậy, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ chứa vectơ như được định nghĩa ở trên, và cụ thể là tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm nấm bao gồm tế bào nấm men, vi khuẩn, côn trùng, động vật và thực vật. Được đặc biệt ưu tiên nếu tế bào vật chủ là tế bào *Escherichia coli*.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào vật chủ" dùng để chỉ tế bào đã được biến nạp hoặc chuyển nạp, hoặc có khả năng biến nạp hoặc chuyển nạp bởi trình tự polynucleotit ngoại sinh.

Các hệ vectơ biểu hiện vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hóa gen alpha-1,3-fucosyltransferaza theo sáng chế. Các hệ biểu hiện vật chủ này biểu diễn phương tiện mà nhờ nó các trình tự mã hóa quan tâm có thể được tạo thành và sau đó được tinh chế, nhưng cũng biểu diễn tế bào mà, nếu được biến nạp hoặc chuyển nạp bằng các trình tự mã hóa nucleotit thích hợp, thì biểu hiện sản phẩm gen alpha-1,3-fucosyltransferaza theo sáng chế ở đúng vị trí của nó.

Số lượng các hệ biểu hiện và vật chủ thích hợp có thể, ví dụ, được tìm thấy trong công bố đơn quốc tế số WO 98/55630, đối với các fucosyltransferaza được tách từ *Helicobacter pylori*, công bố này được đưa ra đây để tham khảo.

Theo phương án khác của sáng chế, axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza thích nghi với việc sử dụng đơn vị mã của tế bào tương ứng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất oligosacarit, các (glyco)protein và (glyco)lipit fucosyl hóa bao gồm các bước:

- a. cung cấp polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza theo sáng chế,
- b. cho polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza của bước a. tiếp xúc với hỗn hợp bao gồm cơ chất thể cho chứa gốc fucoza và cơ chất thể nhận bao gồm mono- hoặc oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit trong các điều kiện trong đó polypeptit xúc tác vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho tới cơ chất thể nhận, nhờ đó tạo thành oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa.

Theo sáng chế, phương pháp sản xuất oligosacarit fucosyl hóa có thể được thực hiện trong hệ không tế bào hoặc trong hệ chứa tế bào. Các cơ chất được phép phản ứng với polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza trong thời gian thích hợp và trong các điều kiện thích hợp để cho phép tạo thành sản phẩm enzym. Được hiểu là, các điều kiện này sẽ thay đổi phụ thuộc vào lượng và độ tinh khiết của cơ chất và enzym, hệ này là hệ không tế bào hay trong hệ nền tế bào. Các điều kiện này có thể được điều chỉnh dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong các hệ không tế bào, polypeptit theo sáng chế, (các) cơ chất thể nhận, (các) cơ chất thể cho và, trường hợp có thể là, các thành phần hỗn hợp phản ứng khác, bao gồm các glycosyltransferaza và các enzym phụ bằng cách trộn trong môi trường phản ứng nước. Các enzym này có thể được sử dụng tự do trong dung dịch, hoặc chúng có thể được liên kết hoặc được cố định vào chất hỗ trợ như polyme và các cơ chất có thể được bổ sung vào chất hỗ trợ. Chất hỗ trợ có thể, ví dụ, được nhồi trong cột.

Các hệ chứa tế bào để tổng hợp oligosacarit fucosyl hóa có thể bao gồm tế bào vật chủ cải biến tái tổ hợp.

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất các oligosacarit, (glyco)protein và (glyco)lipit fucosyl hóa bao gồm các bước:

- a. cho sinh trưởng, trong điều kiện dinh dưỡng thích hợp cho phép để sản xuất oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa, và

cho phép biểu hiện polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza, tế bào vật chủ như được mô tả ở trên;

- b. cung cấp, đồng thời hoặc sau đó vào bước a., cơ chất thể cho chứa gốc fucoza và cơ chất thể nhận bao gồm oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit, nhờ đó alpha-1,3-fucosyltransferaza được biểu hiện trong tế bào vật chủ xúc tác vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho tới cơ chất thể nhận, nhờ đó tạo thành oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa; và
- c. phân lập oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa này từ tế bào vật chủ hoặc môi trường mà nó sinh trưởng.

Trong phương pháp theo sáng chế, cơ chất thể cho có thể là GDP-fucoza. được đặc biệt ưu tiên nếu cơ chất thể cho là GDP-fucoza.

Theo một phương án của sáng chế, cơ chất thể nhận được chọn từ N-axetylglucosamin, N-axetylactosamin, galactoza, fucoza, axit sialic, glucoza, lactoza hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Cụ thể là, lactoza được ưu tiên làm cơ chất thể nhận.

Thuật ngữ "cơ chất", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là nguyên liệu bất kỳ hoặc kết hợp của các nguyên liệu khác nhau có thể được tác động bởi polypeptit theo sáng chế để tạo thành các oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa.

Các cơ chất được phép phản ứng với polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza trong thời gian thích hợp và trong các điều kiện thích hợp để cho phép tạo thành sản phẩm enzym. Các điều kiện này sẽ thay đổi phụ thuộc vào lượng và độ tinh khiết của cơ chất và enzym, hệ này là hệ không tế bào hay hệ nền tế bào. Những thay đổi này sẽ được điều chỉnh dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, cơ chất thể cho được cung cấp trong bước b. bằng cách sản xuất nó trong tế bào vật chủ. Làm như vậy, enzym chuyển hóa, ví dụ, fucoza, được bổ sung vào tế bào vật chủ, thành GDP-fucoza được biểu hiện đồng thời trong tế bào vật chủ. Enzym này có thể là, ví dụ, fucoza kinaza/fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza hai chức, giống như Fkp từ *Bacteroides fragilis*, hoặc kết hợp của một fucoza kinaza riêng biệt cùng với một

fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza riêng biệt giống như đã biết ở một số loài bao gồm *Homo sapiens*, *Sus scrofa* và *Rattus norvegicus*.

Theo cách khác, trong bước b., cơ chất thể cho có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy/tế bào vật chủ hoặc được sản xuất nhờ trao đổi chất tế bào.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm các bước sau:

- a) cho sinh trưởng, tế bào vật chủ được biến nạp hoặc chuyển nạp để chứa trình tự axit nucleic được chọn từ i) SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5 từ danh mục trình tự đi kèm, ii) trình tự axit nucleic bổ sung cho SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 5, và iii) các trình tự axit nucleic lai trong điều kiện nghiêm ngặt vào các trình tự axit nucleic được định nghĩa trong i) và ii) hoặc chuỗi bổ sung của chúng, trong điều kiện dinh dưỡng thích hợp nhờ đó trình tự axit nucleic được chọn từ i), ii) và iii) được biểu hiện dưới dạng peptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza;
- b) cung cấp, đồng thời hoặc sau đó vào bước a., cơ chất thể cho chứa gốc fucoza và cơ chất thể nhận bao gồm oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit, nhờ đó alpha-1,3-fucosyl-transferaza được biểu hiện trong tế bào vật chủ xúc tác vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho tới cơ chất thể nhận, nhờ đó tạo thành oligosacarit, (glyco)protein hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa; và
- c) phân lập oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa này từ tế bào vật chủ hoặc môi trường mà nó sinh trưởng.

Trong các phương pháp theo sáng chế, peptit được biểu hiện trong tế bào vật chủ, thể hiện hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza và, nhờ đó, vận chuyển gốc fucoza từ thể cho, ví dụ guanosin-diphosphat fucoza (GDP-fucoza), đến thể nhận, bao gồm các oligosacarit, (glyco)protein và (glyco)lipit. Theo cách này, cơ chất thể nhận fucosyl hóa có thể được sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm, để làm chất bổ sung cho thức ăn trẻ em, hoặc làm hợp chất có hoạt tính điều trị hoặc dược lý. Với các phương pháp này, các sản phẩm fucosyl hóa có thể được cung cấp dễ dàng và hiệu quả, mà không cần quy trình tổng hợp phức tạp, tốn thời gian và chi phí.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân lập" có nghĩa là thu hoạch, thu gom hoặc tách từ hệ biểu hiện gen này sản phẩm được sản xuất bởi alpha-1,3-fucosyltransferaza theo sáng chế.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa thu được bằng các phương pháp theo sáng chế, cũng như sử dụng polynucleotit, vector hoặc polypeptit như được mô tả ở trên để sản xuất các oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa.

Theo phương án khác nữa, việc sản xuất oligosacarit, (glyco)protein và/hoặc (glyco)lipit fucosyl hóa này được thực hiện bằng cách biểu hiện (quá mức) polynucleotit mã hóa alpha-1,3 fucosyltransferaza khác loại hoặc tương đồng.

Trừ khi có định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây thông thường là có cùng nghĩa thông thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, danh pháp được sử dụng ở đây và quy trình nuôi cấy tế bào trong phòng thí nghiệm, di truyền học phân tử, hóa học hữu cơ và hóa học axit nucleic và phương pháp lai được mô tả ở trên và dưới đây đã được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật thông thường được sử dụng để tổng hợp axit nucleic và peptit. Thông thường, các phản ứng enzym và các bước tinh chế được thực hiện theo thông số kỹ thuật của nhà sản xuất.

Sáng chế cũng bao gồm các đoạn của các trình tự polynucleotit được bộc lộ ở đây.

Các ưu điểm khác dưới đây mô tả các phương án và hình vẽ đi kèm.

Không cần phải nói rằng các dấu hiệu nêu trên và các dấu hiệu sẽ được mô tả dưới đây có thể được sử dụng không chỉ trong các kết hợp cụ thể tương ứng mà còn trong các kết hợp hoặc riêng khác, mà không nằm ngoài phạm vi sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nhân dòng gen

Gen này mã hóa fucosyltransferaza Amuc0760 được tối ưu codon và được tổng hợp bởi GenScript, Piscataway, New Jersey (USA). Với hai trình tự flanking

mã hóa cho attB-Sites cho nhân dòng Gateway (Gateway-Cloning) (trình tự 5': GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC (SEQ ID NO: 7), trình tự 3': TAGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCC-C (SEQ ID NO: 8)) được nhân dòng vào pUC57 bằng GenScript. Quá trình chuyển Gateway (Gateway-transfer) vào vector pDEST14 (Invitrogen GmbH, Đức) (xem Fig.3A) được tiến hành theo hướng dẫn của nhà cung cấp (Invitrogen GmbH, Đức). Polynucleotit mã hóa cho N-terminally His-tagged Amuc0760co được khuếch đại từ pUC57-amuc0760co sử dụng các môi GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC-AGGCTTCGAAGGAGATACAACCATGGGCCATCACCATCATCACCAAA-AACGCTGAAAATTAGCTTTC (SEQ ID NO: 9) và GGGGACCACTTTGTAC-AAGAAAGCTGGGTC (SEQ ID NO: 10). Polynucleotit mã hóa cho C-terminally His-tagged amuc0760co được khuếch đại từ pUC57-amuc0760co sử dụng các môi GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC (SEQ ID NO: 11) và GGGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC (SEQ ID NO: 12).

Các gen mã hóa cho các fucosyltransferaza FucT6 và FucT7 được khuếch đại từ bộ gen ADN của *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 với các môi GGGGACA-AGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATACAACCATGTGTGAT-TGCTTGTCTATCATATTG (SEQ ID NO: 13)/GGGGACCACTTTGTACAAGA-AAGCTGGGTCTTATTTTCTATCAAACAATTGAGAATAATATTC (SEQ ID NO: 14) và GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGAT-ACAACCATGGATATATTGATTCTTTTTTATAATACGATG (SEQ ID NO: 15)/GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATATCCCTCCCAATT-TTAGTTCG (SEQ ID NO: 16), lần lượt, và cũng được nhân dòng vào pDEST14 sử dụng Công nghệ Gateway (Invitrogen GmbH, Đức) (xem Fig.3B và 3C).

Biểu hiện của các fucosyltransferaza

Các gen *amuc0760co*, *fucT6* và *fucT7* được nhân dòng bổ sung vào vector biểu hiện pACYCDuet-1 (Novagen, UK). Để nhân dòng *amuc0760co* bằng cách giới hạn bằng NcoI/PstI và môi thất tiếp theo AGCTAGCCATGGGCAAAACGC-TGAAAATTAGCTTTCTG (SEQ ID NO. 17) và AGCTAGCTGCAGTTAGCGA-CGCAGGCGATTTTTC (SEQ ID NO: 18) được sử dụng (vị trí giới hạn được gạch chân) và sản phẩm tạo thành được gọi là pACYC-*amuc0760co* (xem Fig.4A).

fucT6 được nhân dòng qua NcoI/BamHI sử dụng mỗi GATCACCATGGGCTGTG-ATTGCTTGTCTATCATATTG (SEQ ID NO: 19) và GATCAGGATCCTTATTT-TCTATCAAACAATTGAGAATAATATTC (SEQ ID NO: 20) (vị trí giới hạn được gạch chân) tạo thành pACYC-*fucT6* (xem Fig.4B), và *fucT7* được nhân dòng qua NcoI/EcoRI sử dụng mỗi GATCACCATGGATATATTGATTCTTTTTTATA-ATACGATGTGG (SEQ ID NO: 21) và GATCAGAATTCTCATATCCCTCCCA-ATTTTAGTTCGTG (SEQ ID NO: 22) (vị trí giới hạn được gạch chân) tạo thành pACYC-*fucT7* (xem Fig.4C).

Các chủng *E. coli* JM109(DE3) hoặc BL21(DE3) *lacZ* được biến nạp với plasmid thích hợp được mô tả ở trên. 5ml môi trường 2YT được cấy bằng vòng cấy và sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C và 180 vòng/phút qua đêm. 400ml 2YT được cấy với 4ml từ dung dịch nuôi cấy qua đêm và sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C và 180 vòng/phút cho đến khi đạt được OD₆₆₀ là 0,5. Biểu hiện được tạo thành bằng cách bổ sung 0,1mM IPTG và tiếp tục để sinh trưởng ở nhiệt độ 28°C và 180 vòng/phút qua đêm. Tế bào được thu gom và tái tạo huyền phù trong 4 thể tích/trọng lượng của 50 mM Tris-HCl độ pH 7,5 + 5mM MgCl₂ hoặc, nếu được sử dụng để tinh chế qua cột Ni Sepharose FF (HisPrep FF 16/10, GE Healthcare, Thụy Điển), trong 4 thể tích/trọng lượng 20mM Tris-HCl độ pH 7,5 + 500mM NaCl + 30mM imidazol. Các hạt thủy tinh được bổ sung với lượng gấp sáu lần trọng lượng của tế bào viên và huyền phù tế bào được khuấy tròn hai lần trong 5 phút, trong khi ở giữa huyền phù tế bào được đặt trong nước đá trong 5 phút. Sau khi phá vỡ tế bào, các mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 15000xg. Phần nổi lên trên mặt tạo thành được sử dụng để phân tích trên SDS-PAGE hoặc để tinh chế qua Ni Sepharose FF.

Phát hiện bằng phương pháp Western blot

His-tagged Amuc0760co được biểu hiện như được mô tả ở trên. Từ dịch chiết tế bào thô 10mg protein được tách trên 10% SDS gel. Protein được tẩm lên màng PVDF sử dụng bể Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. His-tagged Amuc0760co được phát hiện trên blot sử dụng bộ His-Tag Antibody HRP Conjugate Kit (Novagen, UK) theo hướng dẫn của nhà cung cấp (xem Fig.2).

Sản xuất hợp chất fucosyl hóa

Các tế bào *E. coli* BL21(DE3) BL21(DE3) *lacZ* pDEST14-fkp pCOLA-lacY-fucP được biến nạp với pACYC mang gen fucosyltransferaza thích hợp. Các khuẩn lạc được nuôi cấy trên đĩa 2YT với kháng sinh thích hợp. 5ml môi trường nuôi cấy qua đêm (2YT với kháng sinh) của mỗi chủng được sinh trưởng và từ môi trường nuôi cấy này mỗi 30ml môi trường khoáng được cấy vào 1%. Các tế bào được sinh trưởng sử dụng glyxerol làm nguồn cacbon và ở OD600 = 0,2 tạo ra 0,1mM IPTG và 20mM lactoza và 20mM fucoza được bổ sung. Quy trình sản xuất 3-fucosyllactoza được điều khiển bằng phân tích TLC và HPLC. So sánh lượng 3-fucosyllactoza (3-FL) được sản xuất bằng biểu hiện của FutA từ *Helicobacter pylori* so với biểu hiện của Amuc0760co từ *Akkermansia muciniphila* cũng như FucT6 và FucT7 từ *Bacteroides fragilis* được biểu diễn trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: so sánh lượng hiệu suất 3-fucosyllactoza sử dụng các alpha-1,3-fucosyltransferaza FutA từ *Helicobacter pylori*, Amuc0760co từ *Akkermansia muciniphila* và FucT6 và FucT7 từ *Bacteroides fragilis*

Fucosyltransferaza	Hiệu suất 3-FL [mM]
Không có (mẫu đối chứng âm tính)	0
FutA (<i>Helicobacter pylori</i>)	3,83
Amuc0760co (<i>Akkermansia muciniphila</i>)	5,39
FucT6 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	4,95
FucT7 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	6,89

Như có thể thấy từ bảng 1, lượng sản phẩm 3-fucosyllactoza fucosyl hóa cao hơn đáng kể nếu sử dụng các alpha-1,3-fucosyltransferaza theo sáng chế, tức là Amuc0760co từ *Akkermansia muciniphila* và FucT6 và FucT7 từ *Bacteroides fragilis*, so với alpha-1,3-fucosyltransferaza FutA từ *Helicobacter pylori*, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tinh chế sản phẩm fucosyl hóa

3-fucosyllactoza được sản xuất như được mô tả ở trên được tinh chế trong một số bước. Bước thứ nhất là tinh chế bằng cách hấp phụ trên than hoạt tính. Phần

nổi lên trên của môi trường nuôi cấy từ bước sản xuất được phủ lên nền than hoạt tính. Dung dịch chảy qua được thu gom và phân tích, nhưng không có 3-fucosyllactoza còn lại được phát hiện. Để loại bỏ hợp chất trung gian liên kết không đặc hiệu như ví dụ các muối và axit amin nền than hoạt tính được rửa bằng nước cất (không có 3-FL trong dung dịch chảy ra). Sau đó 3-FL và lactoza và fucoza còn lại được rửa giải bằng etanol 96%. Sau đó etanol được làm bay hơi trong thiết bị làm bay hơi quay và cặn được lọc qua thiết bị 10kDa crossflow module (Microdyn Nadir, Đức). Các muối còn lại được loại bỏ bằng cách thẩm tách bằng điện và sau đó nội độc tố được loại bỏ bằng cách lọc sử dụng crossflow module (Pall, Đức). Sau đó 3-FL được tách từ lactoza và fucoza ở quy mô gam sử dụng sắc ký thẩm thấu gel, nguyên liệu Biogel P-2 (BioRad, Đức) được nạp vào cột thủy tinh 520mm x 428mm bằng frit. Bước tinh chế 3-FL được kiểm soát bởi sắc ký lớp mỏng (xem Fig.8). Các phân đoạn chỉ chứa 3-fucosyllactoza được gom lại và làm đông khô.

Khẳng định sự giống nhau của sản phẩm

3-fucosyllactoza được tinh chế được sản xuất sử dụng các fucosyltransferaza theo sáng chế được phân tích bằng $^1\text{H-NMR}$ và phổ khối. Phổ tạo thành phù hợp với phổ dự kiến cho 3-FL. Ngoài ra các phương pháp HPLC khác nhau được sử dụng để kiểm tra sự giống nhau của 3-FL tạo thành. Một phương pháp là tách sử dụng cột Phenomenex Rezex RCM Ca^{2+} sử dụng nước làm dung dịch rửa giải (0,6ml/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 80°C) và phát hiện bằng máy đo chỉ số khúc xạ (Shimadzu, Đức) (xem Fig.9A). Phương pháp khác là tách bằng cột Dionex CarboPac PA1 sử dụng 50mM NaOH làm dung dịch rửa giải (1ml/phút trong 35 phút ở nhiệt độ 30°C) và phát hiện bằng máy phát hiện điện hóa DECADE II (Antec Leyden, Netherlands) (xem Fig.9B).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất oligosacarit được fucosyl hóa, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a. cung cấp polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza và có khả năng sử dụng lactoza, hoặc oligosacarit bao gồm gốc lactoza, làm cơ chất thể nhận,

trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; và

b. tiếp xúc polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza của bước a với hỗn hợp bao gồm cơ chất thể cho chứa gốc fucoza, và cơ chất thể nhận bao gồm lactoza hoặc oligosacarit bao gồm gốc lactoza trong các điều kiện trong đó polypeptit xúc tác vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho tới cơ chất thể nhận, nhờ đó tạo thành oligosacarit được fucosyl hóa.

2. Phương pháp sản xuất oligosacarit được fucosyl hóa bao gồm các bước:

a. cho sinh trưởng *in vitro*, tế bào vật chủ vi khuẩn hoặc nấm chứa vectơ, trong đó the vectơ chứa trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza và có khả năng sử dụng lactoza, hoặc oligosacarit chứa gốc lactoza làm cơ chất thể nhận, trình tự axit nucleic được liên kết với trình tự kiểm soát, trong đó trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, trình tự axit nucleic bổ sung cho trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic bổ sung cho trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và trình tự axit nucleic bổ sung cho trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 5;

b. cung cấp đồng thời hoặc lần lượt vào bước a cơ chất thể cho chứa gốc fucoza và cơ chất thể nhận chứa lactoza hoặc oligosacarit chứa gốc lactoza, để polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza xúc tác việc vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho đến cơ chất thể nhận, nhờ đó sản xuất oligosacarit được fucosyl hoá, và

c. phân lập oligosacarit được fucosyl hoá nêu trên từ tế bào vật chủ hoặc môi trường sinh trưởng của nó.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất thể cho là GDP fucoza.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó cơ chất thể cho là GDP fucoza.

5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó GDP fucoza được tạo ra bởi enzym được biểu hiện đồng thời trong tế bào vật chủ hoặc bởi sự trao đổi chất của tế bào vật chủ.

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó GDP fucoza được tạo ra bởi enzym được biểu hiện đồng thời trong tế bào vật chủ hoặc bởi sự trao đổi chất của tế bào vật chủ.

7. Oligosacarit được fucosyl hoá thu được bằng phương pháp theo điểm 1.

8. Oligosacarit được fucosyl hoá thu được bằng phương pháp theo điểm 2.

9. Phương pháp sản xuất fucosyllactoza bằng cách sử dụng tế bào vật chủ vi khuẩn hoặc nấm bao gồm các bước:

a. cho sinh trưởng, *in vitro*, tế bào vật chủ vi khuẩn hoặc nấm được biến nạp hoặc chuyển nạp để biểu hiện polypeptit ngoại sinh có hoạt tính alpha-1,3-fucosyltransferaza và có khả năng sử dụng lactoza làm cơ chất thể nhận, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; và

i) polypeptit ngoại sinh có hoạt tính fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza/fucoza kinaza hai chức hoặc ii) cả polypeptit ngoại sinh có hoạt tính fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza và polypeptit ngoại sinh có hoạt tính fucoza kinaza;

b. cung cấp, đồng thời hoặc lần lượt đến bước a, cơ chất thể cho chứa gốc fucoza và cơ chất thể nhận, trong đó cơ chất thể nhận được chọn từ mono- hoặc disacarit hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó polypeptit alpha-1,3-fucosyltransferaza xúc tác việc

vận chuyển gốc fucoza từ cơ chất thể cho đến cơ chất thể nhận, nhờ đó sản xuất fucosyllactose; và

c. phân lập fucosyllactose từ tế bào vật chủ hoặc môi trường sinh trưởng của nó.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó oligosaccharit được fucosyl hoá được tạo ra là 3-fucosyllactose.

11. Phương pháp theo điểm 2, trong đó oligosaccharit được fucosyl hoá được tạo ra là 3-fucosyllactose.

12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó polypeptit ngoại sinh chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6.

13. Phương pháp theo điểm 9, trong đó tế bào vật chủ vi khuẩn hoặc nấm được biến nạp bằng phân tử axit nucleic mã hoá polypeptit ngoại sinh, và trong đó phân tử axit nucleic chứa trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5.

14. Phương pháp theo điểm 2, trong đó tế bào vật chủ là tế bào *E. coli* hoặc tế bào nấm.

15. Phương pháp theo điểm 5, trong đó tế bào vật chủ là tế bào *E. coli* hoặc tế bào nấm.

16. Phương pháp theo điểm 9, trong đó fucosyllactose được tạo ra là 3-fucosyllactose.

17. Phương pháp theo điểm 9, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6.

18. Phương pháp theo điểm 9, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Jennewein Biotechnologie GmbH

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT OLIGOSACARIT ĐƯỢC FUCOSYL HÓA VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT FUCOSYLLACTOZA BẰNG CÁCH SỬ DỤNG TẾ BÀO
VẬT CHỦ VI KHUẨN HOẶC NẤM

<130> 2827P103WO

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 999

<212> ADN

<213> Akkermansia muciniphila

<400> 1

```
atgaaaacgc tgaaaattag cttctgcaa agcaccgccg attcggccg tgagggtatg   60
ctgcaactgc tgaaatctcg ctatcatgtg gttgaagatg atagtgattt tgattacctg  120
gtggcgacgc cgtggttcta tgtaaccgt gaagcctttt acgatttctt ggaacgcgca  180
ccgggccata ttaccgtgat gtatggttgc cacgaagcga tcgccccgga tttatgctg  240
ttcgattatt acattggcct ggacaccgtg ccgggtagcg atcgtagcgt taaactgccg  300
tatctgcgcc atcacctgga agaagttcat ggcggtaaag aaggcctgga tgcacatgcc  360
ctgctggcca gaaaacggg ttttctaac ttcattctac ccaatcgtaa atctcatccg  420
aaccgcgatg caatgtttca caaactgagt gcgtttcgtt tcgtgaatag cctgggcccc  480
catctgaaca atacccggg cgatggtcac cgtgcggaag attggtatgc cagctctatt  540
cgcatgaaaa aaccgtacaa atttctatc gccttcgaaa acgcatggta cccgggttac  600
accagcgaaa aaatcggtac gtctatgctg gccggcacca ttccgatcta ttggggtaat  660
ccggatatta gccgtgaatt taacagtgcg agctttatca attgcatga tttccgacg  720
ctggatgatg cggcggcgta tgtgaaaaaa gttgatgaag atgataacct gtggtgtgaa  780
attatgagcc gcccgaggaa aaccccgga caggaagcac gtttctgga agaaaccgaa  840
cgcgaaacgg cgaaactgta taaaatctc gatcagagtc cggaagaagc ccgtcgcaaa  900
```

ggcgaaggta cctgggtgag ctattaccag cgttttctga aacgtgggtca tcgtatgcag 960

ctggcctggc gtcgcctgaa aaatgcctg cgtcgctaa 999

<210> 2

<211> 332

<212> PRT

<213> Akkermansia muciniphila

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 996

<212> ADN

<213> Bacteroides fragilis

<400> 3

atgtgtgatt gcttgtctat catattgtta gtcaaatga aaaagattta ttgaaattt 60
 gttgattttt gggatggatt tgatactatt tctaacttta ttgtggatgc ttgtccatt 120
 caatacgaag tagtactatc taatgagcca gattatttat tctattcatg ttttgaacg 180
 tcacatttag aatatgattg tataaaaatc atgtttatag gtgaaaatat agttcctgat 240
 ttaacgttt gtgattatgc cataggtttt aattatattg atttgggga ccgttacttg 300
 aggttgcctt tatatgctat atatgatgga tttcaaact tgcagaataa aaagattgat 360
 gtaaataaag cttagaccg taaattttgt agtattgttg ttcaaataa taaatgggca 420
 gatcctattc gtgagacttt cttaaatta ctatctagtt ataagaaagt agactctggt 480
 ggaagagcct ggaataatat aggaggacct gttgataata aattggattt tattagccaa 540
 tataagttha atattgcttt tgaaaatagt agggacttgg gatatacaac agaaaaata 600
 atggaaccta tgcaggtgaa ttctattcca gtatattggg gaaatccttt ggttggtaaa 660
 gatttaatg tggactcctt tgtaaatgct catgattttg attctttaga aagattagtt 720
 gagtatatta tagaattgga ttctcaaag gataaatatc tggaaatgtt ggaaaaacct 780
 tggcttctcg ataagacata ttggattgg aaacaattgc tgttaaattt tattaataat 840
 attatgatga aatcatataa ggatgcgaag tatttggtta attatggtca tgctggaaag 900
 tatagaaatg aacaacgctt ttggggggaga tgtgaacgta aatttaaact tcaaagaatt 960
 attgaatatt attctcaatt gttgataga aaataa 996

<210> 4

<211> 331

<212> PRT

<213> Bacteroides fragilis

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 891

<212> ADN

<213> Bacteroides fragilis

<400> 5

atggatatat tgattctttt ttataatacg atgtggggat ttccactcga gttccgaaag 60

gaagatttac ctgggggctg tgtgataacg actgatcgaa acctcattgc aaaggcggat 120

gctgtggttt tccattgcc cgatttcctt tcggtgatgg aggatgaaat cgataagcgg 180

gaaggacagc ttgggtggg atggagtctg gaatgtgaag agaattatag ttggacgaag 240

gatcccgagt tcagagagag ttttgactta tggatggggg atcatcagga ggatgatatt 300

gtgtatcctt attatggacc ggattatggg aagatgctgg ttacggcacg gagggaaaag 360

ccttataaga agaaggcatg tatgtttatt tcgagtata tgaaccggag tcatcgacaa 420

gagtatctta aggaattgat gcagtatacc gacatcgatt cgtatgggaa actataccgt 480

aattgtgaat tacctgttga ggatcgggga cgggatacac ttcttagtgt gatcggggat 540

tatcagtttg tgataagttt tgagaatgcg atagggaagg attatgtgac agaaaagttt 600

ttcaatcctt tgttgccgg tactgttccg gtctatctgg gagctccaa tattcgggaa 660

ttgtctcggg gagaaaattg ttttctggat attgtactt tcgattctcc cgagggagta 720

gccgctttta tgaatcaatg ctatgatgac gaggcattgt atgaacgttt ttatgcatgg 780

aggaaacggc cttattatt gtcgtttaca aaaaagtttag agcaagtccg gagcaatccg 840

ttaatcaggc ttgccaaaa aatacacgaa ctaaaattgg gagggatatg a 891

<210> 6

<211> 295

<212> PRT

<213> Bacteroides fragilis

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Leu Lys Leu Gly Gly
 290 295

<210> 7

<211> 46

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 7

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaacc 46

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Mọi

<400> 8
 taggaccag cttcttgta caaagtggc ccc 33

<210> 9
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Mọi

<400> 9
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat acaaccatgg gccatcacca 60

tcaccacac aaaacgctga aaattagctt tc 92

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Mọi

<400> 10
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc 30

<210> 11
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Mọi

<400> 11
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt c 31

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi

<400> 12
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc 30

<210> 13
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi

<400> 13
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat acaaccatgt gtgattgctt 60
 gtctatcata ttg 73

<210> 14
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi

<400> 14
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ttattttcta tcaaacaatt gagaataata 60
 ttc 63

<210> 15
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi

<400> 15

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcctt cgaaggagat acaaccatgg atatattgat 60

tcttttttat aatacatg

79

<210> 16

<211> 54

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mời

<400> 16

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catatccctc ccaattttag ttcg 54

<210> 17

<211> 38

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mời

<400> 17

agctagccat gggcaaaacg ctgaaaatta gctttctg 38

<210> 18

<211> 34

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mời

<400> 18

agctagctgc agttagcgac gcaggcgatt tttc 34

<210> 19

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mời

<400> 19

gatcaccatg ggctgtgatt gcttgtctat catattg 37

<210> 20
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi

<400> 20
 gatcaggatc cttattttct atcaaacaat tgagaataat attc 44

<210> 21
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

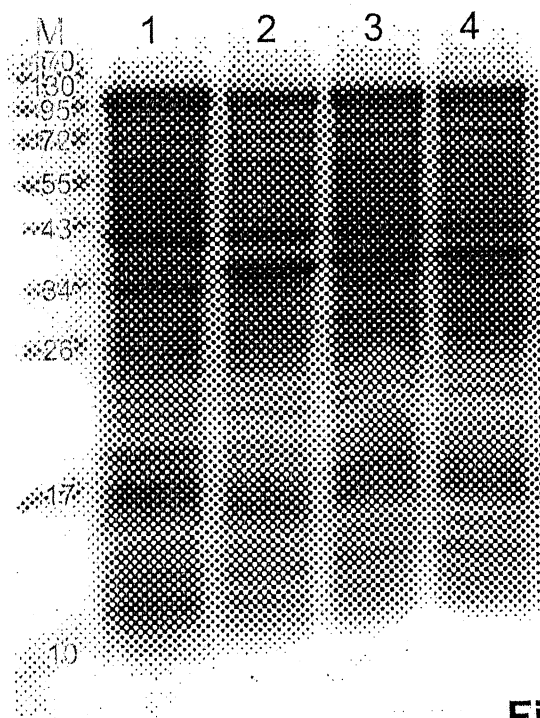
<220>
 <223> Mỗi

<400> 21
 gatcaccatg gatatttga ttctttttta taatacgatg tgg 43

<210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

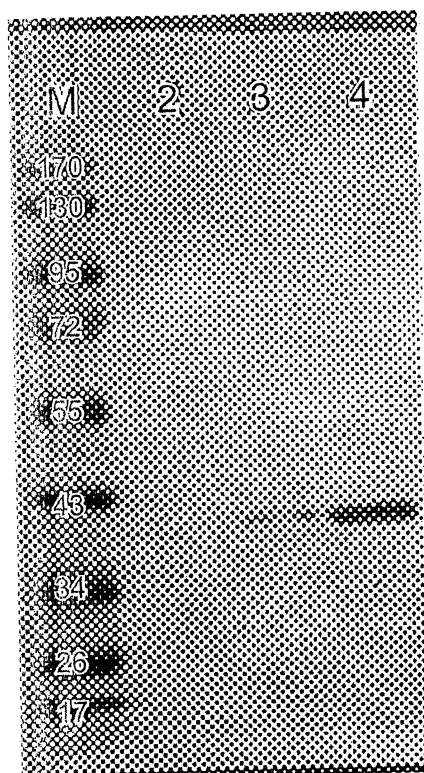
<220>
 <223> Mỗi

<400> 22
 gatcagaatt ctcatatccc tccaatttt agttcgtg 38



- M** Thang protein trước khi nhuộm pageruler, Fermentas
1. JM109(DE3) -
2. JM109(DE3) pDEST14-Amuc0760co
3. JM109(DE3) pDEST14-N-His-Amuc0760co
4. JM109(DE3) pDEST14-C-His-Amuc0760co

Fig. 1



- M** Thang protein trước khi nhuộm pageruler, Fermentas
1. JM109(DE3) pDEST14-Amuc0760co
2. JM109(DE3) pDEST14-N-His-Amuc0760co
3. JM109(DE3) pDEST14-C-His-Amuc0760co

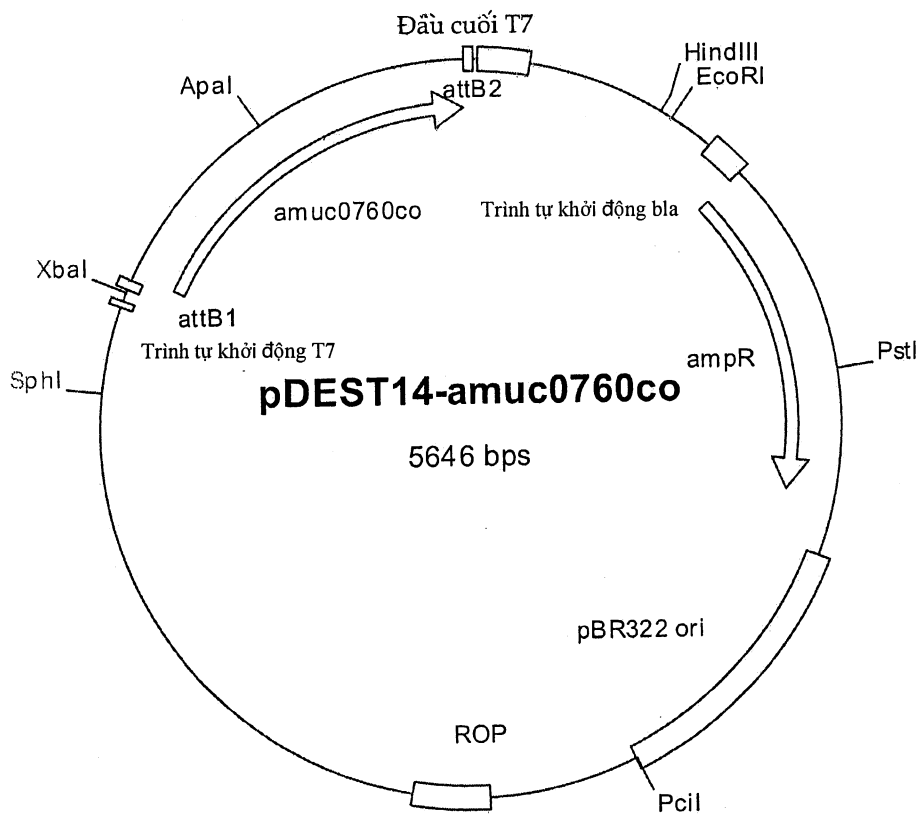


Fig. 3A

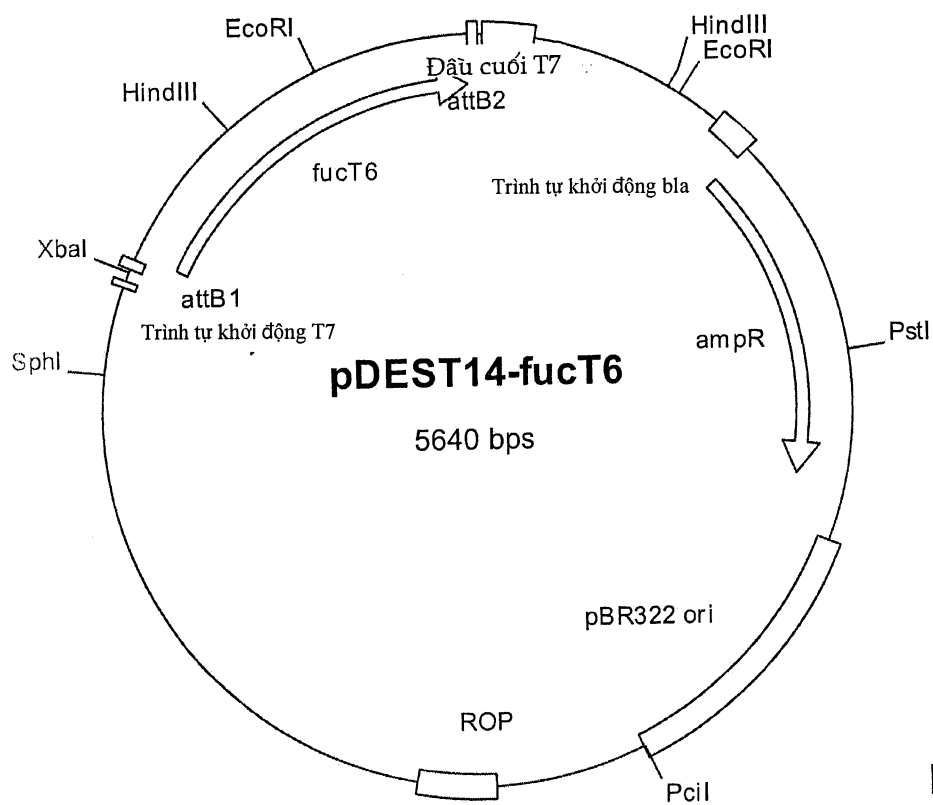


Fig. 3B

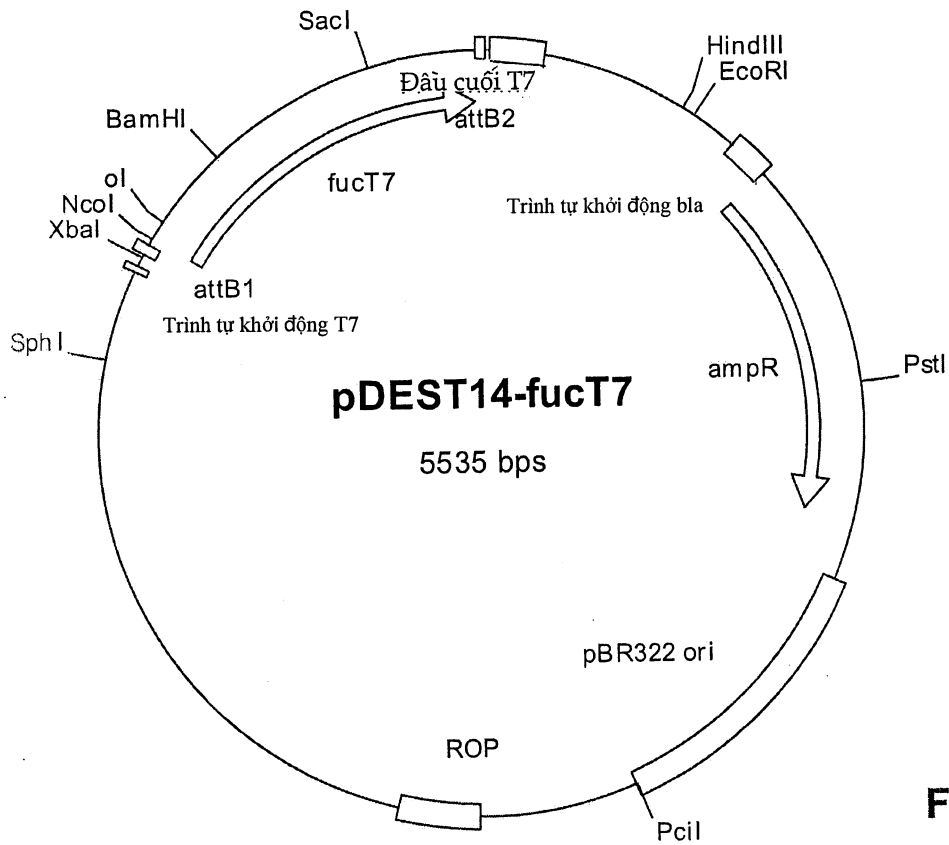


Fig. 3C

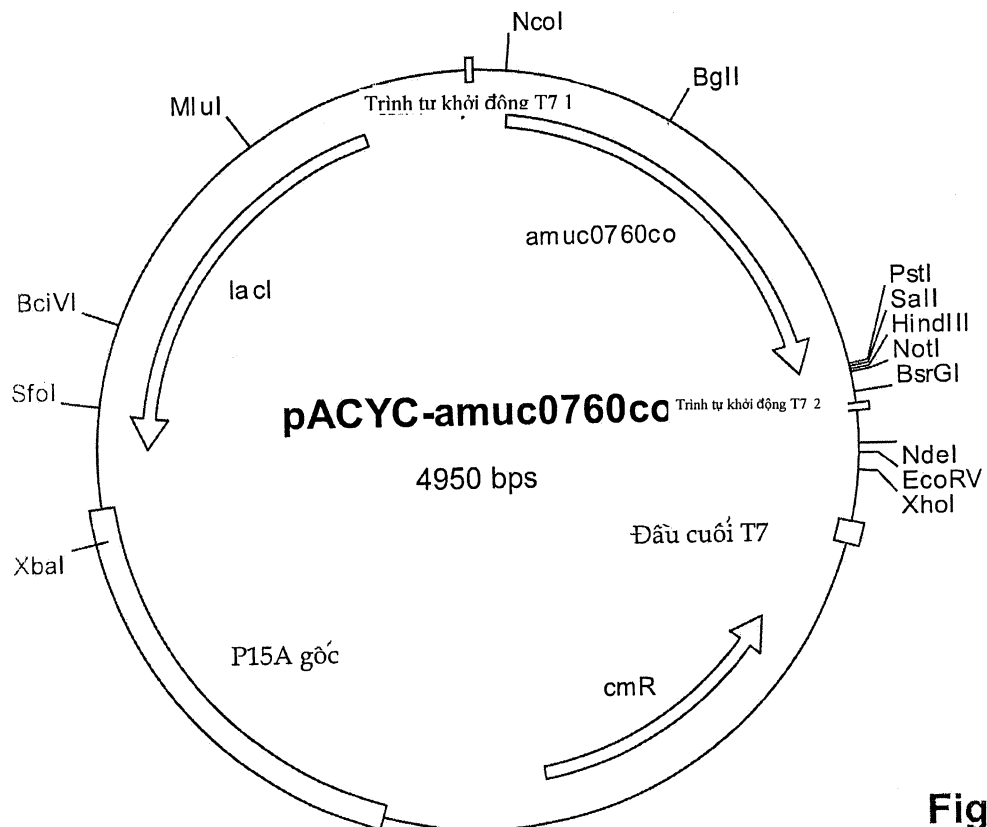


Fig. 4A

Fig. 4B

Fig. 4C

Trình tự gen *amuc0760co*:

ATGAAAACGCTGAAAATTAGCTTTCTGCAAAGCACCCCGGATTTGGCCGTGAGGGTATGCTGCAACTGCTGA
 AATCTCGCTATCATGTGGTTGAAGATGATAGTGATTTTGATTACCTGGTGGCGACGCCGTGGTTCTATGTTAAC
 CGTGAAGCCTTTTACGATTTCTGGAACGCGCACCGGGCCATATTACCGTGATGTATGGTTGCCACGAAGCGA
 TCGCCCCGGATTTTATGCTGTTGATTATTACATTGGCCTGGACACCGTGCCGGGTAGCGATCGTACCGTTAAA
 CTGCCGTATCTGCGCCATCACCTGGAAGAAGTTCATGGCGGTAAAGAAGGCCTGGATGCACATGCCCTGCTGG
 CCAGCAAAACGGGTTTTTGTAACTTCATCTACGCCAATCGTAAATCTCATCCGAACCGCGATGCAATGTTTCAC
 AAAGTGAAGTGCCTTCGTTTCGTGAATAGCCTGGGCCCGCATCTGAACAATACCCCGGGCGATGGTCACCGTG
 CGGAAGATTGGTATGCCAGCTCTATTCGCATGAAAAAACCGTACAAATTTTCTATCGCCTTCGAAAACGCATGG
 TACCCGGGTTACACCAGCGAAAAATCGTTACGTCTATGCTGGCCGGCACCATTCGATCTATTGGGGTAATCC
 GGATATTAGCCGTGAATTTAACAGTGCGAGCTTTATCAATTGCCATGATTTTCCGACGCTGGATGATGCGGCG
 GCGTATGTGAAAAAAGTTGATGAAGATGATAACCTGTGGTGTGAAATTATGAGCCGCCCGTGAAAAACCCCG
 GAACAGGAAGCACGTTTTCTGGAAGAAACCGAACGCGAAACGGCGAAACTGTATAAAATCTTCGATCAGAGT
 CCGGAAGAAGCCCGTCGCAAAGGCGATGGTACCTGGGTGAGCTATTACCAGCGTTTTCTGAAACGTGGTCATC
 GTATGCAGCTGGCCTGGCGTCGCCTGAAAAATCGCCTGCGTCGCTAA

Trình tự protein *Amuc0760co*:

MKTLKISFLQSTPDFGREGMLQLLKSRVHVVEDDSDFDYLVPWFYVNRFAFYDFLERAPGHITVMYGCHEAIAP
 DFMLFDYYIGLDTVPGSDRTVKLPYLRHHLEEVHGGKEGLDAHALLASKTGFCNFIYANRKSHPNRDAMFHKLSAFR
 FVNSLGPHLNNTPGDGHRAEDWYASSIRMKKPYKFSIAFENAWYPGYTSEKIVTSMLAGTIPIYWGNPDISREFNSA
 SFINCHDFPTLDDAAAYVKKVDEDDNLWCEIMSRPWKTPEQEARFLEETERETAKLYKIFDQSPEEARRKGDGTWV
 SYYQRFLKRGRHMQWLAWRRLKNRLRR

Fig. 5

Trình tự gen *fucT6*:

ATGTGTGATTGCTTGTCTATCATATTGTTAGTCAAAATGAAAAAGATTATTTGAAATTTGTTGATTTTTGGGAT
 GGATTGATACTATTTCTAACTTTATTGTGGATGCTTTGTCCATTCAATACGAAGTAGTACTATCTAATGAGCCA
 GATTATTTATTCTATTCATGTTTTGGAACGTCACATTTAGAATATGATTGTATAAAAATCATGTTTATAGGTGAA
 AATATAGTTCCTGATTTTAACGTTTGTGATTATGCCATAGGTTTTAATTATATTGATTTTGGGGACCGTTACTTG
 AGGTTGCCTTTATATGCTATATATGATGGATTTCAAACCTGCAGAATAAAAAGATTGATGTAAATAAAGCTTT
 AGACCGTAAATTTTAGTATTGTTGTTTCAAATAATAAATGGGCAGATCCTATTCGTGAGACTTTCTTTAAATT
 ACTATCTAGTTATAAGAAAGTAGACTCTGGTGAAGAGCTTGAATAATATAGGAGGACCTGTTGATAATAAA
 TTGGATTTTATTAGCCAATATAAGTTTAATATTGCTTTTGAAAATAGTAGGGTACTGGGATATACAACAGAAAA
 AATAATGGAACCTATGCAGGTGAATTCTATCCAGTATATTGGGGAAATCCTTTGGTTGGTAAAGATTTTAATG
 TGGACTCCTTTGTAAATGCTCATGATTTTGATTCTTTAGAAAGATTAGTTGAGTATATTATAGAATTGGATTCTT
 CAAAGGATAAATATCTGGAAATGTTGGAAAAACCTTGGCTTCTCGATAAGACATATTTGGATTGGAAACAATT
 GCTGTAAATTTTATTAATAATATTATGATGAAATCATATAAGGATGCGAAGTATTTGGTTAATTATGGTCATGC
 TGGAAAGTATAGAAATGAACAACGCTTTTGGGGGAGATGTGAACGTAAATTTAAACTTCAAAGAATTATTGAA
 TATTATTCTCAATTGTTTGATAGAAAATAA

Trình tự protein FucT6:

MCDCLSIILLVKMKKIYLFVDFWDGFDTSNFIVDALSIQYEVVLSNEPDYLFYSCFGTSHLEYDCIKIMFIGENIVPDF
 NVCDYAIGFNYIDFGDRYLRLPLYAIYDGFSNLQNKIDVKNALDRKFCISIVSNNKWADPIRETFKLLSSYKKVDSG
 GRAWNNIGGPVDNKLDFISQYKFNI AFENSRVLGYTTEKIMEPMQVNSIPVYWGNPLVGKDFNVDSFVNAHDFDS
 LERLVEYIIELDSSKDKYLEMLEKPWLLDKTYLDWKQLLLNFINNIMMSYKDAKYL VNYGHAGKYRNEQRFWGRC
 ERKFKLQRIIEYYSQLFDRK

Fig. 6

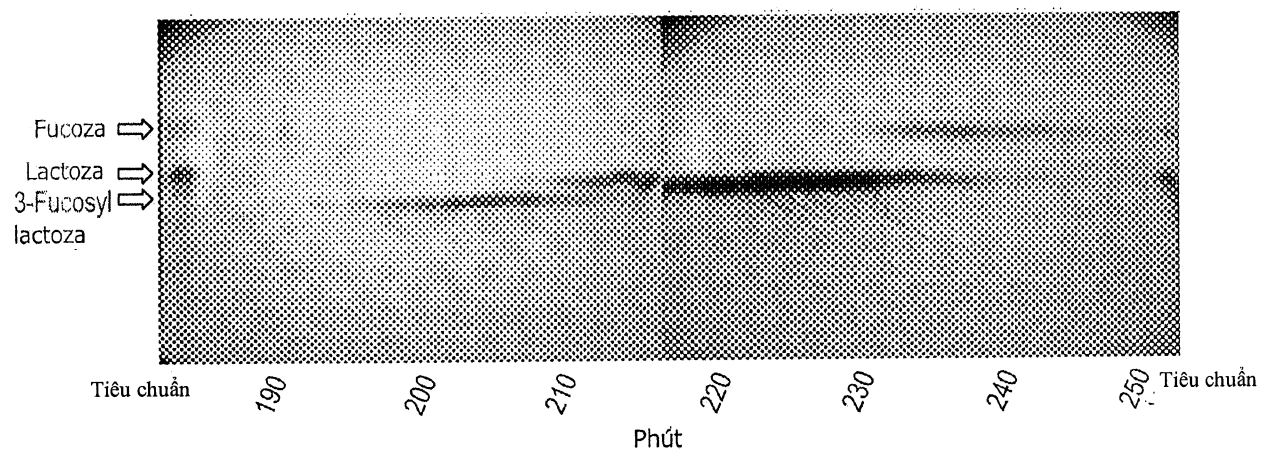
Trình tự gen *fucT7*:

ATGGATATATTGATTCTTTTTATAATACGATGTGGGGATTTCCACTCGAGTTCGAAAGGAAGATTACCTGG
 GGGCTGTGTGATAACGACTGATCGAAACCTCATTGCAAAGGCGGATGCTGTGGTTTTCCATTTGCCCGATTTGC
 CTCGGTGATGGAGGATGAAATCGATAAGCGGGAAGGACAGCTTTGGGTGGGATGGAGTCTGGAATGTGAA
 GAGAATTATAGTTGGACGAAGGATCCCGAGTTCAGAGAGAGTTTTGACTTATGGATGGGGTATCATCAGGAG
 GATGATATTGTGTATCCTTATTATGGACCGGATTATGGGAAGATGCTGGTTACGGCACGGAGGGAAAAGCCTT
 ATAAGAAGAAGGCATGTATGTTTATTTTCGAGTGATATGAACCGGAGTCATCGACAAGAGTATCTTAAGGAATT
 GATGCAGTATACCGACATCGATTCTGATGGGAACTATACCGTAATTGTGAATTACCTGTTGAGGATCGGGGA
 CGGGATACACTTCTTAGTGTGATCGGGGATTATCAGTTTGTGATAAGTTTTGAGAATGCGATAGGGAAGGATT
 ATGTGACAGAAAAGTTTTTCAATCCTTTGTTGGCCGGTACTGTTCCGGTCTATCTGGGAGCTCCCAATATTCGG
 GAATTTGCTCCGGGAGAAAATTGTTTTCTGGATATTTGTACTTTGATTCTCCCGAGGGAGTAGCCGCTTTTAT
 GAATCAATGCTATGATGACGAGGCATTGTATGAACGTTTTTATGCATGGAGGAAACGGCCTTTATTATTGTCGT
 TTACAAAAAAGTTAGAGCAAGTCCGGAGCAATCCGTTAATCAGGCTTTGCCAAAAAATACACGAACTAAAATT
 GGGAGGGATATGA

Trình tự protein FucT7:

MDILILFYNTMWGFLEFRKEDLPGGCVITTDNRNLIKADAVVFHLPDLPSVMEDEIDKREGQLWVGWSLECEENY
 SWTKDPEFRESFDLWMGYHQEDDIVPYYPYGPDYGKMLVTARREKPYKKKACMFISSDMNRSHRQEYKELMQYT
 DIDSYGKLYRNCELPVEDRGRDTLLSVIGDYQFVISFENAIGKDYVTEKFFNPLLAGTVPVYLGAPNIREFAPGENCFL
 DICTFDSPEGVAAFMNQCYDDEALYERFYAWRKRPLLLSFTKKLEQVRNPLIRLCQKIHELKLGGI

Fig. 7

**Fig. 8**

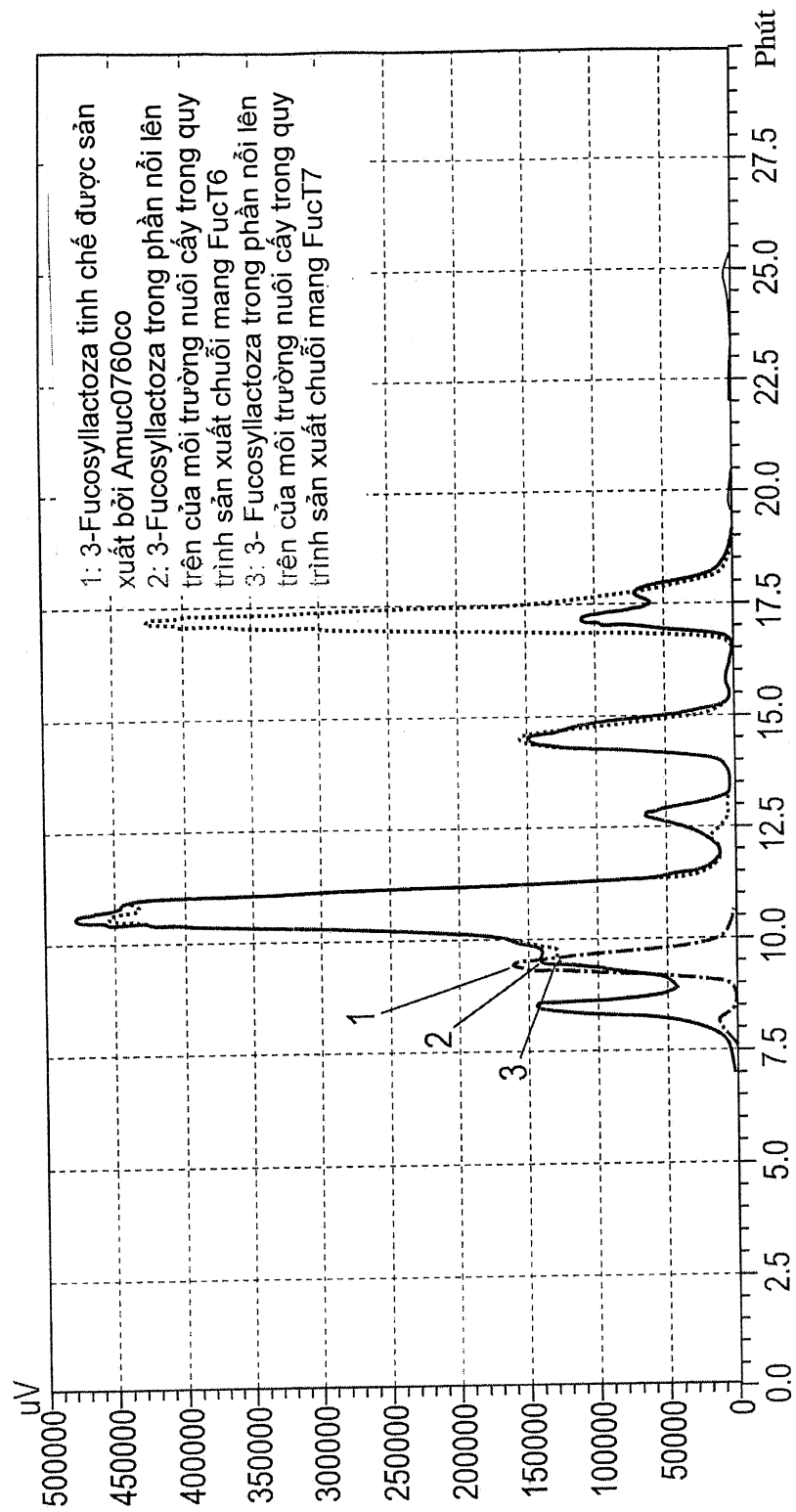


Fig. 9A

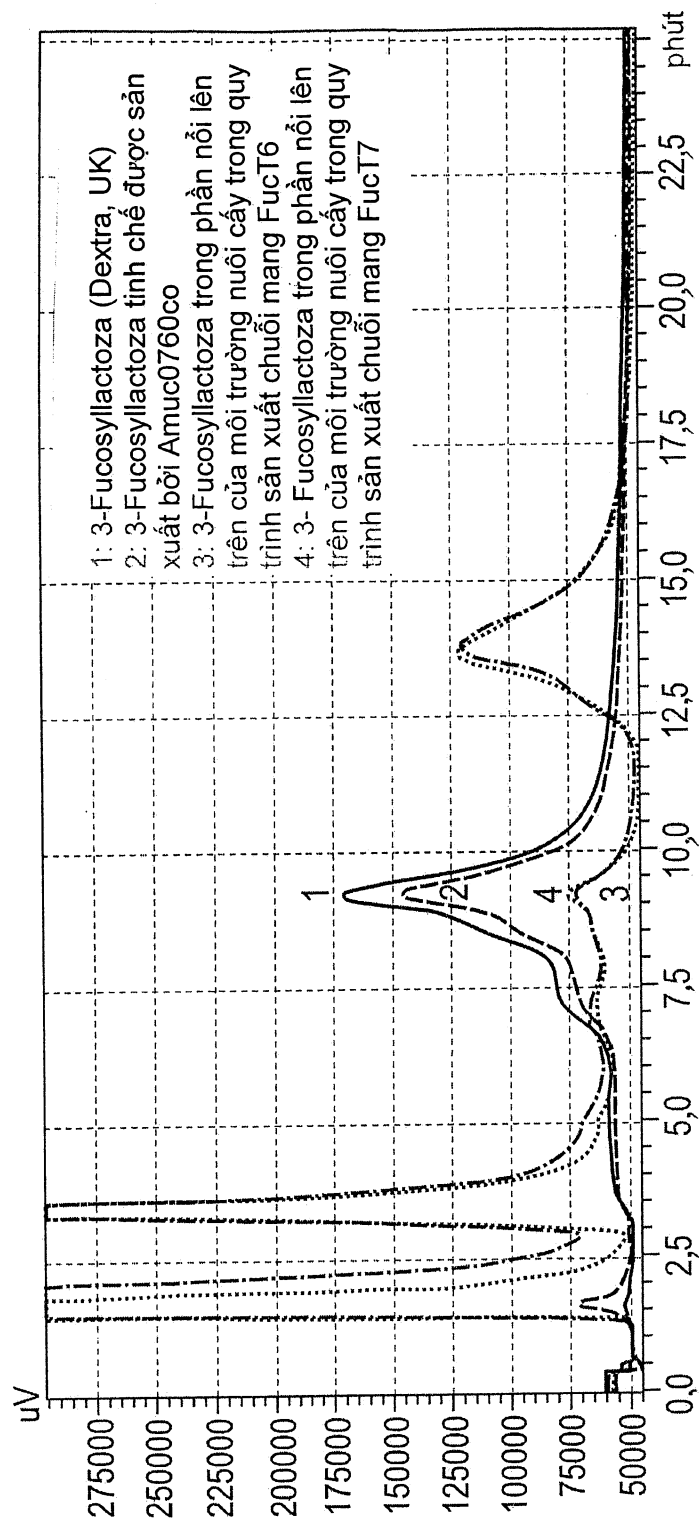


Fig. 9B