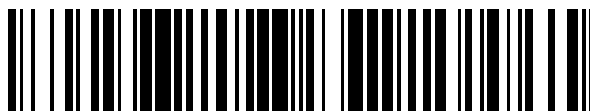


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 698**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>C12N 1/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C12N 15/63</b> | (2006.01) |
| <b>C12P 19/00</b> | (2006.01) |
| <b>C12P 19/18</b> | (2006.01) |
| <b>C12N 9/10</b>  | (2006.01) |
| <b>C12N 15/70</b> | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2009 PCT/EP2009/004112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10142305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2009 E 09776698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2440661**

54 Título: **Síntesis de HMO**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2018**

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

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

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 660 698 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

## Síntesis de HMO

5 La presente invención se refiere a una célula que puede ser cultivada de manera estable en un medio, que ha sido modificada para producir oligosacáridos, donde la célula ha sido transformada de manera tal que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una enzima que participa en la síntesis de los oligosacáridos. Estas células se conocen, por ejemplo, a partir de Dumon et al., 2001.

10 Desde hace tiempo, se sabe que la leche materna humana, además de lactosa, comprende una mezcla compleja de oligosacáridos que se conocen como oligosacáridos de la leche humana (HMO). Esta fracción de los oligosacáridos de la leche materna humana tiene una composición y una cantidad particular de componentes. En contraste con otros mamíferos, la leche materna humana comprende una concentración de oligosacáridos que varía entre 7 y 12 g/l, que es entre 10 y 100 veces mayor que la que puede observarse en la mayoría de los otros mamíferos (Boehm y Stahl, 2007, Kunz et al., 2000, Newburg y Neubauer, 1995).

15 En la actualidad, se han caracterizado estructuralmente más de 80 compuestos que pertenecen a la clase de los HMO. En general, a diferencia de los otros oligosacáridos que se encuentran en el cuerpo humano, los HMO se caracterizan porque presentan un resto de lactosa en el extremo reductor y fucosa y/o ácido siálico en el extremo no reductor.

20 Pueden distinguirse dos tipos básicos: los oligosacáridos con estructuras del tipo I comprenden una fucosa unida a través de un enlace  $\alpha$ 1,4 a GlcNAc, mientras que los oligosacáridos con estructuras del tipo II comprenden una fucosilación  $\alpha$ 1,3 de GlcNAc o glucosa; cualquiera de ellos puede comprender una fucosa unida a través de un enlace  $\alpha$ 1,2 a una galactosa. Los oligosacáridos más prominentes son la 2'-fucosil-lactosa y la 3-fucosil-lactosa.

Estas estructuras están relacionadas estrechamente con los epítomos de los glucoconjugados que se encuentran en la superficie de las células epiteliales, los antígenos del grupo histo-sanguíneo de Lewis, tales como Lewis x ( $Le^x$ ) (Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc-( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1)) (Newburg, 2001). La homología estructural entre los HMO y los epítomos epiteliales es el fundamento de las propiedades de protección frente a los patógenos bacterianos.

25 Por ejemplo, la virulencia de *Escherichia coli* (Cravioto et al., 1991), *Vibrio cholerae* (Coppa et al., 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Andersson et al., 1986) o *Campylobacter jejuni* (Ruiz-Palacios et al., 2003) patogénicas puede reducirse drásticamente uniendo los patógenos a los HMO en lugar de a los glucanos de la superficie de la mucosa humana, y también la unión a toxinas tales como la enterotoxina estable ante el calor de *E. coli* (Crane et al., 1994).

30 Además de los efectos locales en el tracto intestinal que se mencionaron con anterioridad, los HMO también pueden provocar efectos sistémicos en los lactantes al ingresar en la circulación sistémica (Gnoth et al., 2001). Los efectos que presentan los HMO sobre las interacciones entre las proteínas y los hidratos de carbono, por ejemplo sobre la unión entre las selectinas y los leucocitos, abarcan la modulación de las respuestas inmunes y la reducción de las respuestas inflamatorias (Bode, 2006, Kunz y Rudloff, 2006).

35 Con el propósito de reducir la frecuencia de las infecciones contraídas por los neonatos, y como consecuencia, la mortalidad infantil, es evidente que resultará generalmente deseable proveerles a los lactantes una nutrición que incluya HMO. Este objetivo puede cumplirse sin inconvenientes en aquellas sociedades en las que el amamantamiento es una práctica común. Sin embargo, este no siempre es el caso.

40 Hay numerosas razones médicas, tales como la transmisión posible de enfermedades infecciosas desde las madres hasta los niños, que bajo determinadas circunstancias pueden tornar inconveniente el amamantamiento. Por ejemplo, en muchos países africanos, el amamantamiento puede ser una razón importante para que ocurran infecciones del VIH durante la infancia.

Puede haber circunstancias culturales que tornen inconveniente el amamantamiento, lo cual puede observarse, por ejemplo, en los países industriales importantes, tales como los EEUU.

45 Debido al hecho de que los HMO pueden hallarse solamente en concentraciones bajas en las fuentes naturales, tales como la leche de otros mamíferos, la extracción de los oligosacáridos de las fuentes naturales no es apropiada para satisfacer la demanda de HMO.

50 La síntesis química de los oligosacáridos es laboriosa, y para efectuarla es necesario poner en práctica múltiples etapas de protección y de desprotección (Kretzschmar y Stahl, 1998), por lo que generalmente resulta costosa y presenta rendimientos reducidos.

Por lo tanto, la producción de oligosacáridos por fermentación, mediante el uso de organismos modificados por medios biotecnológicos, constituye una alternativa prometedora para la síntesis de HMO a gran escala.

Durante la última década, se han publicado informes sobre diversos intentos exitosos de sintetizar HMO usando una fermentación con *E. coli* recombinante o una conversión con enzimas *in vitro*. En estos casos, los esfuerzos se han concentrado en la síntesis de compuestos fucosilados pertenecientes a la clase de los HMO o muy similares a ellos.

5 Por ejemplo, en diversas publicaciones se describe la síntesis de estructuras de Lewis como la lacto-N-neofucopentosa, la lacto-N-neodifucohexosa, y la lacto-N-neodifucooctosa, así como la 2'-fucosil-lactosa y la 3-fucosil-lactosa (Albermann et al., 2001, Dumon et al., 2006, Dumon et al., 2001, Dumon et al., 2004, Koizumi et al., 2000). En estos casos, la fucosilación con enzimas de eductos como la lactosa se lleva a cabo con fucosiltransferasas (FucT).

10 En la mayoría de las publicaciones donde se describe la producción de compuestos fucosilados también se describe el uso de FucT provenientes de *Helicobacter pylori*. En general, las FucT humanas son apropiadas para este fin. Sin embargo, cuando se las sobreexpresa en células bacterianas, las FucT de fuentes bacterianas generalmente son menos problemáticas en áreas como la producción de pliegues erróneos y la insolubilidad.

15 Además, la mayoría de los sistemas publicados para sintetizar compuestos fucosilados se basan en la reserva de GDP-fucosa endógena de *E. coli*, que normalmente se emplea para sintetizar un exopolisacárido que contiene fucosa que se conoce como ácido colónico (Grant et al., 1970). En estos casos, la disponibilidad de GDP-fucosa evidentemente es un factor limitativo que restringe la eficiencia de la síntesis.

Recientemente, los autores de la presente invención describieron un nuevo procedimiento de producción donde se emplean células completas y la enzima Fkp (Parkot et al., 2008).

20 La Fkp (Coyne et al., 2005), que se origina en *Bacteroides fragilis*, es una enzima bifuncional, que presenta actividad de fucocinasa y de L-fucosa-1-P-guanililtransferasa. De esta manera, la fucosa que se introduce desde el exterior primero es fosforilada y luego es activada con nucleótidos, con lo que se forma una molécula precursora importante, la GDP-fucosa. La vía de captura de L-fucosa basada en Fkp ha sido usada con éxito para sintetizar oligosacáridos fucosilados (Parkot et al., 2008).

25 Incluso aunque se han desarrollado estrategias importantes a nivel de la síntesis bioquímica como tal, los métodos conocidos para sintetizar oligosacáridos *in vivo* presentan determinadas desventajas, que en el peor de los casos dan como resultado la inhibición de la producción en masa de oligosacáridos.

Las dificultades más importantes en el contexto de la producción de oligosacáridos con rendimientos elevados a partir de células son por un lado el enriquecimiento intracelular masivo de los oligosacáridos producidos y subproductos nucleotídicos, y por otro lado la extracción de los oligosacáridos producidos.

30 Debido al enriquecimiento intracelular, los productos de la reacción de síntesis pueden desarrollar gradualmente un efecto inhibitorio del producto en las enzimas sintéticas. Por lo tanto, en un punto determinado, la síntesis se torna ineficientemente lenta. Además, los productos pueden alcanzar concentraciones citotóxicas que conducen a las células a la lisis o al menos a la detección metabólica. En cualquier caso, no es posible una producción intracelular continua de oligosacáridos.

35 Además, se puede esperar que la acumulación de cantidades excesivas de oligosacáridos conducirá eventualmente a la lisis celular y a la muerte celular. Esta lisis celular, o la lisis celular realizada más tarde usada para la extracción de los oligosacáridos sintetizados a partir de las células, conducirá a una mezcla compleja de oligosacáridos diana y componentes celulares (metabolitos, desecho). La purificación del oligosacárido diana a partir de esta mezcla compleja es costosa, y de este modo, para la mayoría de los oligosacáridos, no es económica.

40 En estas circunstancias, la producción biotécnica de oligosacáridos es muy ineficiente y difícil de controlar, especialmente puesto que la producción biotécnica de oligosacáridos se lleva a cabo usando un cultivo por lotes, siendo tal cultivo por lotes, desde el punto de vista económico, muy insatisfactorio.

45 En vista de lo anterior, es un objeto de la invención mejorar los métodos de producción biotécnica de oligosacáridos de tal manera que se facilite la producción y se haga más controlable, y así se mejore generalmente la producción de oligosacáridos.

50 Según la invención, estos y otros objetos se logran proporcionando una célula bacteriana para la producción de oligosacáridos, siendo dichos oligosacáridos fucosil-lactosa, transformándose la célula para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una fucosiltransferasa, transformándose además la célula para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la familia de transportadores de eflujo de azúcar (SET), proteína la cual se sobreexpresa, conduciendo la sobreexpresión a exportar los oligosacáridos.

El objeto de la invención se logra completamente de este modo.

Según la invención, se entiende que los oligosacáridos son fucosil-lactosa.

La secuencia de ácido nucleico, según la invención, describe un código genético, representado por un polímero de ácido nucleico, como por ejemplo un polímero de ácido desoxirribonucleico o un polímero de ácido ribonucleico. El código genético puede incluir de ese modo secuencias codificantes, que incluyen información para formar una proteína, o regiones no codificantes que comprenden, por ejemplo, regiones promotoras, regiones para la unión de compuestos reguladores o auxiliares, espaciadores y secuencias estructurales que influyen sobre la estructura secundaria o terciaria del propio polímero de ácido nucleico y/o que participan en su procesamiento.

“Transformándose para comprender”, según la presente invención, se refiere a cualquier método de inserción de al menos una secuencia de ácido nucleico adicional en células, estando presente después la secuencia de ácido nucleico en el interior de la célula como un plásmido o integrándose en el cromosoma/cromosomas de las células. Los métodos de transformación conocidos comprenden, por ejemplo, transformación química o electroporación. La transgénesis estable, incluso en ausencia de agentes selectivos, se puede lograr generalmente mediante integración cromosómica de al menos una secuencia de ácido nucleico adicional. Para este fin, la célula se puede infectar con un virus o un fago. Como alternativa, se pueden aplicar otros medios de recombinación homóloga y no homóloga, usando, por ejemplo, sistemas a base de virus o de transposones.

Para aplicaciones biotecnológicas, la exportación de oligosacáridos más grandes desde las células es un problema complejo. Este es el caso principalmente, debido a que solo se han identificado unos pocos mecanismos celulares relacionados con tal transporte. La razón para la aparición infrecuente de la exportación de oligosacáridos desde las células es que la síntesis de oligosacáridos consume una gran cantidad de recursos celulares. La pérdida de estos compuestos es por lo tanto generalmente desfavorable para la célula.

Además, la mayoría de mecanismos conocidos para la exportación de oligosacáridos implican la modificación química de los oligosacáridos, por ejemplo enlazándolos a restos lipídicos (Alaimo et al., 2006). En consecuencia, los oligosacáridos no son solamente portados por la membrana, inhibiendo su liberación al medio, sino que también están enlazados químicamente a restos lipídicos, reduciendo su solubilidad en medios acuosos. En consecuencia, tales mecanismos son difícilmente adecuados para ser empleados en la producción a gran escala de oligosacáridos.

Drouillard et al., (2006) describen la producción de oligosacáridos del Antígeno H mediante la expresión de alfa1,2-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* en células de *E. coli* modificadas metabólicamente mediante ingeniería. En esta publicación se mostró que, incrementando la concentración inicial de lactosa y el tiempo de cultivo, se pueden mejorar el valor y la relación de fucosil-lactosa intracelular y extracelular.

La familia del Transportador de Eflujo de Azúcar (SET), descrita por primera vez por Liu y colaboradores (Liu et al., 1999a) para *E. coli*, comprende las proteínas SetA, SetB y SetC.

Además de glucosa y lactosa, las proteínas exportadoras de SET presentan especificidad de sustrato por ciertos mono- y disacáridos, así como, por ejemplo, por la molécula inductora isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) y el análogo de azúcar tóxico o-nitrofenil-β-D-tiogalactósido (ONPG) (Liu et al., 1999b). Sin embargo, estudios bioquímicos han mostrado que, por ejemplo, SetA exhibe una actividad transportadora muy baja a nula para moléculas más grandes o más voluminosas, tales como heptosas o trisacáridos.

Por las razones anteriores, no se podría esperar que las proteínas exportadoras de la familia SET fuesen adecuadas en absoluto para el transporte de oligosacáridos.

Sin embargo, los inventores han encontrado que, sorprendentemente, la sobreexpresión de las proteínas exportadoras de SET, conduce a una exportación muy eficiente de oligosacáridos.

Además, se ha mostrado que las proteínas de SET exportan lactosa, uno de los eductos de la reacción de síntesis. Por lo tanto, era de esperar que la síntesis de oligosacáridos obtenidos en las células modificadas transcurriese muy ineficientemente y lenta, debido a un consumo constante de educto desde las células.

Por el contrario, los inventores han sido capaces de mostrar por primera vez que, a pesar de la sobreexpresión de las proteínas exportadoras de SET, la síntesis de oligosacáridos obtenidos en las células modificadas es muy productiva.

La célula es una bacteria. De ese modo, en particular se prefiere si la célula es una célula de *Escherichia coli*.

La ventaja por la presente es que las células de *E. coli* ofrecen una actividad metabólica elevada y una velocidad de reproducción elevada. Además, *E. coli* es uno de los organismos mejor caracterizados para fines biológicos y biotécnicos moleculares. Muchas técnicas para la transformación y cultivo de bacterias conocidas en la técnica se han adaptado especialmente a *E. coli*. Además, existen comercialmente cepas de *E. coli* con una variedad de antecedentes genéticos.

Además, según la invención la enzima es fucosiltransferasa.

Además, se prefiere, si el transportador de eflujo de azúcar es SetA.

En este caso, la ventaja es que SetA, entre los miembros bioquímicamente caracterizados de la familia de proteínas exportadoras de SET, presenta la especificidad por sustrato más amplia. También se prefiere si la célula se transforma adicionalmente para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que facilita o promueve la importación de eductos requeridos para la síntesis de oligosacáridos.

- 5 Por la presente, es ventajoso que se incremente la concentración del educto dentro de la célula. En circunstancias normales, la importación de eductos, tales como fucosa o lactosa, está limitada por la disponibilidad de las proteínas importadoras correspondientes. En el caso de una célula ajustada para la síntesis a gran escala de oligosacáridos, sin embargo, la importación de eductos, que se basa en niveles endógenos de las proteínas importadoras, puede ser insuficiente para suministrar constantemente eductos a la reacción de síntesis. Este problema se puede
- 10 satisfacer sobreexpresando las proteínas importadoras respectivas.

Las proteínas importadoras con relevancia en el presente caso son principalmente importadores para mono- o disacáridos, tales como importadores de lactosa, por ejemplo la  $\beta$ -galactósido permeasa de *E. coli* (LacY), o importadores de fucosa, por ejemplo fucosa permeasa de *E. coli* (FucP), pero igualmente pueden comprender importadores para nucleótidos y otros eductos.

- 15 Se prefiere especialmente si la célula se transforma para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en transportador de lactosa, transportador de fucosa, transportador de ácido siálico, transportador de galactosa, transportador de manosa, transportador de N-acetilglucosamina, transportador de N-acetilgalactosamina, transportador de ABC, transportador para un azúcar activado por nucleótido, y transportador para una nucleobase, nucleósido o nucleótido.

- 20 A este respecto, un azúcar activado por nucleótidos puede ser, pero no se limita a, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico, UDP-galactosa, UDP-glucosa, GDP-manosa, UDP-glucosamina o UDP-galactosamina.

Además, el término nucleobase representa guanina, citosina, adenina, timina y uracilo. El nucleósido representa guanosina, citidina, adenosina, timidina y uridina, mientras que un nucleótido puede ser un mono-, di- o trifosfato de guanosina, citidina, adenosina, timidina o uridina.

- 25 Además, se prefiere si la célula se transforma además para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en nucleotidiltransferasa, guanililtransferasa, uridililtransferasa, Fkp, L-fucosa cinasa, fucosa-1-fosfato guanililtransferasa, CMP-ácido siálico sintetasa, galactosa cinasa, galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, glucosa cinasa, glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, manosa cinasa, manosa-1-fosfato guanililtransferasa, GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa reductasa, glucosamina cinasa, glucosamina-
- 30 fosfato acetiltransferasa, N-acetil-glucosamina-fosfato uridililtransferasa, UDP-N-acetilglucosamina 4-epimerasa, UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa.

A este respecto, la expresión nucleotidil transferasa se refiere generalmente a enzimas que pueden transferir nucleótidos sobre fosfoazúcares, sean ellos azúcares de origen natural o azúcares no naturales.

- 35 Por la presente, la ventaja es que, como se describe bien en Parkot et al., 2008, incluido aquí como referencia, se pueden suplementar los conjuntos intracelulares de azúcares activados por nucleótidos, como GDP-fucosa. Por tanto, la síntesis de los oligosacáridos se hace más eficiente.

Adicionalmente, la ruta catabólica de la célula para mono-, di- u oligosacáridos seleccionados implicados en y/o requeridos para la síntesis de oligosacáridos se puede inactivar al menos parcialmente.

- 40 Aquí, la ventaja reside en el hecho de que se puede incrementar la eficiencia global de la síntesis. Este es el caso debido a que se consumen menos eductos destinados para la síntesis de oligosacáridos por el metabolismo endógeno de la célula.

- 45 En la realización descrita más abajo, por ejemplo se emplean células que son deficientes en la degradación de lactosa. Esto se puede lograr inactivando la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que es codificada por el gen *lacZ*. Esta modificación genética, evita la escisión intracelular de lactosa en los monosacáridos rápidamente metabolizables glucosa y galactosa. De este modo, la lactosa está presente en mayor concentración que la molécula aceptora para reacciones de glicosilación/fucosilación subsiguientes.

- 50 En una realización alternativa, las células usadas para la síntesis de oligosacáridos son, solamente o además de la deficiencia de *lacZ* descrita anteriormente, deficientes para la degradación de L-fucosa. Esto se puede lograr inactivando el gen *fucA* que codifica la enzima catabólica clave fucosa-1-fosfato aldolasa (FucA) de la ruta de degradación de fucosa.

Por supuesto, existen también otras técnicas disponibles, que van desde los inhibidores enzimáticos hasta constructos de ARNi transfectados de forma estable, que se pueden emplear a fin de inactivar al menos parcialmente las rutas catabólicas.

La presente invención se refiere además a un método para la producción de oligosacáridos, siendo dichos oligosacáridos fucosil-lactosa, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula bacteriana según la invención reivindicada,
- b) cultivar la célula en un medio en condiciones que permitan la producción de dichos oligosacáridos,
- 5 c) extraer dichos oligosacáridos del medio de cultivo.

En el alcance de la presente invención, se entiende que las condiciones permisivas son condiciones relacionadas con los parámetros físicos o químicos, incluyendo, pero sin limitarse a, temperatura, pH, presión, presión osmótica, y concentración de producto/educto.

10 En realización particular, las condiciones permisivas pueden incluir un intervalo de temperatura de 30 +/- 20°C, un intervalo de pH de 7 +/- 3.

El método descrito anteriormente proporciona la ventaja de que dichos oligosacáridos se pueden extraer directamente del medio de cultivo, mientras que en los métodos conocidos se requiere la lisis de las células y la extracción subsiguiente de los oligosacáridos del lisado resultante.

A este respecto, se prefiere si la etapa b) se lleva a cabo usando un biorreactor de flujo continuo.

15 La ventaja es que, usando un biorreactor de flujo continuo, la cantidad de oligosacáridos producida se puede incrementar fácilmente. Este es el caso debido a que la síntesis se produce de forma continua en un nivel relativamente elevado.

20 El medio en la etapa b) también puede comprender una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en suplementos básicos para apoyar el crecimiento y propagación celulares, agentes selectivos, efectores de la actividad de los genes, y eductos requeridos para la síntesis de oligosacáridos.

Los suplementos típicos para apoyar el crecimiento y propagación celulares son conocidos ampliamente de la técnica anterior, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russel, 2001. Tales suplementos básicos dan cuenta de la demanda nutricional general de las células cultivadas, que contienen, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y minerales.

25 También los agentes selectivos como los antibióticos son ampliamente conocidos de la técnica anterior, por ejemplo Sambrook y Russel, 2001. Tales agentes se pueden usar a fin de proteger cultivos de células genéticamente modificadas de la contaminación constante con organismos competitivos, tales como hongos o bacterias. Además, por ejemplo en poblaciones bacterianas, los agentes selectivos se pueden utilizar a fin de estabilizar la información genética comprendida en un plásmido.

30 Los efectores de la actividad de genes se pueden usar para inducir o reprimir selectivamente la actividad de ciertos genes o conjuntos de genes en una célula. Tales efectores abarcan desde compuestos químicos simples, tal como isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), a compuestos más complejos, como hormonas. Tales efectores de la actividad génica son ampliamente conocidos de la técnica anterior, por ejemplo de Sambrook y Russel, 2001.

35 Además, se prefiere que los eductos se seleccionen del grupo que consiste en arabinosa, treosa, eritrosa, ribosa, ribulosa, xilosa, glucosa, D-2-desoxi-2-amino-glucosa, N-acetilglucosamina, glucosamina, fructosa, manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, galactosamina, sorbosa, fucosa, ácido N-acetilneuramínico, glicósido, azúcar no natural, nucleobase, nucleósido, nucleótido, y cualquier di- o polímero del mismo.

40 Según la presente invención, el oligosacárido producido mediante el método descrito anteriormente es fucosil-lactosa, siendo la ventaja en este caso que la fucosil-lactosa es uno de los compuestos más destacados que está presente en HMO.

Otras ventajas se deducen de la descripción de las realizaciones y los dibujos adjuntos.

Varias realizaciones de la invención se ilustran en las figuras, y se explican con más detalle en la siguiente descripción. En las figuras:

- 45 Fig. 1 muestra un resumen esquemático de la síntesis de oligosacáridos y el transporte en el interior de una célula bacteriana gramnegativa modificada según la invención;
- Fig. 2 muestra los resultados de las medidas de 3-fucosil-lactosa en la masa húmeda celular y sobrenadantes de cultivos bacterianos, comparando diferentes genotipos; y
- Fig. 3 muestra una comparación entre las cantidades de 3-fucosil-lactosa sintetizada en cultivos bacterianos con diferentes genotipos.

**Ejemplo 1: Síntesis de oligosacáridos y transporte al interior de una célula bacteriana gramnegativa**

La Fig. 1 muestra una sección de una célula bacteriana gramnegativa 10. Una célula bacteriana gramnegativa 10 según la invención comprende una membrana externa 11, una membrana plasmática 12, un espacio periplásmico 13, situado entre dicha membrana externa 11 y dicha membrana plasmática 12, y un citosol 14, encerrado en dicha membrana plasmática 12. La membrana externa comprende porinas a través de las cuales pueden pasar compuestos solubles en agua desde el medio 16 al espacio periplásmico 13, y viceversa.

Según una realización de la presente invención, la membrana plasmática comprende FucP, que sirve como un primer transportador 17 de educto, LacY, que sirve como un segundo transportador 18 de educto, y SetA, que sirve como un exportador de producto.

Además, en el citosol 14 están comprendidos Fkp, que sirve como una nucleotidiltransferasa 20, y FutAco, que sirve como una glucosiltransferasa 21.

Según esta realización, cuando se suministran al medio 16 fucosa, como un primer educto 22, y lactosa, como un segundo educto 23, entran en el espacio periplásmico 13 a través de la porina 15. Después, el primer educto 22 es transportado por el primer transportador 17 de educto al citosol 14. En el citosol, el primer educto 22 es modificado por la nucleotidiltransferasa 20, dando como resultado un primer educto 24 nucleotidilado, GDP-fucosa.

El segundo educto 23 es importado al citosol 14 por el segundo importador 15 de educto.

Después, la glucosiltransferasa 21 cataliza una reacción entre el primer educto nucleotidilado, la GDP-fucosa, y el segundo educto, lactosa, dando como resultado un oligosacárido 25, 3-fucosil-lactosa, y GDP (no mostrado).

Subsiguientemente, el oligosacárido 25 es exportado desde el citosol 14 por el exportador 19 de producto (SetA) al espacio periplásmico 13, y puede abandonar el espacio periplásmico 13 vía las porinas 15, entrando al medio 16.

**Ejemplo 2: Material y métodos****2.1. Construcción de plásmidos de expresión y desarrollo de cepas de *E. coli***

Para el desarrollo de la cepa de producción de *E. coli*, se usó como cepa hospedante inicial JM109(DE3) (Promega; www.promega.com). Todos los cebadores oligonucleotídicos usados para los procedimientos de clonación se dan en la Tabla 1. Los plásmidos pACYC-lacY y pACYC-lacY-setA se construyeron como sigue: los genes lacY (corresponde al número de acceso de GenBank ACB02461) (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) y setA (corresponde al número de acceso de GenBank YP\_025293) (GenBank) se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. coli* TOP10 (Invitrogen; www.invitrogen.com) usando cebadores lacY NcoI directo/lacY EcoRI inverso y setA NdeI directo/setA XhoI inverso. Los productos de la PCR se sometieron a digestión de restricción con las enzimas indicadas, y se ligaron con el vector de expresión digerido correspondientemente pACYCDuet-1 (Novagen; www.merckbiosciences.co.uk).

Los plásmidos resultantes se comprobaron mediante digestión de restricción, electroforesis en gel de agarosa, así como secuenciación con los cebadores pACYCduetUP1, DuetDOWN-1-Primer, DuetUP2-Primer y T7-Terminator-Primer, para la inserción correcta de los genes (dato no mostrado). Los plásmidos pCOLA-fkp-fucP y pET-futAco se han construido previamente (Parkot et al., 2008). Para obtener las cepas JM00, JM01 y JM02, se introdujeron diferentes combinaciones de plásmidos en *E. coli* JM109(DE3) mediante electroporación (Dower et al., 1988). Todos los plásmidos y cepas bacterianas se dan en la Tabla 2.

**2.2. Inactivación del catabolismo de fucosa en *E. coli***

Para evitar la degradación de fucosa suministrada externamente, se suprimió del cromosoma de *E. coli* JM109(DE3) el gen fucA que codifica la enzima catabólica clave L-fuculosa-1-fosfato aldolasa. Todos los cebadores oligonucleotídicos usados para los procedimientos de mutagénesis se dan en la Tabla 1. Para la construcción del mutante de supresión de fucA, se aplicó la metodología de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), usando los cebadores fucA-knock-f y fucA-knock-r. La supresión correcta de fucA se confirmó mediante PCR usando los cebadores fucA-control-f y fucA-control-r que flanquean el sitio de inserción cromosómica, y el fenotipo negativo para fucosa se verificó colocando las bacterias en placas en agar mínimo M9 (Sambrook y Russell, 2001) con fucosa suplementada como la única fuente de carbono (dato no mostrado).

## ES 2 660 698 T3

Tabla 1. Cebadores usados en este estudio

| Nombre               | Secuencia (5'→3')*   | Sitio de restricción añadido |
|----------------------|--|------------------------------|
| fucA-knock-f         | AATTACTCTTCAATTCGTAACCCATAGGTTTTGAAT<br>TTCTCCAGCACTACGGCAATCTCTTCATCGCTCAGC<br>AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTC |                              |
| fucA-knock-r         | GGTGGGTAATTAACGGCTAATTCAATAGTGTGAA<br>AGGAACAACATTATTGCCCTGTTTTGAATCAGAGA<br>GAGGGCTGACATGGGAATTAGCCATGGTCC  |                              |
| fucA-control-f       | CATTCTGTTAGCCATCATCCTTCTCC   |                              |
| fucA-control-r       | GAAGAAGATGGTGGGTAATTAACGGC   |                              |
| setA NdeI forward    | AAGGGAAAAACATATGATCTGGATAATGACGATGG<br>CTCGCCGTATGAACGGTG  | NdeI                         |
| setA XhoI inverse    | AAGGGAAAAACTCGAGCCACGTCATCAAACGTCTT<br>TAACCTTTGCCG  | XhoI                         |
| lacY NcoI forward    | AAGGAAATATACCATGGGCTACTATTTAAAAACA<br>CAAACCTTTGGATGTTCCG  | NcoI                         |
| lacY EcoRI inverse   | AAGGAAAACCGAATTCGATTGCTTAAGCGACTTCA<br>TTCACCTGACGACGCAGCAGGG  | EcoRI                        |
| pACYCduetUP1         | GGATCTCGACGCTCTCCCT  |                              |
| DuetDOWN-1-Primer    | GATTATGCGGCCGTGTACAA   |                              |
| DuetUP2-Primer       | TTGTACACGGCCGCATAATC   |                              |
| T7-Terminator-Primer | TATGCTAGTTATTGCTCAG  |                              |

\* Los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción están subrayados

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

| Nombre                   | Característica(s) relevante(s)*   | Referencias  |
|--------------------------|---|--------------|
| <i>Cepas de E. coli</i>  |   |              |
| TOP10                    | F- <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(araleu) 7697$ <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>  | Invitrogen   |
| JM109(DE3)               | <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , $\Delta(lac-proAB)$ , [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z\Delta M15</i> ], IDE3 | Promega      |
| JM109(DE3) $\Delta fucA$ | Mutante de supresión JM109(DE3) <i>fucA</i>   | Este estudio |
| JM00                     | Cepa de control negativo, JM109(DE3) que aloja vectores vacíos pCOLADuet-1, pETDuet-1 y pACYCDuet-1   | Este estudio |
| JM01                     | JM109(DE3) que aloja pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACYC- <i>lacY</i>   | Este estudio |
| JM02                     | JM109(DE3) que aloja pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACYC- <i>lacY-setA</i>  | Este estudio |
| JM03                     | JM109(DE3) que aloja pCOLA- <i>fkp-fucP</i> y pACYC- <i>lacY-setA</i>   | Este estudio |
| JM $\Delta$ 00           | Cepa de control negativo, JM109(DE3) $\Delta fucA$ que aloja vectores vacíos pCOLADuet-1, pETDuet-1 y pACYCDuet-1   | Este estudio |



|                         |  |                             |
|-------------------------|--|-----------------------------|
| JMΔ01                   | JM109(DE3) $\Delta fucA$ que aloja pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACYC- <i>lacY</i>                  | Este estudio                |
| JMΔ02                   | JM109(DE3) $\Delta fucA$ que aloja pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACYC- <i>lacY-setA</i>             | Este estudio                |
| JMΔ03                   | JM109(DE3) $\Delta fucA$ harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> y pACYC- <i>lacY-setA</i>                                  | Este estudio                |
| Plásmidos               |  |                             |
| pCOLADuet-1             | vector de expresión, Km <sup>R</sup>   | Novagen                     |
| pETDuet-1               | vector de expresión, Ap <sup>R</sup>   | Novagen                     |
| pACYCDuet-1             | vector de expresión, Cm <sup>R</sup>   | Novagen                     |
| pCOLA- <i>fkp-fucP</i>  | genes hospedantes <i>fkp</i> y <i>fucP</i> , Km <sup>R</sup>   | Parkot <i>et al.</i> , 2008 |
| pET- <i>futAco</i>      | gen hospedante de fucosiltransferasa con optimización de codones <i>futAco</i> de <i>H. pylori</i> , Ap <sup>R</sup> | Parkot <i>et al.</i> , 2008 |
| pACYC- <i>lacY</i>      | gen hospedante <i>lacY</i> , Cm <sup>R</sup>   | Este estudio                |
| pACYC- <i>lacY-setA</i> | genes hospedantes <i>lacY</i> y <i>setA</i> , Cm <sup>R</sup>  | Este estudio                |

---

Ap<sup>R</sup>, resistente a ampicilina; Km<sup>R</sup>, resistente a kanamicina; Cm<sup>R</sup>, resistente a cloranfenicol.

### 2.3 Condiciones de cultivo y preparación de extractos celulares

Se inocularon cepas de *E. coli* 1:100 procedentes de cultivos durante toda la noche en 100 ml de medio mineral (Samain *et al.*, 1999), que contiene 7,0 g l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,0 g l<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g l<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g l<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 2,0 g l<sup>-1</sup> de KOH, 0,0045 g l<sup>-1</sup> de tiamina·HCl y 7,5 ml l<sup>-1</sup> de disolución de minerales en trazas. La disolución madre de minerales en trazas contenía 70 mM de nitrilotriacetato (pH 6,5), 7,5 g l<sup>-1</sup> de citrato férrico, 1,3 g l<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,21 g l<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,13 g l<sup>-1</sup> de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,25 g l<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,2 g l<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0,15 g l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. El medio se suplementó con 0,1% de glucosa y 1% de glicerol como fuente de carbono, y con 100 µg ml<sup>-1</sup> de ampicilina, 50 µg ml<sup>-1</sup> de kanamicina y/o 20 µg ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol antes de la incubación en un agitador giratorio a 37°C que proporciona una buena aireación.

Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD<sub>600 nm</sub>) de aproximadamente 1,0, se añadió el inductor isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) en una concentración de 0,5 mM, y los cultivos se incubaron toda la noche a 28°C con agitación constante. Después de aproximadamente 16 horas, se añadieron 40 mM de L-fucosa y 20 mM de lactosa. Los cultivos se incubaron entonces continuamente a 28°C con agitación constante.

En varios puntos de tiempo, se recogieron muestras de 20 ml de los cultivos, y las células se cosecharon mediante centrifugación. Los sobrenadantes de los cultivos se separaron y se analizaron inmediatamente mediante cromatografía de intercambio aniónico de altas prestaciones (HPAEC), o se almacenaron a -20°C. Los peletes celulares se lavaron con PBS (Sambrook y Russell, 2001), se resuspendieron en 5 veces el peso del pelete de agua destilada, y se lisaron hirviéndolos durante 10 min. Para obtener fracciones intracelulares, el desecho celular se separó por centrifugación, y el lisado celular transparente se almacenó a -20°C o se analizó inmediatamente mediante HPAEC.

### 2.4 SDS-PAGE

La expresión de proteínas heterólogas se comprobó mediante SDS-PAGE (Sambrook y Russell, 2001) (dato no mostrado). Los extractos proteicos se prepararon en amortiguador de carga de gel de SDS 1x, y los geles de poliacrilamida se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie.

### 2.5 Detección de oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio aniónico de altas prestaciones con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de altas prestaciones (HPAEC) usando un detector amperométrico pulsado (PAD) Decade II (Antec Leyden; www.antec-leyden.nl) y una columna CarboPac PA20 (Dionex; www.dionex.com) conectada a un sistema de HPLC (Shimadzu; www.shimadzu.eu). La sensibilidad del detector se ajustó a 50 µA con un potencial de pulso aplicado de 0,05 V.

Los mono-, di- y oligosacáridos eluyeron con hidróxido de sodio 10 mM a un caudal de 0,4 ml min<sup>-1</sup>. Después de una elución isocrática durante 30 min. con NaOH 10 mM, la columna se lavó durante 20 min. con NaOH 200 mM para

obtener tiempos de retención constantes, y después se regeneró con NaOH 10 mM durante 20 min. Para todas las muestras analizadas, se usaron 20  $\mu$ l de disoluciones diluidas con dH<sub>2</sub>O 1:2 para el análisis de HPAEC. El análisis vía HPAEC-PAD mostró tiempos de retención en la columna de HPLC usada de aproximadamente 3,5 min. para el patrón de L-fucosa, aprox. 15 min. para el patrón de lactosa, y aprox. 11-12 min. para el patrón de 3-fucosil-lactosa (dato no mostrado). Los patrones de las sustancias glicerol y glucosa, que se añaden al medio de cultivo como fuente de carbono, se registraron con un tiempo de retención de aprox. 1,5 min. y 7-8 min., respectivamente.

### Ejemplo 3: Producción de 3-fucosil-lactosa y secreción dependiente de SetA en el medio de cultivo por *E. coli* recombinante

El objetivo de este experimento fue investigar la exportación de 3-fucosil-lactosa intracelular mediada por SetA. Para los experimentos de fermentación se usaron las cepas JM01 y JM02 de *E. coli* (véase la Tabla 2). Las cepas JM01 y JM02, que expresan ambas las enzimas Fkp y FutAco ( $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa), así como las proteínas transportadoras FucP y LacY, difieren solamente en la expresión del transportador de SetA. JM01 no sobreproduce SetA, y JM02 sobreproduce SetA.

La Fig. 2 muestra las cantidades de 3-fucosil-lactosa en la masa celular húmeda y en el sobrenadante de los cultivos de JM01 y JM02 de *E. coli*, determinado mediante el análisis de HPAEC-PAD.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de SetA, se llevaron a cabo medidas a 7, 24 y 32 horas después de la inducción de la expresión de *fkp*, *fucP*, *lacY*, *futAco* y *setA*.

En la figura, las fracciones extracelulares de 3-fucosil-lactosa medida en *E. coli* JM01 (SetA no se sobreexpresó) se representan mediante las columnas I, representándose las fracciones intracelulares mediante las columnas II. En el caso de *E. coli* JM02 (sobreexpresión de SetA), las fracciones extracelulares de 3-fucosil-lactosa se representan mediante las columnas III, y las fracciones intracelulares se representan mediante las columnas IV. Todos los valores representan los valores medios de experimentos por duplicado, indicando las barras de error las desviaciones estándar respectivas.

Estas medidas muestran que la cepa JM01, que no sobreexpresa SetA, acumula 3-fucosil-lactosa en la fracción citosólica.

Por el contrario, la concentración intracelular de 3-fucosil-lactosa en el caso de la cepa JM002, que sobreexpresa *setA*, está por debajo del nivel de detección.

Además, los sobrenadantes procedentes de los cultivos de JM01 y JM02 exhiben un cierto contenido de 3-fucosil-lactosa. De ese modo, sin embargo, el contenido de 3-fucosil-lactosa encontrado en el sobrenadante del cultivo de JM02 está enormemente incrementado con respecto al contenido de 3-fucosil-lactosa encontrada en el sobrenadante del cultivo de JM01. Mientras que después de 32 h la concentración de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante de JM01 es aproximadamente 21 mg l<sup>-1</sup>, la concentración de 3-fucosil-lactosa en el caso de JM02 está por encima de 51 mg l<sup>-1</sup>.

La comparación de las cantidades totales de 3-fucosil-lactosa en cultivos de *E. coli* JM01 y JM02 se representa en la Fig. 3.

Aquí, la cantidad total de 3-fucosil-lactosa en cultivos de *E. coli* JM01 está representada por las columnas I, y la cantidad total de 3-fucosil-lactosa en cultivos de *E. coli* JM02 está representada por las columnas II. Nuevamente, se representan los valores medios de experimentos por duplicado.

Después de 32 h de incubación, la cepa JM02 produce con 51,68 mg l<sup>-1</sup> aproximadamente 57% más de 3-fucosil-lactosa en total que la cepa JM01 (32,99 mg l<sup>-1</sup>).

### Ejemplo 4: Discusión

Los resultados experimentales del análisis de HPAEC-PAD muestran que existen fuertes diferencias en la síntesis y transporte de 3-fucosil-lactosa entre las cepas JM01, sin expresión de SetA, y JM02, que sobreexpresa SetA.

Para empezar, 3-fucosil-lactosa no es detectable en la masa húmeda celular del cultivo de JM02, mientras que la concentración de 3-fucosil-lactosa se puede medir en el sobrenadante.

Esto indica claramente que la sobreexpresión de SetA en *E. coli* conduce a una exportación extremadamente eficiente de 3-fucosil-lactosa desde la célula.

Por tanto, los inventores han mostrado que SetA, contrariamente a lo que se habría de esperar de la técnica anterior, puede exportar eficientemente oligosacáridos más grandes, presentando, en el presente caso, tres subunidades y una masa molecular de 488 g/mol.

Por el contrario, en la masa celular húmeda de JM01, se detecta una cantidad considerable de 3-fucosil-lactosa, mientras que solamente está presente comparativamente poca 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante.

Este resultado muestra que, en ausencia de SetA sobreexpresada, 3-fucosil-lactosa se acumula fuertemente en el citosol de las células bacterianas. El hecho de que en estas circunstancias también se detecte 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante se puede atribuir, según el estado actual de conocimiento, a una mayor lisis de células bacterianas, que resulta de concentraciones intracelulares elevadas de 3-fucosil-lactosa.

- 5 Cuando se comparan las cantidades globales de 3-fucosil-lactosa en los cultivos de JM01 y JM02, se hace evidente que la sobreexpresión de SetA no solo conduce a una mayor concentración de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante, sino también eleva la cantidad total de 3-fucosil-lactosa sintetizada (véase la Figura 3).

Este incremento en la eficiencia sintética global se puede atribuir a una mayor viabilidad celular de las células que sobreexpresan SetA, viabilidad la cual sería debida a la evitación de la citotoxicidad del producto. Como alternativa, o además, el incremento en la eficiencia sintética global también se podría atribuir a la evitación de los efectos inhibidores del producto en las enzimas sintéticas debido a la exportación de producto mediada por SetA sobreexpresada.

Por tanto, los inventores han mostrado que la sobreexpresión del transportador de SetA es una manera eficiente para mejorar la producción de la síntesis de oligosacáridos, lograda por métodos biotécnicos que emplean células cultivables. Además, puesto que se puede evitar la inhibición del producto de las enzimas sintéticas relevantes y la citotoxicidad del producto de síntesis, la producción se facilita y se hace más controlable.

#### Listado de referencias

- Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F. & M. Aebi, (2006) Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J* 25(5): 967-976.
- 20 Albermann, C., W. Piepersberg & U. F. Wehmeier, (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr Res* 334: 97-103.
- Andersson, B., O. Porras, L. A. Hanson, T. Lagergard & C. Svanborg-Eden, (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* 153: 232-237.
- 25 Bode, L., (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr* 136: 2127-2130.
- Boehm, G. & B. Stahl, (2007) Oligosaccharides from milk. *J Nutr* 137: 847S-849S.
- Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, B. Facinelli, L. Ferrante, R. Capretti & G. Orazio, (2006) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrhea pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res* 59: 377-382.
- 30 Coyne, M. J., B. Reinap, M. M. Lee & L. E. Comstock, (2005) Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307: 1778-1781.
- Crane, J. K., S. S. Azar, A. Stam & D. S. Newburg, (1994) Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J Nutr* 124: 2358-2364.
- 35 Cravioto, A., A. Tello, H. Villafan, J. Ruiz, S. del Vedovo & J. R. Neeser, (1991) Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* 163: 1247-1255.
- Datsenko, K. A., y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-5.
- 40 Dower, W. J., J. F. Miller, y C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-45.
- Drouillard, S., Driguez, H., y Samain, E., (2006) Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* alpha1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:1778-1780.
- 45 Dumon, C, C. Bosso, J. P. Uille, A. Heyraud & E. Samain, (2006) Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* 7: 359-365.
- Dumon, C, B. Priem, S. L. Martin, A. Heyraud, C. Bosso & E. Samain, (2001) In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj J* 18: 465-474.

- Dumon, C, E. Samain & B. Priem, (2004) Assessment of the two *Helicobacter pylori* alpha-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 20:412-419.
- 5 Gnoth, M. J., S. Rudloff, C. Kunz & R. K. Kinne, (2001) Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* 276: 34363-34370.
- Grant, W. D., I. W. Sutherland & J. F. Wilkinson, (1970) Control of colanic acid synthesis. *J Bacteriol* 103: 89-96.
- Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata, H. Nagano, J. Ohnishi & A. Ozaki, (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25: 213-217.
- 10 Kretzschmar, G. & W. Stahl, (1998) Large scale synthesis of linker-modified sialyl-Lewis(X), Lewis(X) and N-acetyllactosamine. *Tetrahedron* 54: 6341-6358.
- Kunz, C. & S. Rudloff, (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 16: 1341-1346.
- Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein & S. Strobel, (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 20: 699-722.
- 15 Liu, J. Y., P. F. Miller, M. Gosink & E. R. Olson, (1999a) The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31:1845-1851.
- Liu, J. Y., P. F. Miller, J. Willard & E. R. Olson, (1999b) Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22977-22984.
- 20 Newburg, D. S., (2001) Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Adv Exp Med Biol* 501: 3-10.
- Newburg, D. S. & S. H. Neubauer, (1995) Carbohydrates in milk. In: *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen (ed). San Diego, CA: Academic Press, p. 273-349.
- Parkot, J., E. Hüfner & S. Jennewein, (2008) Synthesis of fucosylated compounds. European patent application EP08172267.
- 25 Ruiz-Palacios, G. M., L. E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia & D. S. Newburg, (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2 Gal beta 1, 4 GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* 278: 14112-14120.
- Samain, E., V. Chazalet & R. A. Geremia, (1999) Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J Biotechnol* 72: 33-47.
- 30 Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Jennewein Biotechnologie GmbH
- <120> Síntesis de HMO
- 35 <130> 2827P100WO
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 100
- 40 <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 1

ES 2 660 698 T3

aattactctt caattcgtaa cccatagggtt ttgaatttct ccagcactac ggcaatctct 60  
 tcatcgctca gcagtgtagg ctggagctgc ttcgaagttc 100  
 <210> 2  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 5 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 2  
 ggtgggtaat taaacggcta attcaatagt gtgaaaggaa caacattatt gccctgtttt 60  
 gaatcagaga gagggctgac atgggaatta gccatgttcc 100  
 <210> 3  
 <211> 26  
 10 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 3  
 cattctgta gccatcatcc ttctcc 26  
 <210> 4  
 15 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 4  
 gaagaagatg gtgggtaatt aaacggc 27  
 20 <210> 5  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 5  
 25 aagggaaaaa catatgatct ggataatgac gatggctcgc cgtatgaacg gtg 53  
 <210> 6  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 30 <400> 6  
 aagggaaaaa ctcgagccac gtcatcaaac gtccttaacc tttgctg 47  
 <210> 7  
 <211> 54  
 <212> ADN

# ES 2 660 698 T3

<213> *Escherichia coli*  
<400> 7  
aaggaaatat accatgggct actatataa aaacacaaac tttggatgt tcgg 54  
<210> 8

5 <211> 57  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*  
<400> 8  
aaggaaaacc gaattcgatt gcttaagcga cttcattcac ctgacgacgc agcaggg 57

10 <210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*  
<400> 9

15 ggatctcgac gctctcct 19  
<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

20 <400> 10  
gattatgcgg ccggtacaa 20  
<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN

25 <213> *Escherichia coli*  
<400> 11  
ttgtacacgg ccgcataatc 20  
<210> 12  
<211> 19

30 <212> ADN  
<213> *Escherichia coli*  
<400> 12  
tatgctagtt attgctcag 19

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula bacteriana para ser cultivada de forma estable en un medio para la producción de oligosacáridos, siendo dichos oligosacáridos fucosil-lactosa, transformándose la célula para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una fucosil-transferasa, caracterizada por que la célula se transforma además para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la familia de Transportadores de Eflujo de Azúcar (SET), proteína la cual se sobreexpresa, conduciendo la sobreexpresión a una exportación de los oligosacáridos.
2. La célula bacteriana según la reivindicación 1, caracterizada por que la célula es una célula de *Escherichia coli*.
3. La célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que el transportador de eflujo de azúcar es SetA.
4. La célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que se transforma además para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que facilita o promueve la importación de eductos requeridos para la síntesis de oligosacáridos, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste en transportador de lactosa, transportador de fucosa, transportador de ácido siálico, transportador de galactosa, transportador de manosa, transportador de N-acetilglucosamina, transportador de N-acetilgalactosamina, transportador de ABC, transportador para un azúcar activado por nucleótido, y transportador para una nucleobase, nucleósido o nucleótido.
5. La célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que se transforma además para comprender al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en nucleotidiltransferasa, guanililtransferasa, uridililtransferasa, Fkp, L-fucosa cinasa, fucosa-1-fosfato guanililtransferasa, CMP-ácido siálico sintetasa, galactosa cinasa, galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, glucosa cinasa, glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, manosa cinasa, manosa-1-fosfato guanililtransferasa, GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa reductasa, glucosamina cinasa, glucosamina-fosfato acetiltransferasa, N-acetil-glucosamina-fosfato uridililtransferasa, UDP-N-acetilglucosamina 4-epimerasa, UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa.
6. Un método para la producción de oligosacáridos, siendo dichos oligosacáridos fucosil-lactosa, comprendiendo el método las etapas de:
- a) proporcionar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
  - b) cultivar la célula en un medio en condiciones que permitan la producción de dichos oligosacáridos,
  - c) extraer dichos oligosacáridos del medio de cultivo.
7. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que la etapa b) se lleva a cabo usando un biorreactor de flujo continuo.
8. El método según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que el medio en la etapa b) comprende eductos requeridos para la síntesis de dichos oligosacáridos, en el que los eductos se seleccionan del grupo que consisten en arabinosa, treosa, eritrosa, ribosa, ribulosa, xilosa, glucosa, D-2-desoxi-2-amino-glucosa, N-acetilglucosamina, glucosamina, fructosa, manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, galactosamina, sorbosa, fucosa, ácido N-acetilneuramínico, glicósido, azúcar no natural, nucleobase, nucleósido, nucleótido, y cualquier di- o polímero del mismo.

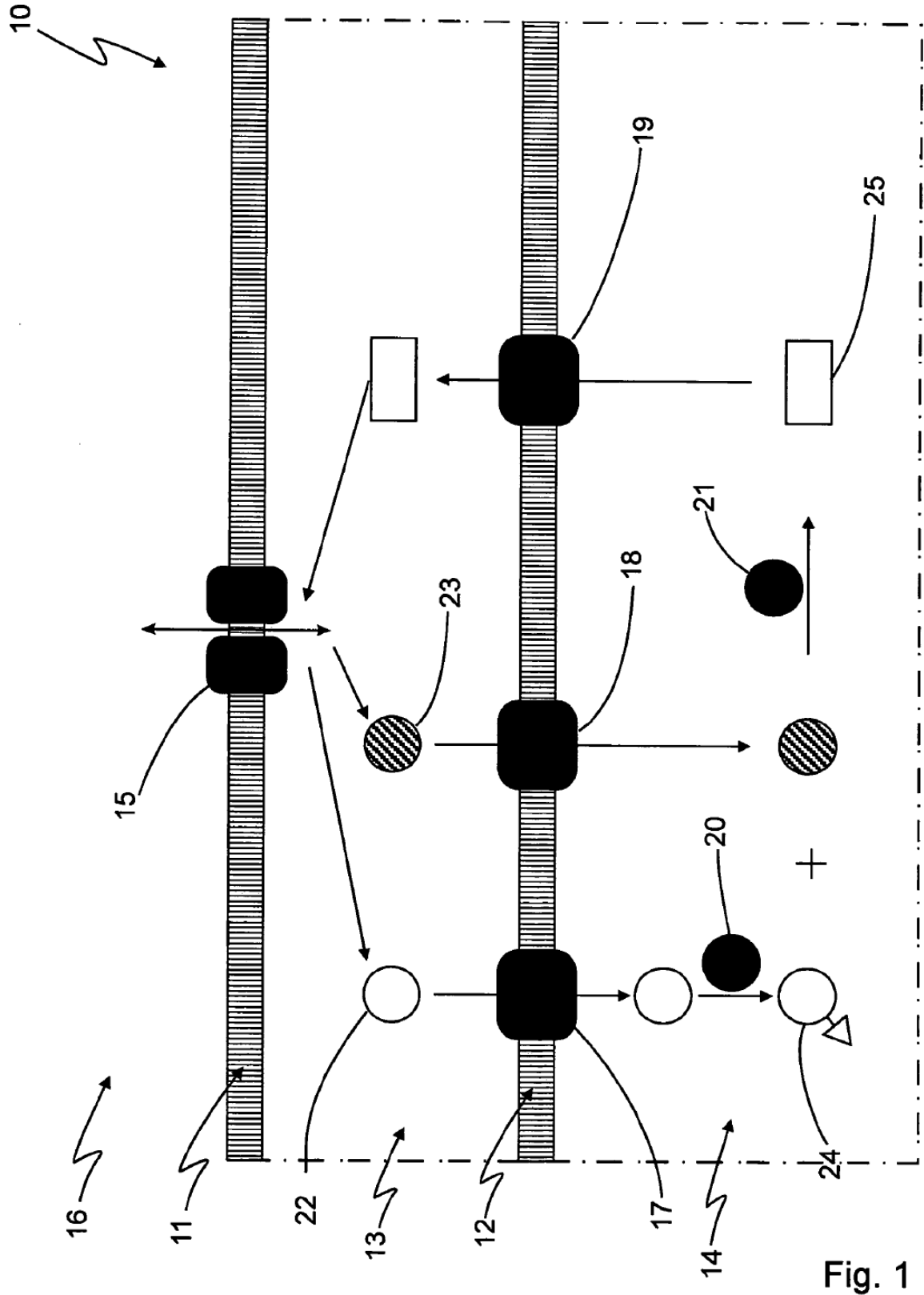


Fig. 1



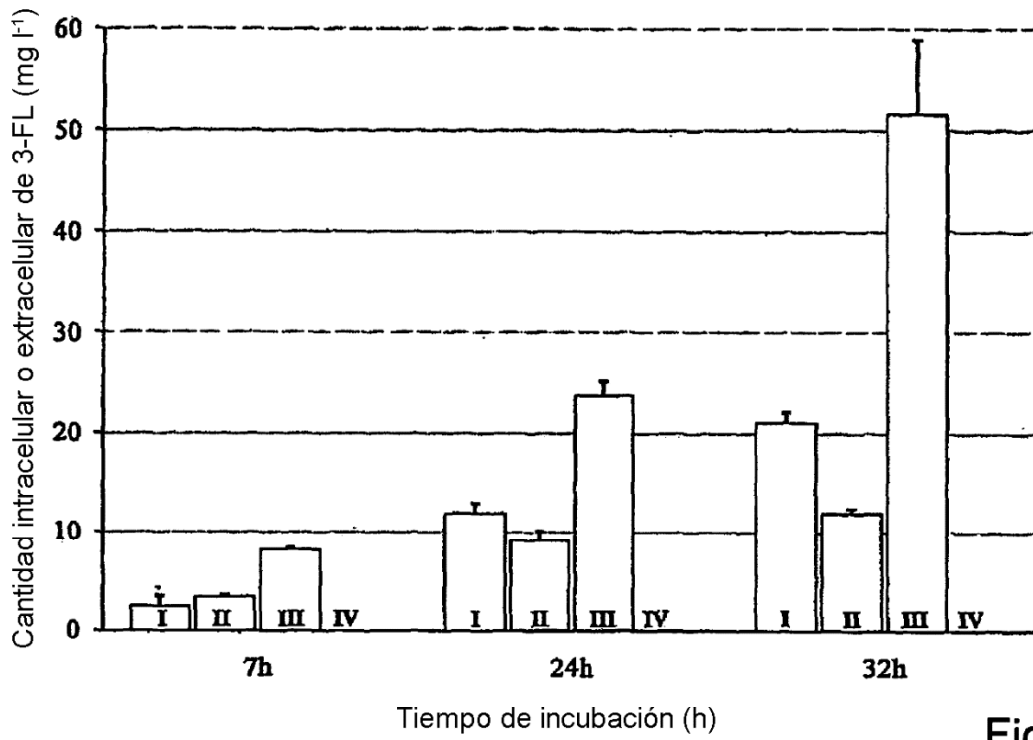


Fig. 2

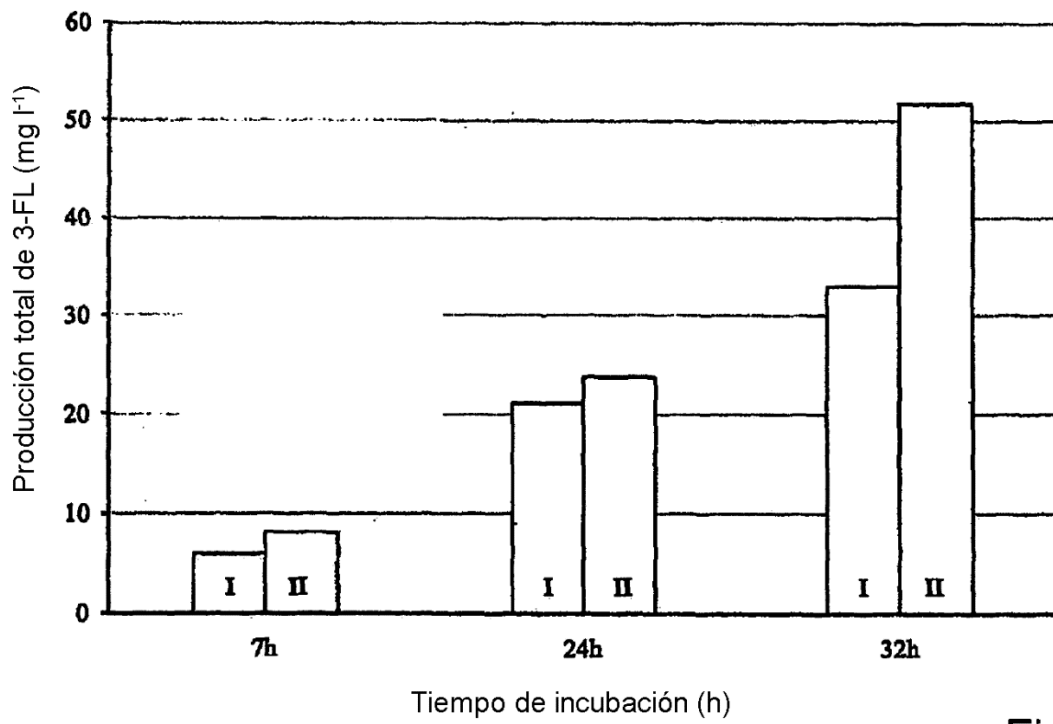


Fig. 3