



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715253-1 A2



* B R P I 0 7 1 5 2 5 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 26/09/2007
(43) Data da Publicação: 04/06/2013
(RPI 2213)

(51) Int.Cl.:

C12N 1/21
C12N 9/10
C12N 9/88
C12N 9/90
C07K 14/245
C12P 19/26

(54) Título: MICRÓBIO GENETICAMENTE MANIPULADO, MÉTDO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANÁLOGO DE ÁCIDO SIÁLICO N-ACIL

(57) Resumo: MICRÓBIO GENETICAMENTE MANIPULADO, MÉTODO PARA A FORMAÇÃO DE UM MICRÓBIO GENETICAMENTE MANIPULADO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANÁLOGO DE ÁCIDO SIÁLICO N-ACIL. A presente invenção refere-se a uma cepa de E. Coli metabolicamente projetada a qual produz ácido siálico e a um método para a produção de referida cepa. Nas células de E. coli projetadas, os genes nanT (transportador de ácido siálico) e nanA (alsolase de ácido siálico) estão desativados e os genes neuC e neuB de biosíntese de ácido siálico no grupo B Neisseria meningitidis estão introduzidos e superexpressados nas células nanT-nanA do E. Coli. Adicionalmente, a sintase do gene de glucosamina, glms, do E. Coli é co-superexpressada com neuB e neuC.

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2006 US 60/826.919

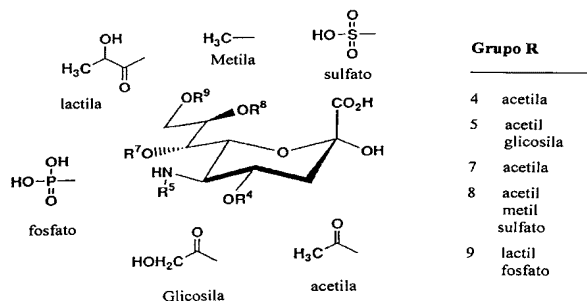
(73) Titular(es): SYRACUSE UNIVERSITY

(72) Inventor(es): BENJAMIN R. LUNDGREN, CHRISTOPHER N. BODDY

(74) Procurador(es): Martinez & Kneblewski S/C Ltda.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007079496 de 26/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/097366de 14/08/2008



"MICRÓBIO GENETICAMENTE MANIPULADO, MÉTODO PARA A FORMAÇÃO DE
UM MICRÓBIO GENETICAMENTE MANIPULADO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE
ÁCIDO SIÁLICO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANÁLOGO DE
ÁCIDO SIÁLICO N-ACIL"

5 Referência Remissiva a Pedido Relacionado

O presente pedido de patente reivindica a prioridade do pedido provisório de patente norte-americana No. 60/826.919, depositado em 26 de setembro de 2006.

Antecedentes da Invenção

10 Campo da Invenção

A presente invenção se refere a *Escherichia coli* (*E. coli*) metabolicamente manipulado e, mais especificamente, a *E. coli* metabolicamente manipulado para a produção intensificada de ácido siálico.

15 Descrição da Técnica Anterior

O ácido siálico é um carboidrato biologicamente complexo que exerce papéis importantes em sinalização celular, patogênese bacteriana e metástase de tumor. As propriedades físico-químicas do ácido siálico tornaram o mesmo um recurso
20 valioso com uma demanda crescente em medicina e biotecnologia.

Mais precisamente, o ácido siálico é um termo geral usado para descrever uma grande família de açúcares ácidos que são predominantemente encontrados sobre a superfície celular de células eucariotas. O ácido siálico mais comum é ácido N-
25 acetilneuramínico ou Neu5Ac, um açúcar ácido com nove carbonos que sofre várias modificações para gerar os membros da família do ácido siálico. Conforme observado na Figura 1, a diversidade da família do ácido siálico é representada com mais de 50 membros conhecidos. O ácido siálico representa uma grande família de
30 carboidratos na superfície celular que são derivados de um

composto precursor ácido com nove carbonos denominado ácido *N*-acetilneuramínico ou Neu5Ac. Neu5Ac é, freqüentemente, decorado com grupos acetila, fosfato, metila, sulfato e lactila, os quais são requeridos para eventos de sinalização celular e adesão celular desejáveis mediados pelo ácido siálico.

O ácido siálico desempenha uma série diversa de funções, incluindo processos biológicos importantes, tais como estabilidade de glicoproteína, imunidade celular, transporte de solutos, auto-reconhecimento, plasticidade neuronal e sinalização celular. O ácido siálico também tem um papel significativo em doenças humanas. Por exemplo, foi mostrado que células cancerígenas têm níveis elevados de ácido siálico ou sialilação sobre suas superfícies. Foi mostrado que sialilação em excesso promove a invasividade e reduz interações intercelulares, as quais são características de metástase de tumor. O ácido siálico está sendo pesquisado atualmente como uma ferramenta para a formação de imagem não invasiva de tecido cancerígeno *in vivo*. Níveis aumentados de ácido siálico têm sido observados para doença cardiovascular, alcoolismo e diabetes, assim, tornando o ácido siálico um marcador para diagnóstico e detecção de tais doenças mortais. Alguns patógenos bacterianos possuem uma cápsula de ácido poli-siálico que serve como um agente de disfarce através de imitação da superfície extracelular de células de mamífero. As cápsulas de ácido poli-siálico protegem as bactérias subjacentes da resposta imune do hospedeiro, o que permite que as bactérias estabeleçam uma infecção. Bactérias com cápsulas de ácido poli-siálico são os agentes causadores de meningite, uma doença que ameaça a vida em adultos e crianças. Por fim, descobriu-se que análogos de ácido siálico têm papéis importantes na indústria farmacêutica como inibidores de neuraminidase em influenza, por

exemplo, Relenza®, estabilizantes de produtos terapêuticos ou agentes diagnósticos.

A disponibilidade de recursos do ácido siálico é limitada e cara. Tradicionalmente, o ácido siálico tem sido isolado de gema de ovo, soro de leite e ninhos de pássaro comestíveis, os quais requerem um processo de purificação longo, problemático. Os rendimentos globais são, tipicamente, baixos (~10-20%) e a pureza é marginal. Vias sintéticas em química de ácido siálico são desafiadoras em virtude da complexidade da molécula alvo. Para superar as dificuldades associadas ao isolamento, purificação e química sintética de ácido siálico, síntese enzimática é atualmente o método preferido para a produção de ácido siálico. A clonagem e subsequente isolamento de enzimas envolvidas na biossíntese e degradação de ácido siálico tem permitido que os pesquisadores produzam ácido siálico *in vitro* através de uma reação enzimática direta. Síntese enzimática de ácido siálico tem um alto rendimento (80%) e gera um produto puro através de uma cristalização direta da mistura enzimática. As principais deficiências da síntese enzimática na produção de ácido siálico são seu custo e capacidade de escalonamento a nível industrial.

Os métodos para produção de ácido siálico, discutidos supra, são insuficientes para ir de encontro à grande demanda das indústrias médicas e biotecnológicas. Uma abordagem de engenharia metabólica que supera com sucesso os problemas associados, por exemplo, ao isolamento, purificação, química sintética, rendimento de produção, custo e capacidade de escalonamento de ácido siálico a nível industrial, representaria um avanço significativo e há muito esperado no campo.

30 Objetivos e Vantagens da Invenção

De forma a resolver os problemas acima mencionados associados à produção de ácido siálico, é um objetivo e vantagem principais da presente invenção proporcionar uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada em que a referida célula produz ácido siálico.

É um objetivo e vantagem adicionais da presente invenção proporcionar um método para fazer uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada, em que a referida célula produz ácido siálico.

É um outro objetivo e vantagem da presente invenção proporcionar um método para fazer ácido siálico através do uso de uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada.

Outros objetivos e vantagens da presente invenção serão, em parte óbvios e, em parte, aparecerão aqui depois.

Sumário da Invenção

De acordo com uma modalidade da presente invenção, uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada a qual produz ácido siálico e um método para fazer a referida célula são proporcionados. Mais especificamente, uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada é proporcionada, em que os genes *nanT* (transportador de ácido siálico) e *nanA* (aldolase de ácido siálico) foram inativados, os genes *neuC* e *neuB* da biossíntese de ácido siálico em *Neisseria meningitidis* do grupo B foram introduzidos e superexpressos na célula de *E. coli nanT⁻ nanA⁻* e o gene de sintase de glutamina, *glmS*, de *E. coli* foi co-superexpresso com *neuB* e *neuC*. De acordo com uma outra modalidade da presente invenção, um método de fabricação de ácido siálico através do uso da referida célula de *E. coli* metabolicamente manipulada é proporcionado.

A presente invenção proporciona um micróbio geneticamente manipulado compreendendo: uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio, em que a primeira molécula de DNA codifica um transportador de ácido siálico; uma
5 mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio, em que a segunda molécula de DNA codifica uma aldolase de ácido siálico; e uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima que codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-
10 epimerase de UDP-N-acetilglicosamina.

Em algumas modalidades da presente invenção, o micróbio ainda compreende uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, em que a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima
15 selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-N-acetilglicosamina. De preferência, o micróbio ainda compreende uma molécula de DNA recombinante ou uma mutação em uma molécula de DNA na via *glm* ou *nag* que proporciona níveis aumentados de UDP-GlcNAc comparado com
20 uma cepa do tipo silvestre. Em algumas modalidades da presente invenção, o micróbio ainda compreende uma molécula de DNA recombinante que codifica uma sintase de glicosamina. De preferência, a molécula de DNA recombinante que codifica uma sintase de glicosamina é um gene *glmS*.

25 Em algumas modalidades da presente invenção, o micróbio é *E. coli*. De preferência, as mutações de inativação no micróbio são nos genes *nanT* e *nanA*. Em outras modalidades da presente invenção, as primeira e segunda moléculas de DNA recombinantes que codificam enzima são os genes *neuC* e *neuB*. De

preferência, os genes *neuC* e *neuB* se originam de *Neisseria meningitidis*. De preferência, os micróbios da presente invenção são capazes de transportar ácido siálico para fora da célula.

A presente invenção também proporciona um método de
5 formação de um micróbio geneticamente manipulado para a produção de ácido siálico compreendendo as etapas de: introdução de uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA que codifica um transportador de ácido siálico no micróbio; introdução de uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA que codifica
10 uma aldolase de ácido siálico no micróbio; e introdução de uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, em que a referida primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-
15 epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina.

Em algumas modalidades da presente invenção, o método de formação de um micróbio geneticamente manipulado para a produção de ácido siálico ainda compreende a etapa de introdução de uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de
20 enzima, em que a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina. De preferência, os métodos da presente invenção ainda compreendem a etapa de introdução de
25 uma molécula de DNA recombinante ou uma mutação em uma molécula de DNA na via *glm* ou *nag* que proporciona níveis aumentados de UDP-GlcNAc comparado com uma cepa do tipo silvestre. Alguns métodos da presente invenção ainda compreendem a etapa de introdução de uma molécula de DNA recombinante que codifica uma sintase de
30 glicosamina no micróbio.

A presente invenção ainda proporciona um método de produção de ácido siálico compreendendo as etapas de: fornecimento de um micróbio geneticamente manipulado, em que o micróbio compreende uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio que codifica um transportador de ácido siálico, uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio que codifica uma aldolase de ácido siálico; e uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, em que a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina; e cultura do micróbio na presença de uma fonte de carbono.

Em algumas modalidades da presente invenção, a fonte de carbono pode ser, mas não está limitada a, glicose, glicerol, frutose ou *N*-acetilglicosamina.

A presente invenção ainda proporciona um micróbio geneticamente manipulado compreendendo: uma mutação de inativação em uma molécula de DNA no micróbio, em que a molécula de DNA codifica uma aldolase de ácido siálico; uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, em que a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma sintase de ácido siálico; e uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, em que a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina.

A presente invenção também proporciona um método de produção de um análogo de ácido *N*-acil siálico compreendendo as etapas de: fornecimento de um micróbio geneticamente manipulado, em que o micróbio compreende uma mutação de inativação em uma

primeira molécula de DNA no micróbio que codifica um transportador de ácido siálico; uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio que codifica uma aldolase de ácido siálico; e uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, em que a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina; e cultura do micróbio na presença de um reagente, de modo que UDP-*N*-
10 acilglicosamina intracelular é gerada. Em algumas modalidades da presente invenção, o reagente pode ser, mas não está limitado a, um análogo de *N*-acilglicosamina.

Breve Descrição dos Desenhos

A presente invenção será mais totalmente compreendida e apreciada através de leitura da descrição detalhada a seguir em conjunto com os desenhos em anexo, nos quais:

a Fig. 1 é um esquema de alto nível ilustrando a diversidade da família do ácido siálico;

a Fig. 2 é um esquema de alto nível ilustrando a produção de ácido siálico por uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada de acordo com uma modalidade da presente invenção;

a Fig. 3 é uma ilustração gráfica do efeito de uma fonte de carbono sobre a produção de ácido siálico em uma célula de *E. coli* metabolicamente manipulada de acordo com uma modalidade da presente invenção;

a Fig. 4 é uma ilustração gráfica da otimização de produção de ácido siálico através de múltiplas alimentações de glicose de acordo com uma modalidade da presente invenção;

a Fig. 5 é um esquema ilustrando as vias envolvidas

na produção de ácido siálico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

O metabolismo de ácido siálico bacteriano é bem compreendido e vias anabólicas e catabólicas foram identificadas. O óperon *nan* codifica as proteínas necessárias para o catabolismo de ácido siálico e é encontrado em centenas de espécies bacterianas. Em *E. coli*, essa via consiste de um transportador de ácido siálico, NanT, uma aldolase de ácido siálico, NanA, uma quinase ManNAc, NanK e uma epimerase de ManNAc-6-fosfato, NanE, conforme observado na Figura 2. NanT não está limitada, quanto à sua função, ao catabolismo de ácido siálico, uma vez que foi demonstrado que ela também está envolvida na síntese de cápsulas de ácido poli-siálico através de mediação da captação de ácido siálico e incorporação do ácido siálico na cápsula de ácido poli-siálico.

É observada na Figura 2 a produção de ácido siálico em *Escherichia coli* metabolicamente manipulado. As cruzes indicam blocos em vias em virtude de inativação gênica. As setas em negrito indicam fluxos elevados de metabolismo através de superexpressão gênica. O catabolismo de ácido siálico foi bloqueado através de inativação dos genes *nanT* (transportador de ácido siálico) e *nanA* (aldolase de ácido siálico) (cruzes). Os genes *neuC* e *neuR* da biossíntese de ácido siálico em *Neisseria meningitidis* do grupo B foram introduzidos e superexpressos na cepa *nanT⁻ nanA⁻* de *E. coli* (setas em negrito). Aumento no fluxo metabólico de UPD-GlcNAc, o substrato da via *neuBC*, foi obtido através de manipulação de superexpressão de *glmS* através de um mecanismo indefinido. As abreviações são como segue: Neu5Ac: ácido

N-acetilneuramínico, ManNAc: *N*-acetilmanosamina, ManNAc-6-P: *N*-acetilmanosamina-6-fosfato, GlcNAc-6-P: *N*-acetilglicosamina-6-fosfato, UDP-GlcNAc: *N*-acetilglicosamina de difosfato de uridina, GlcN-6-P: glicosamina-6-fosfato, Fru-6-P: frutose-6-fosfato, PEP: fosfenolpiruvato, Gln: glutamina, Glu: glutamato, UDP: difosfato de uridina, *nanT*: transportador de ácido siálico, *nanA*: aldolase de ácido siálico, *nanK*: quinase ManNAc, *nanE*: epimerase de ManNAc-6-P, *glmS*: sintase de glicosamina, *gluM*: mutase de glicosamina, *glmU*: uridiltransferase de GlcNAc-1-P/acetiltransferase de GlcN-1-P, *neuC*: 2-epimerase de UDP-GlcNAc, *neuB*: sintase de ácido siálico, *glm*: biossíntese de UDP-GlcNAc, *nag*: degradação de GlcNAc. Os produtos do sistema *nan* são GlcNAc e piruvato, os quais são moléculas chave no metabolismo primário.

Em contraste ao catabolismo de ácido siálico, a biossíntese de ácido siálico bacteriano está limitada a um subconjunto de bactérias patogênicas, incluindo *E. coli* K1 e *N. meningitidis* do grupo B, que sintetizam uma cápsula de ácido poli-siálico. As duas proteínas que participam na biossíntese de ácido siálico são NeuC e NeuB. NeuC é uma 2-epimerase de UDP-GlcNAc de hidrolise que gera ManNAc. NeuB é uma sintase que combina ManNAc e fosfoenolpiruvato para formar ácido siálico. Outras proteínas da via *neu* incorporam ácido siálico na cápsula de ácido poli-siálico. Duas vias biossintéticas de ácido siálico foram manipuladas a partir de enzimas dos sistemas *nan* e *neu*. A primeira via manipulada envolvia as proteínas NanAEK catabólicas. Em virtude do fato de ter sido mostrado que NanA sintetiza ácido siálico na presença de piruvato em excesso *in vitro*, foi suposto que a via *nanAEK* poderia ser revestida através de fornecimento de GlcNAc em excesso à culturas de células de *E. coli* metabolicamente

manipuladas. GlcNAc é prontamente captado por células de *E. coli* e espera-se que o GlcNAc intracelular seja convertido em ManNAc através do auxílio das proteínas NanEK. A alta concentração intracelular de ManNAc, então, acionaria a síntese de ácido siálico através de catálise de NanA. A produção de ácido siálico não foi observada em experimentos em frasco de agitação de BRL01 (uma cepa *nanT^r* de *E. coli* que possui um gene de RNA polimerase T7 *lac*-controlado)/*nanAEK* e, como um resultado, conclui-se que a via *nanAEK* é ineficaz na produção de ácido siálico.

A segunda via manipulada se focalizava sobre as proteínas NeuC e NeuB de *N. meningitidis* do grupo B, as quais serão discutidas infra. Um benefício dessa via é a especificidade de substrato de NeuC, a qual converte um metabólito bacteriano comum, UDP-GlcNAc, em ManNAc, conforme observado na Figura 2. NeuC, uma 2-epimerase de UDP-GlcNAc de hidrólise, é também mais eficiente do que algumas outras epimerases em virtude de sua capacidade de acoplar energia a partir de uma reação de hidrólise para acionar a epimerização. Em virtude de sua eficiência energética através de sua capacidade de usar a energia liberada de uma primeira reação para acionar uma reação subsequente, a 2-epimerase de UDP-GlcNAc é preferida para a produção de ácido siálico de acordo com a presente invenção.

Como o substrato direto da via *neuBC*, reservas de UDP-GlcNAc controlam o fluxo metabólico na via sintética de ácido siálico, controlando a titulação de ácido siálico. A Figura 5 mostra as vias envolvidas na manutenção das reservas de UDP-GlcNAc. Aumento das reservas de UDP-GlcNAc aumenta a produtividade e titulação em cultura de ácido siálico. UDP-GlcNAc é um componente chave da biossíntese da parede celular bacteriana e

está relacionado ao metabolismo central através da via *glm*, a qual converte frutose-6-fosfato (Fru-6P) em UDP-GlcNAc e da via *nag*, a qual retorna o UDP-GlcNAc hidrolisado a Fru-6P. Essas duas vias acoplam energeticamente o metabolismo bacteriano central à biossíntese da parede celular e produção de ácido siálico. A presente invenção proporciona métodos para intensificar o fluxo através da via *glm* e/ou diminuir o fluxo através da via *nag* para aumentar as reservas de UDP-GlcNAc, desse modo, melhorando a produtividade de ácido siálico. Controle do grau e direção da linha entre o elo metabólico chave Fru-6P e UDP-GlcNAc permitirá que a produtividade de ácido siálico seja otimizada. O controle das vias *glm* e/ou *nag* e o aumento nos níveis de UDP-GlcNAc comparado com cepas do tipo silvestre, conforme proporcionado pela presente invenção, são essenciais para a produção comercial eficiente de ácido siálico.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, *E. coli* foi manipulado com sucesso para produzir ácido siálico, uma molécula complexa biologicamente importante que tem aplicações significativas em medicina e biotecnologia. Os custos da produção de ácido siálico a partir de *E. coli* metabolicamente manipulado é substancialmente menor do que aquele de síntese química e, diferente da síntese enzimática, *E. coli* metabolicamente manipulados são mais prontamente passíveis de escalonamento para produção industrial.

A partir de culturas em frasco de agitação de baixa densidade celular, a produção de ácido siálico atingiu um máximo de 1,5 g⁻¹. A incorporação dessa cepa metabolicamente manipulada em fermentação em alta densidade celular de acordo com a presente invenção provavelmente aumentará a produção de ácido siálico para

vários gramas por litro. Na verdade, um aumento de dez vezes na produção de ácido siálico é possível a partir de uma cultura de células em alta densidade, por exemplo, de mais de 15 g⁻¹. Ao nível de produção industrial, o método da presente invenção serve
5 como um recurso de custo eficaz para o ácido siálico, proporcionando ácido siálico o bastante para ir de encontro às demandas continuamente crescentes das comunidades médica, biotecnológica e científica.

Em algumas modalidades da presente invenção, a
10 produção de ácido siálico pode ser ainda intensificada através de modificação da via *neuBCglmS* manipulada pré-existente. Por exemplo, a manipulação de uma proteína de *Glms* que tem uma maior taxa de renovação na síntese de glicosamina e é mais solúvel no citosol pode ser realizada.

15 Outro aspecto chave da presente invenção é o efluxo inesperado de ácido siálico do citosol para o meio. Ensinaamentos padrões na técnica referentes ao transporte de açúcares através de membranas biológicas sugerem que açúcares ácidos não podem atravessar membranas. Seu alto nível de hidrofiliicidade, associado
20 à sua carga negativa, torna as mesmas impermeáveis. Isso é bem documentado para açúcares fosforilados e sulfatados. Ácidos nonulossônicos, tais como ácido siálico e seus análogos, são açúcares ácidos e, como tal, os ensinamentos na técnica indicaram que esses compostos não são capazes de atravessar membranas.
25 Assim, de acordo com os ensinamentos na técnica, se o ácido siálico é produzido intracelularmente, conforme ocorre na presente invenção, ele não será capaz de deixar a célula e entrar no meio. Esse não é o caso, contudo, para o ácido siálico produzido de acordo com a presente invenção. A presente invenção proporciona
30 micróbios e métodos para a produção de ácido siálico onde altos

níveis de ácido siálico podem ser produzidos no citosol e onde o ácido siálico não atravessa a membrana e entra no meio. Esse transporte pela membrana aumenta dramaticamente a produtividade do sistema, uma vez que as células produtoras não têm de morrer e serem submetidas à lise para liberar o ácido siálico mas podem, antes, liberar ácido siálico e continuar a produzir mais produto. Assim, em modalidades preferidas da presente invenção, os micróbios usados para produzir ácido siálico são capazes de transportar ácido siálico para fora da célula.

10 Uma extensão da produção de ácido siálico em *E. coli* metabolicamente manipulado, de acordo com uma modalidade da presente invenção, é na biossíntese e produção de análogos de ácido siálico (ácidos siálicos não naturais) em quantidades significativas. Análogos de ácido siálico são usados como sondas em interações celulares, agentes em visualização de superfícies celulares *in vivo* e como componentes em produtos farmacêuticos. Atualmente, análogos de ácido siálico são sintetizados e manipulados em superfícies celulares a partir de açúcares de manosamina derivatizados caros. Em contraste, a produção de análogos de ácido siálico a partir de *E. coli* metabolicamente manipulado de acordo com a presente invenção utiliza derivados de glicosamina, os quais são mais baratos do que seus equivalentes de manosamina. Processos a jusante envolvendo análogos de ácido siálico serão mais eficazmente realizados com acesso direto ao análogo de ácido siálico ao invés de seu precursor manosamina. Portanto, a produção de ácido siálico a partir de *E. coli* metabolicamente manipulado de acordo com a presente invenção é uma via direta e de custo eficaz para a síntese de ácido siálico e seus análogos, tais como análogos de ácido *N*-acil siálico. Exemplos de análogos de ácido *N*-acil siálico incluem, mas não

estão limitados a, ácido *N*-azidoacetil-, *N*-levulinoil- e *N*-butanoil siálico.

Em algumas modalidades da presente invenção, um método de produção de um análogo de ácido *N*-acil siálico compreende as etapas de: fornecimento de um micróbio geneticamente manipulado, em que o micróbio compreende uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio que codifica um transportador de ácido siálico; uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio que codifica uma aldolase de ácido siálico; e uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, em que a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina; e cultura do micróbio na presença de um reagente, de modo que UDP-*N*-acilglicosamina intracelular é gerada. Quaisquer reagentes adequados podem ser usados, tal como qualquer fonte de carbono de *N*-acilglicosamina. De preferência, o reagente é um análogo de *N*-acilglicosamina. Uma aciltransferase pode também ser usada para facilitar a formação de um reagente ou a geração de UDP-*N*-acilglicosamina intracelular.

Vantagens da presente invenção são ilustradas pelos exemplos a seguir. Contudo, os materiais em particular e quantidades dos mesmos mencionadas nesses exemplos, bem como outras condições e detalhes, devem ser interpretados como se aplicando amplamente na técnica e não deverão ser construídos para restringir ou limitar indevidamente a invenção de qualquer forma.

Exemplo 1

Esse exemplo se refere à deleção de um gene chave de *E. coli*, *nanT*, para gerar um mutante de *E. coli nanT* porque *nanT*

é um transportador de ácido siálico e é responsável pela captação de ácido siálico.

Uma cepa de *E. coli* K-12 knockout para *nanT* MG1655, denominada FB21071 foi requerida do laboratório Biattner na University of Wisconsin, Madison, WI. Essa cepa tem uma inserção Tn5 no gene *nanT* que confere resistência à canamicina. Para permitir expressão do gene a partir de plasmídeos do promotor T7lac, um gene de RNA polimerase T7, sob o controle de um promotor lac, foi inserido no cromossoma de FB21071 usando o kit de lisogenização XDE3 (Novagen, San Diego, Califórnia) para gerar a cepa BRL01.

Exemplo 2

Esse exemplo se refere à via *neuBC* manipulada, conforme discutido supra, cuja expressão foi controlada por um promotor T7lac. Esse experimento descreve a introdução da via *neuBC* manipulada na cepa de *E. coli nanT⁻* BRL01 que possui um gene de RNA polimerase T7 lac-controlado.

Os genes *neuC* e *neuB* de *Neisseria meningitidis* do grupo B, os quais foram introduzidos na cepa de *E. coli nanT⁻* BRL01, conforme discutido acima, são genes biossintéticos de ácido siálico. NeuC é uma epimerase de hidrólise que converte UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), um metabólito comum em bactérias, em ManNAc. O gene *siaA*, envolvido na biossíntese de polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis* B, codifica a atividade de 2-epimerase de N-acilglicosamina-6-fosfato. ManNAc é substancialmente condensado com fosfenolpiruvato para gerar ácido siálico através de catálise de NeuB, conforme observado na Figura 2.

DNA genômico de *Neisseria meningitidis* ATCC® BAA-335D

foi usado para a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). DNA polimerase Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, Califórnia) e o termociclizador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) foram usados para todas as reações de PCR. Os genes *neuB* e *neuC* foram amplificados a partir de DNA genômico de *N. meningitidis* MC58 do grupo B através de PCR. As seqüências de primer com sítios de restrição manipulados (listados abaixo em negrito) usadas para clonagem dos genes *neuC* e *neuB*, foram usadas a 0,1 µl para as reações de PCR. Sítios de corte listados foram aqueles usados para clonar o respectivo gene no vetor pKH22. Os primers de *neuB* e *neuC* usados para PCR com sítios de restrição são como segue:

neuB (sítio de corte - NdeI/EcoRI)

cgcacatatgcaaaacaacaacgaatttaaattgg (dianteiro, SEQ

15 ID NO: 1)

cagcgaattccttattcaatatcagtttttttgatttgagca (reverso,

SEQ ID NO: 2)

neuC (sítio de corte - NheI/EcoRI)

cgcagctagcaaaaggattctttgcattacaggtacc (dianteiro, SEQ

20 ID NO: 3)

cagcgaattccttagtcataactggtggtacatt (reverso, SEQ ID

NO: 4)

PCR "touchdown" e "hotstart" foram realizadas para todas as amplificações e as condições do termociclizador foram como segue: um ciclo de 95 °C durante 5 min, 15 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 72-57 °C (-1 °C por ciclo) e 90 s a 72 °C, 15 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 57 °C e 90 s a 72 °C e um ciclo de 10 min a 72 °C.

Os produtos de PCR para *neuB* e *neuC* foram

clonados no pCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) seguindo as instruções do fabricante. Os genes clonados foram seqüenciados. Um sítio EcoRI interno em *neuB* foi removido através do kit de mutagênese sítio-dirigida Quikchange® (Qiagen, Valencia, Califórnia). Os genes foram subseqüentemente subclonados sob o promotor T7lac do vetor pKH22 para gerar o plasmídeo pBRL22 (*pKH22-neuBneuC*) usando técnicas de clonagem molecular padrões. Os plasmídeos têm marcadores de resistência à ampicilina.

O plasmídeo pBRL22 foi inserido na cepa de *E. coli nanT⁻* BRL01 para formar BRL01/pBRL22, onde os genes *neuC* e *neuB* foram superexpressos, usando métodos bem conhecidos e aceitos na técnica.

Embora se suponha que o hospedeiro *E. coli nanT⁻* BRL01 não seja capaz de catabolizar qualquer produto de ácido siálico em virtude de sua incapacidade de captar ácido siálico do meio, experimentos em frasco de agitação envolvendo BRL01/pBRL22 (BRL01/*neuBC*) produziram quantidades baixas, mas detectáveis de ácido siálico a 20 mg⁻¹ com uma única alimentação de GlcNAc a 0,5% como a fonte de alimentação de carbono.

Os baixos rendimentos foram atribuídos à degradação pela NanA endógena. Portanto, para aumentar os rendimentos de ácido siálico, o gene *nanA* em BRL01 foi deletado usando o sistema Lambda Red para gerar a cepa BRL02, conforme discutido no Exemplo a seguir.

Alternativamente, uma mutação de inativação no gene que codifica uma aldolase de ácido siálico (tal como uma mutação de inativação ou deleção do gene *nanA*) de outro micróbico (tal como outra cepa de *E. coli*) pode ser usada para produzir ácido siálico, em que o micróbico tem um transportador de ácido siálico funcional,

conforme discutido nos Exemplos 5 e 6.

Exemplo 3

Esse exemplo descreve a deleção do gene *nanaA* de BRL01 usando uma estratégia de substituição de gene para gerar a cepa BRL02 e a subsequente introdução do plasmídeo pBRL22 do Exemplo 2 em BRL02 para formar BRL02/pBRL22.

A geração de um mutante de *E. coli nanT⁻ nana⁻* é importante porque o gene *nanT* está envolvido na captação de ácido siálico e o gene *nanaA* está envolvido na degradação de ácido siálico. NanT é um transportador de ácido siálico e é responsável pela captação de ácido siálico, conforme notado supra e NanA é uma aldolase que cliva o ácido siálico em piruvato e *N*-acetilmanosamina (ManNAc). A remoção dos genes *nanaA* e *nanT* elimina o catabolismo de ácido siálico, conforme observado na Figura 2.

Para eliminar completamente a degradação de ácido siálico e aumentar a titulação de ácido siálico, o sistema Lambda Red foi usado para realizar knockout do gene *nanaA* de BRL01 a fim de gerar o mutante de *E. coli nanT⁻ nana⁻*, BRL02.

Resumidamente, um cassete que codifica resistência à tetraciclina foi amplificado a partir do vetor pBR322 (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts) usando os primers 5'-atggcaacgaatttacgtggegtaatggctgcactcctgactcctttgatcatgtttgacagctt atcatcgat-3' (SEQ ID No: 5) e 5'-tcaccgcgctcttgcacactgctgggcccagcgccttcagttctggcatccaattcttgagtg gtgaatccg-3' (SEQ ID No: 6). Os primers consistiam de homologia de 50 nt com *nanaA* (sublinhado) e 25 nt com o gene de resistência à tetraciclina (não sublinhado). As condições do termociclizador usadas são idênticas àquelas estabelecidas acima no Exemplo 2. O cassete de resistência à tetraciclina foi purificado em gel a

partir da reação de PCR e, então, concentrado através de precipitação com etanol. BRL01 transformado com pKD46, o qual abriga as proteínas Lambda Red necessárias para recombinação, foi crescido em meio de Luria-Bertani (LB) a 30 °C com agitação, 150 rpm, até uma OD₆₀₀ = 0,1. Expressão dos genes Lambda Red foi, então, induzida com arabinose a 0,1% e as células induzidas continuadas a crescer até uma OD₆₀₀ de 0,5 ser atingida. As células foram tornadas eletrocompetentes e transformadas com 100 ng de DNA por 50 µl de células do cassete de resistência à tetraciclina. As células transformadas foram recuperadas em LB durante 1 hora a 37 °C com agitação e, então, colocadas em LB suplementado com canamicina (50 µg ml⁻¹) e tetraciclina (10 µg ml⁻¹). Os transformantes foram selecionados com relação às deleções de *nanA* e *nanT* através de PCR.

O plasmídeo pBRL22 do Exemplo 2 foi inserido na cepa de *E. coli nanT-nanA*- BRL02 para formar BRL02/pBRL22, onde os genes *neuC* e *neuB* foram superexpressos, usando métodos bem conhecidos e aceitos na técnica.

Exemplo 4

Esse exemplo descreve experimentos em frasco de agitação com uma única alimentação envolvendo a cepa BRL02/pBRL22. A cepa BRL02/pBRL22 foi usada para selecionar estoques de alimentação de fonte de carbono incluindo glicerol, maltose, glicose, frutose e GlcNAc para a produção de ácido siálico. Para esses experimentos de uma única alimentação, uma única fonte de carbono inicial a 0,5% foi alimentada à cultura. As culturas foram crescidas durante 48 h pós-indução e as titulações de ácido siálico foram determinadas.

Meio mínimo F1 consistindo, por litro, de 6,62 g de

K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 4,0 g de NH_4SO_4 , 170,5 mg de $MgSO_4$ e fonte de carbono filtrada-esterilizada a 0,5%, conforme mencionado previamente, foi usado para todos os experimentos em frasco de agitação. Todos os meios foram suplementados com antibióticos
5 apropriados, a menos que de outro modo mencionado: canamicina ($50 \mu g ml^{-1}$), carbenicilina ($50 \mu g ml^{-1}$) e tetraciclina ($10 \mu g ml^{-1}$). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Por réplica, uma cultura de iniciação de 10 ml foi crescida em meio LB a $37^\circ C$ durante 18 h com agitação, 250 rpm. As células da cultura de
10 iniciação foram coletadas e diluídas em 50 ml de F1 em um frasco de Erlenmeyer de 250 ml. As culturas inoculadas foram crescidas a $30^\circ C$ com agitação, 150 rpm e foram induzidas com isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo a 0,1 mM (IPTG), quando sua $OD_{600} = 0,6-0,8$. As culturas induzidas foram crescidas durante 48 h e amostras de 1
15 ml foram tomadas em intervalos espaçados. As células foram removidas das amostras através de centrifugação e os sobrenadantes foram submetidos à ebulição durante 10 minutos.

A produção de ácido siálico foi confirmada através de NMR de prótons em D_2O usando um instrumento Bruker 300MHz. O ácido
20 siálico foi purificado do caldo de cultura através de remoção das células via centrifugação e, então, isolamento do ácido siálico no sobrenadante através de cromatografia de troca de íons, conforme descrito.

Os sobrenadantes em ebulição, conforme explicado,
25 foram quantificados com relação à atividade de ácido siálico através do ensaio de NanA/LDH. Resumidamente, as concentrações de ácido siálico foram determinadas usando o ensaio de aldolase de ácido siálico-dehidrogenase de lactato (NanA/LDH), conforme descrito. LDH foi adquirida da Roche (Penzberg, Alemanha) e NanA

foi isolada de *E. coli* recombinante. As absorvâncias foram medidas em um espectrofotômetro GENESYS 20 (Thermo Electron Corporation, Madison, Wisconsin). Descobriu-se que a faixa dinâmica do ensaio era de 0,035 a 0,002 mg ml⁻¹ (0,11 a 0,006 mmoles l⁻¹) de ácido siálico. As condições de reação consistiam de tampão de Tris a 100 mM (pH de 8,0), NaDH a 0,15 mM, 2,5 µg ml⁻¹ de LDH, 5 µg ml⁻¹ de NanA e 0,010-0,030 mg ml⁻¹ de ácido siálico. As reações foram realizadas com todos os componentes acima, exceto NanA, a 37 °C durante 1 hora. As absorvâncias iniciais a 340 nm foram, então, registradas. NanA foi, então, adicionado às reações e as reações foram incubadas a 37 °C durante 3 h. As absorvâncias finais foram medidas e as diferenças entre os valores da absorvância inicial e final foram adaptadas contra uma curva padrão para quantificar a concentração de ácido siálico nas amostras.

Os resultados desses experimentos de alimentação única são apresentados na Figura 3 e são como segue, em mg l⁻¹: GlcNAc, 103; glicose, 87; glicerol, 57; frutose, 40; maltose, 19.

A ausência de NanA aumentou a titulação 5 vezes, quando comparado com os resultados mencionados no Exemplo 2. Não surpreendentemente, GlcNAc, como estoque de alimentação, produziu a maior titulação de ácido siálico; GlcNAc intracelular é convertido em UDP-GlcNAc, um precursor importante da parede celular que é, conseqüentemente, o substrato da via *neuBC*.

Os estoques de alimentação mais baratos de frutose, glicerol e glicose não geram uma titulação tão alta quanto aquela de GlcNAc porque eles devem ser primeiro incorporados na via biossintética de GlcNAc, conforme observado na Figura 2. A biossíntese de GlcNAc em *E. coli* começa com a conversão de frutose em glicosamina através da ação da sintase de glicosamina GlmS, a

qual é a enzima chave no metabolismo de GlcNAc. Assim, o Exemplo a seguir se refere à co-superexpressão do gene *glmS* de *E. coli* na via *neuBC*.

Exemplo 5

5 Esse exemplo descreve a construção dos reagentes requeridos para a produção de ácido siálico em *E. coli* expressando NanT funcional e carecendo de NanA funcional. O gene que codifica o transportador de ácido siálico, NanT, foi amplificado a partir do DNA genômico de *E. coli* XL1Blue através de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os primers usados para PCR foram 5'-
10 GACGCATATGGGCATCGCCACCG-3' (SEQ ID No: 7) e 5'-GACGTAACTTTTGGTTTTGACTAAATCGT-3' (SEQ ID No: 8). O sítio *NdeI* introduzido é indicado em itálico. O produto de PCR de *nanT* amplificado foi purificado em gel e clonado no pCR-Blunt
15 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante para gerar o plasmídeo pBRL50. O sítio interno *EcoRI* em *nanT* foi removido usando QuikChange para gerar o plasmídeo pBRL54. O gene *nanT* foi subseqüentemente clonado nos sítios *Nde I* e *EcoR I* do pKH22 usando procedimentos de clonagem molecular padrões para gerar o plasmídeo
20 pBRL55. O plasmídeo pBRL55 foi digerido com *Avr II* e *Xba I* e o fragmento *Avr II-Xba I* de *nanT* foi clonado na direção dianteira no sítio *Avr II* do pBRL47. Isso gerou o plasmídeo pBRL57, o qual codifica um transcrito policistrônico (direção 5'-3') *neuB-neuC-glmS-nanT*.

25 Exemplo 6

Esse exemplo descreve a produção de ácido siálico em *E. coli* expressando NanT funcional e carecendo de NanA funcional. Células BRL02/pBRL47 ou BRL02/pBRL57 foram crescidas em 50 mL de meio mínimo F1 suplementado com 50 µg mL⁻¹ de carbenicilina, 50 µg

mL⁻¹ de canamicina, 10 µg mL⁻¹ de tetraciclina e glicose a 0,5% (peso/v) em um frasco de agitação de 250 mL a 30 °C/150 r.p.m. Quando as densidades ópticas (OD₆₀₀) eram de 0,7-0,9 AU, as culturas foram induzidas com IPTG a 0,1 mM e deixadas crescer durante 72 h. Doses adicionais de glicose a 0,5% (peso/v) foram adicionadas a t = 0, 12, 24, 36 e 48 h pós-indução. Periodicamente, amostras foram extraídas e avaliadas com relação à titulação de ácido siálico através do ensaio de NanA/LDH estabelecido. Resumidamente, as células foram removidas através de centrifugação e o sobrenadante foi submetido à ebulição durante 10 min e subseqüentemente avaliado.

Células BRL02/pBRL57 geraram uma titulação de ácido siálico de 315 mg L⁻¹ de ácido siálico, enquanto que células BRL02/pBRL47 proporcionaram uma titulação média de 568 mg L⁻¹. Em contraste, o ácido siálico por peso úmido de célula foi maior para células BRL02/pBRL57, 515 mg (mg de peso úmido de célula)⁻¹ do que aquele de BRL02/pBRL47, 64 mg (mg de peso úmido de célula)⁻¹.

Exemplo 7

Esse exemplo descreve a manipulação do gene de sintase de glicosamina, *glmS*, de *E. coli* na via *neuBC*. Em particular, esse experimento se refere à co-superexpressão do gene de sintase de glicosamina, *glmS*, de *E. coli* (amplificado através de PCR e clonado em pBRL22 para gerar o plasmídeo pBRL47) para aumentar o rendimento de ácido siálico a partir de estoques de alimentação de açúcar de baixo custo, incluindo glicose e frutose. GlmS é a enzima chave na biossíntese de UDP-GlcNAc, o substrato da via *neuBC* e espera-se que superexpressão de *glmS* direcione mais do açúcar de estoque de alimentação disponível para a biossíntese de UDP-GlcNAc.

Esse exemplo incorpora os métodos e materiais do Exemplo 2 com relação à amplificação e clonagem dos genes *neuB* e *neuC* para gerar o plasmídeo pBRL47 (*pKH22-neuBneuCglmS*), junto com o seguinte: DNA genômico de *Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, Califórnia) foi usado para PCR. DNA polimerase Pfu Turbo® (Stratagene, La Jolla, Califórnia) e o termociclizador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) foram usados para todas as reações de PCR. O gene *glmS* foi amplificado a partir de DNA genômico de *E. coli* através de PCR. As seqüências de primer com sítios de restrição manipulados (listados abaixo em **negrito**) usados para clonagem do gene *glmS* foram usados a 0,1 µM para as reações de PCR. Sítios de corte listados foram aqueles usados para clonar o respectivo gene em pKH22. Os primers *glmS* usados para PCR com sítios de restrição são como segue:

glmS (sítio de corte - NdeI/EcoRI)
gcgccatattgtgtggaattggtggcgcg (dianteiro, SEQ ID NO: 9)
gcgcggaattcttactcaaccgtaaccgattttgc (reverso, SEQ ID NO: 10)

PCR "touchdown" e "hotstart" foram realizadas para todas as amplificações e as condições do termociclizador foram como segue: um ciclo de 95 °C durante 5 min, 15 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 72-57 °C (-1 °C por ciclo) e 90 s a 72 °C, 15 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 57 °C e 90 s a 72 °C e um ciclo de 10 min a 72 °C. Os genes clonados foram seqüenciados. Os genes foram subseqüentemente subclonados sob o promotor T7lac do vetor pKH22 para gerar o plasmídeo pBRL47 (*pKH22-neuBneuCglmS*) usando técnicas de clonagem molecular padrões. Uma vez que o plasmídeo pBRL47 codifica um transcrito *neuBneuCglmS* de um promotor T7lac, ele

requer uma RNA polimerase T7 funcional para transcrição. Os plasmídeos têm marcadores de resistência à ampicilina.

O plasmídeo pBRL47 foi inserido na cepa de *E. coli* *nanT⁻ nanA⁻* BRL02 para formar BRL02/pBRL47, onde o gene *glmS* foi co-superexpresso com os genes *neuC* e *neuB*, usando métodos bem conhecidos e aceitos na técnica.

Exemplo 8

Todos os materiais e métodos descritos no Exemplo 4 são incorporados aqui, exceto que apenas experimentos em frasco de agitação com uma única alimentação envolvendo a cepa BRL02/pBRL47 foram realizados com frutose como a fonte de carbono.

Os resultados mostram que experimentos com uma única alimentação de frutose de BRL02/pBRD47 geraram uma titulação de ácido siálico de 130 mg l⁻¹. Conseqüentemente, com a adição de *glmS* à via manipulada, um aumento de 3 vezes na produção de ácido siálico, de 40 para 130 mg l⁻¹, foi observado para a alimentação de frutose.

Uma vez que a alimentação de frutose produziu uma titulação de ácido siálico significativamente menor do que aquela da glicose no Exemplo 4 (veja Figura 3), a cepa BRL02/pBRL47 para produção de ácido siálico foi, portanto, otimizada com múltiplas alimentações de glicose (mesmo embora a glicose deva ser primeiro convertida em frutose via gliconeogênese). Conforme observado na Figura 4, a produção de ácido siálico foi otimizada para 1,5 gramas por litro com a alimentação de glicose sob condições no frasco de agitação. A produção de ácido siálico foi medida através do ensaio de NanA/LDH (linha pontilhada). O crescimento foi monitorado através de medição da densidade óptica a 600 nm ou OD₆₀₀ (linha sólida). Células *BRW2/neuBCglmS* foram alimentadas com glicose a 0,5% e hidróxido de amônio (indicado por marcadores) a

0, 12, 24, 36 e 48 h pós-indução. A produção de ácido siálico continuou a aumentar durante o curso do experimento, enquanto que o crescimento cessou a 48 h pós-indução. Esse quadro sugere que as células de *E. coli* manipuladas eram capazes de produzir continuamente ácido siálico se os requisitos de crescimento são reunidos.

Exemplo 9

Esse exemplo descreve apenas experimentos em frasco de agitação de uma única alimentação envolvendo a cepa BRL02/pBRL47 com glicose como a fonte de alimentação de carbono. Espera-se que uma titulação de ácido siálico comparável, através de alimentações únicas de glicose, àquela listada no Exemplo 6 seja produzida. Os mesmos materiais e métodos foram seguidos e usados aqui conforme no Exemplo 6, incluindo os experimentos em frasco de agitação, confirmação da produção de ácido siálico e medição da concentração de ácido siálico, exceto conforme observado no parágrafo a seguir.

A produção de ácido siálico foi otimizada para BRL02/pBRL47 através de múltiplas alimentações de glicose como o estoque de alimentação de fonte de carbono. Doses de glicose a 0,5% e hidróxido de amônio foram adicionadas a 0, 12, 24, 36 e 48 h pós-indução e as células BRL02/pBRL47 induzidas foram crescidas durante 98 h (em oposição a 48 h, conforme discutido no Exemplo 4) e as titulações de ácido siálico foram determinadas. O hidróxido de amônio serviu para manter o pH em 6,9-7,1 e como uma fonte de nitrogênio.

Os resultados desses exemplos envolvendo células BRL02/pBBIA7(*neuBCgImS*) com as múltiplas alimentações de glicose indicaram uma titulação máxima ou otimizada de ácido siálico de 1,5 g l⁻¹. Ainda, esse resultado foi obtido com um total de seis

alimentações de glicose a 0,5% (30,0 g de glicose por 1,5 g de ácido siálico), conforme observado na Figura 4. Esse resultado mostra que a co-superexpressão de *glmS* com *neuBC* em BRL02 aumentou a produção de ácido siálico 3 vezes a partir de estoques de
5 alimentação de açúcar de baixo custo.

Essa titulação era comparável àquela obtida a partir de um experimento similar usando BRL02/pBRL22(*neuBC*) com múltiplas alimentações de GlcNAc, as quais produziram uma titulação de 1,4 g l⁻¹.

10 Exemplo 10

Esse exemplo envolve a produção de ácido *N*-butanoil siálico, um análogo de ácido siálico. Para produzir ácido *N*-butanoil siálico, uma *N*-butanoilglicosamina foi primeiro sintetizada. Hidrocloreto de glicosamina (5,0 g, 23 mmoles, 1,0
15 equivalente) e trietilamina (16 mL, 115 mmoles, 4,8 equivalente) foram suspensos em DMF (48 mL) em temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada durante 30 minutos, no qual anidrido butírico (4,5 mL, 27 mmoles, 1,2 equivalente) foi adicionado gota a gota. A reação foi agitada durante 18 h em temperatura ambiente.
20 Acetato de etila e hexano (800 mL, 1:3 v:v) foram adicionados para precipitar o produto. A mistura foi agitada durante 30 minutos, filtrada e o sólido foi repetidamente lavado com hexano. O sólido foi dissolvido em metanol (200 mL), filtrado e seco sob vácuo para proporcionar 5,1 g (20 mmoles, rendimento de 87%) de uma mistura a
25 1:1 de anômeros $\alpha:\beta$ de *N*-butanoil glicosamina.

A produção de ácido *N*-butanoil siálico a partir de BRL02/pBRL47 foi realizada conforme descrito nos experimentos em frasco de agitação anteriores e foi otimizada através de múltiplas alimentações de glicerol a 0,3% e *N*-butanoilglicosamina a 0,3% ou

N-acetilglicosamina (controle negativo). Doses de estoque de alimentação e hidróxido de amônio foram adicionadas a 0, 12, 24, 36, e 48 horas pós-indução e células BRL02/pBRL47 induzidas foram crescidas durante 98 horas. O hidróxido de amônio serviu para
5 manter o pH em 6,9 - 7,1 e como uma fonte de nitrogênio. As titulações combinadas de ácido siálico e ácido *N*-butanoil siálico foram determinadas através do ensaio de NanA/LDH. A titulação média combinada a partir de alimentações de *N*-butanoilglicosamina foi de 67 ± 26 mg/L. A titulação média combinada a partir de
10 alimentações de *N*-acetilglicosamina foi de 822 ± 23 mg/L.

Exemplo 11

Esse exemplo descreve a construção de uma cepa de *E. coli* que não possui enzimas NanT, NanA e NagA funcionais. O gene *nagA* em BRL02 foi deletado usando o sistema de recombinase Red. Um
15 cassete de cloranfenicol foi amplificado a partir do plasmídeo pKD3 via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) usando os primers 5'-ATGTATGCATTAACCCAGGGCCGGATCTTTACCGCCACGAATTTCTTGAGTGTAGGCTGG
AGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 11) e 5'-TTATTGAGTTACGACCTCGTTACCGTTAACGATGGTCTTGGTGATTTTAACATATGAATATCCTCCTTAG (SEQ ID No: 12). Os
20 primers consistiam de sítios de priming a pKD3 (itálico) e homologia de 50 ao *nagA*. O cassete amplificado por PCR foi purificado em gel, concentrado através de precipitação e suspenso em tampão de Tris a 10 mM, pH de 8,0 até uma concentração de 40 ng μL^{-1} . Aproximadamente 80 ng do cassete de cloranfenicol foram
25 submetidos à eletroporação em células BRL02/pKD46, as quais foram preparadas de acordo com o procedimento na literatura. Clones resistentes ao cloranfenicol foram selecionados e separados através de PCR para substituição no locus *nagA*; isso gerou a cepa BRL03. Remoção do marcador cloranfenicol em BRL03 foi realizada

através de transformação com o plasmídeo pCP20, o qual codifica uma recombinase FLP. Os transformantes foram selecionados com relação à resistência à ampicilina e não resistência ao cloranfenicol. Células BRL03/pCP20 foram purificadas em colônia a 5 43° C durante 18 h. Os clones foram testados com relação à sensibilidade ao cloranfenicol e selecionados através de PCR para remoção do marcador cloranfenicol. A remoção do marcador cloranfenicol gerou a cepa *nagA*⁻ BRL04.

Exemplo 12

10 Esse exemplo descreve a produção de ácido siálico a partir de uma cepa de *E. coli* que não possui enzimas NanT, NanA e NagA funcionais. Esse trabalho demonstra que sub regulação da via *nag* pode ser usada para otimizar a titulação de ácido siálico e produtividade de ácido siálico por tempo unitário por célula.

15 Células BRL04 foram transformadas com pBRL47, o qual codifica o transcrito policistrônico *neuB-neuC-glms*. Experimentos de produção de ácido siálico foram conduzidos em triplicata. Células BRL4/pBRL47 foram crescidas em 2 mL de meio mínimo F2 suplementado com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, 50 µg mL⁻¹ de canamicina, 10 µg mL⁻¹

20 de tetraciclina e glicose a 0,5% (peso/v) em um tubo de ensaio estéril de 16 x 125 mm. O meio mínimo F2 é idêntico ao meio mínimo F1, exceto que o primeiro tem duas vezes a concentração de tampão de fosfato. As culturas foram crescidas durante 6 h, induzidas com IPTG a 0,5 mM e crescidas durante 36 h. As titulações de ácido

25 siálico foram determinadas a partir de sobrenadantes isentos de célula via o ensaio de NanA/LDH. Células BRL04/pBRL47 geraram uma titulação média de 0,46 g L⁻¹ de ácido siálico por litro de caldo de cultura.

Reivindicações

1. Micróbio geneticamente manipulado, caracterizado pelo fato que compreende:

uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio, onde a primeira molécula de DNA codifica um transportador de ácido siálico;

uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio, onde a segunda molécula de DNA codifica uma aldolase de ácido siálico; e

uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, onde a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina.

2. Micróbio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, onde a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-*N*-acetilglicosamina.

3. Micróbio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende uma molécula de DNA recombinante ou uma mutação em uma molécula de DNA no percurso glm ou nag que proporciona maiores níveis de UDP-GlcNAc quando comparado com uma cepa do tipo selvagem.

4. Micróbio de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende uma molécula de DNA recombinante de codificação de uma sintase de glucosamina.

5. Micróbio de acordo com a reivindicação 4,

caracterizado pelo fato que a molécula de DNA recombinante de codificação de uma sintase de glucosamina é um gene *glmS*.

6. Micróbio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o micróbio é *E. coli*.

5 7. Micróbio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que as mutações de inativações estão nos genes *nanT* e *nanA*.

8. Micróbio de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato que a primeira e a segunda molécula de DNA recombinante de codificações de enzimas estão nos genes *neuC* e *neuB*.
10

9. Micróbio de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato que os genes *neuC* e *neuB* se originam a partir de *Neisseria meningitidis*.

15 10. Micróbio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o micróbio é capaz de transportar ácido siálico para fora da célula.

11. Método para a formação de um micróbio geneticamente manipulado para a produção de ácido siálico, caracterizado pelo fato que compreende as etapas de:
20

introduzir uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA de codificação de um transportador de ácido siálico no micróbio;

introduzir uma mutação de inativação em uma segunda
25 molécula de DNA de codificação de um aldolase de ácido siálico no micróbio; e

introduzir uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, onde a referida primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma
30 enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de

ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-N-acetilglucosamina.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende a etapa de introduzir uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, onde a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-N-acetilglucosamina.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende a etapa de introduzir uma molécula de DNA recombinante ou uma mutação em uma molécula de DNA no percurso glm ou nag que proporciona maiores níveis de UDP-GlcNAc quando comparado com uma cepa do tipo selvagem.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato que adicionalmente compreende a etapa de introduzir uma molécula de DNA recombinante de codificação de uma sintase de glucosamina no micróbio.

15. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato que o micróbio é *E. coli*.

16. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato que o micróbio é capaz de transportar ácido siálico para fora da célula.

17. Método para a produção de ácido siálico, caracterizado pelo fato que compreende as etapas de proporcionar um micróbio geneticamente manipulado, onde o micróbio compreende uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio que codifica um transportador de ácido siálico; uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio que codifica um aldolase de ácido siálico; e uma primeira molécula

de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, onde a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma UDP-N-acetilglucosamina 2-
5 epimerase; e

cultivar o micróbio na presença de uma fonte de carbono.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato que o micróbio adicionalmente compreende
10 uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima que codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma 2-epimerase de UDP-N-acetilglucosamina.

19. Método de acordo com a reivindicação 17,
15 caracterizado pelo fato que o micróbio adicionalmente compreende uma molécula de DNA recombinante ou uma mutação em uma molécula de DNA no percurso glm ou nag que proporciona maiores níveis de UDP-GlcNAc quando comparado com uma cepa do tipo selvagem.

20. Método de acordo com a reivindicação 19,
20 caracterizado pelo fato que o micróbio adicionalmente compreende uma molécula de DNA recombinante de codificação de uma sintase de glucosamina.

21. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato que o micróbio é *E. coli*.

25 22. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato que o micróbio é capaz de transportar ácido siálico para fora da célula.

23. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato que a fonte de carbono é selecionada a
30 partir do grupo consistindo de glucose, glicerol, frutose e N-

acetilglucosamina.

24. Micróbio geneticamente manipulado, caracterizado pelo fato que compreende:

5 uma mutação de inativação em uma molécula de DNA no micróbio, onde a molécula de DNA codifica um aldolase de ácido siálico;

10 uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, onde a primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma sintase de ácido siálico; e

uma segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima, onde a segunda molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma 2-epimerase de UDP-N-acetilglucosamina.

15 25. Método para a produção de um análogo de ácido siálico N-acil caracterizado pelo fato que compreende as etapas de:

20 proporcionar um micróbio geneticamente manipulado, onde o micróbio compreende uma mutação de inativação em uma primeira molécula de DNA no micróbio que codifica um transportador de ácido siálico;

uma mutação de inativação em uma segunda molécula de DNA no micróbio que codifica um aldolase de ácido siálico; e

25 uma primeira molécula de DNA recombinante de codificação de enzima no micróbio, onde a first molécula de DNA recombinante de codificação de enzima codifica uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo de uma sintase de ácido siálico e uma UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase; e

30 cultivar o micróbio na presença de um reagente de tal modo que uma UDP-N-acilglucosamina intracelular é gerada.

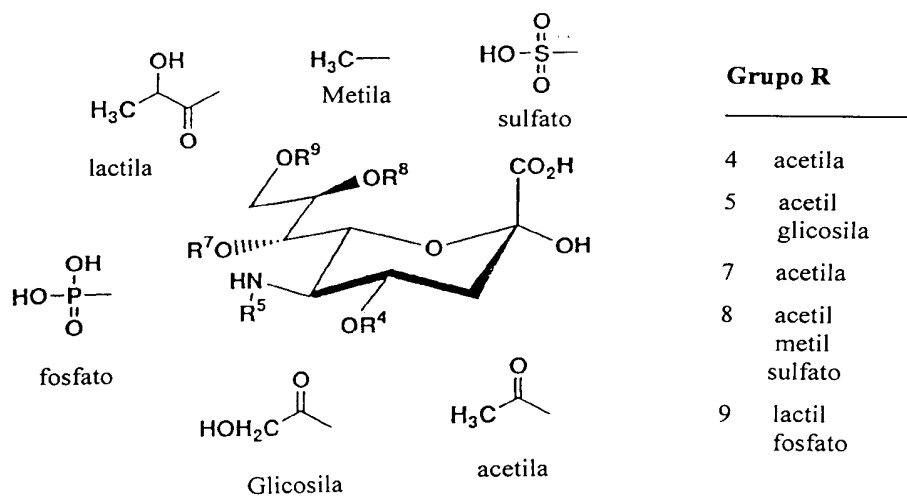


FIG. 1

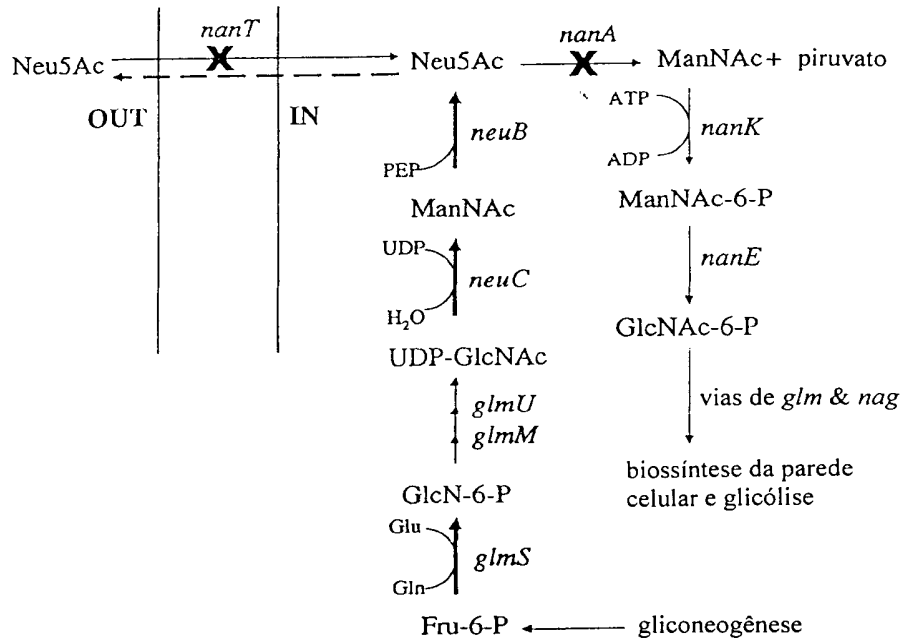


FIG. 2

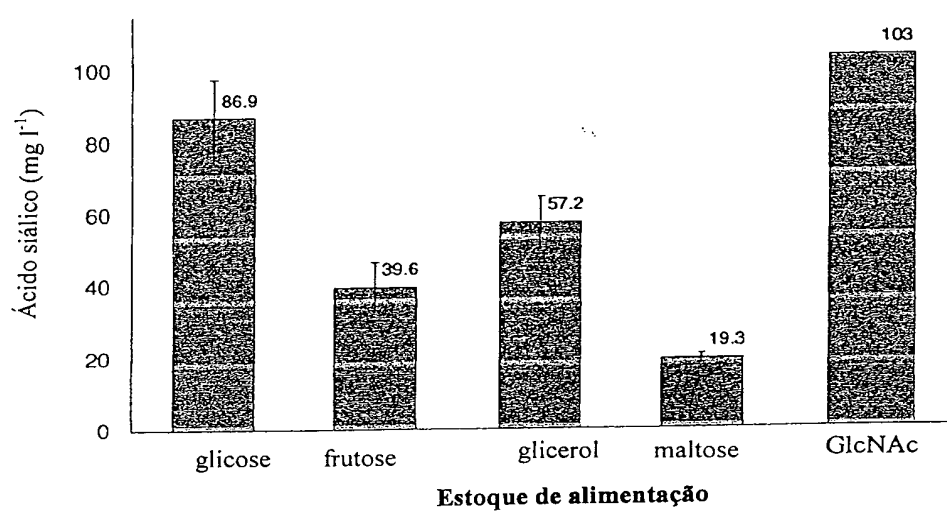


FIG. 3

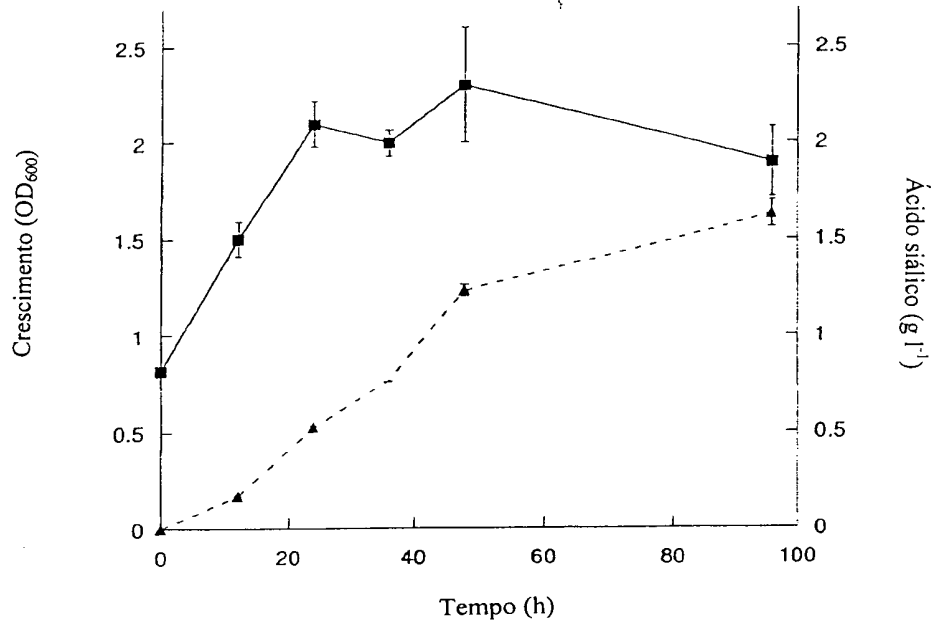


FIG. 4

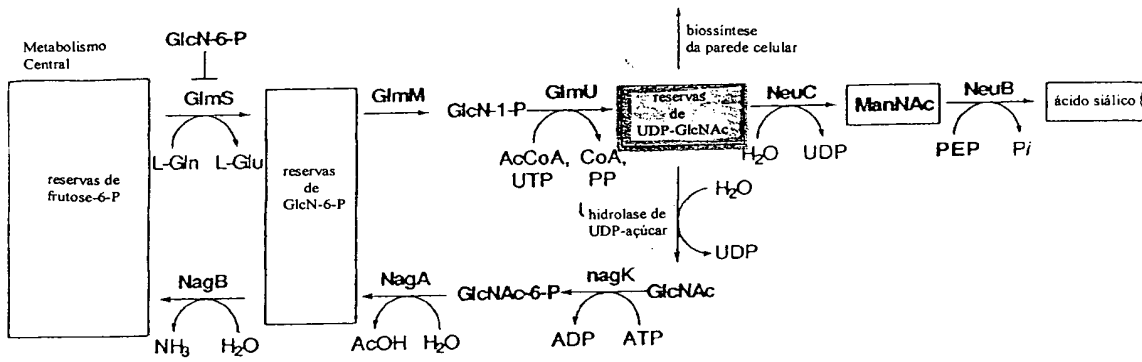


FIG. 5

