

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 260**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2020** **E 20190203 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023** **EP 3954778**

54 Título: **Producción de una mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados por una célula**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2024

73 Titular/es:

INBIOSE N.V. (100.0%)
Technologiepark 82, bus 41
9052 Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

AESAERT, SOFIE;
BEAUPREZ, JOERI y
PETERS, GERT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 966 260 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

Producción de una mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados por una célula

La presente invención se encuentra en el campo técnico de la biología sintética y la ingeniería metabólica. Más particularmente, la presente invención se encuentra en el campo técnico de la fermentación de células modificadas metabólicamente. La presente invención describe una célula modificada metabólicamente para la producción de una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes por una célula. También se describe la purificación de al menos uno de dichos oligosacáridos a partir del cultivo.

Antecedentes

Los oligosacáridos, a menudo presentes como formas glicoconjugadas a proteínas y lípidos, están involucrados en muchos fenómenos vitales tales como procesos de diferenciación, desarrollo y reconocimiento biológico relacionados con el desarrollo y el progreso de la fertilización, la embriogénesis, la inflamación, la metástasis y la adhesión del patógeno del huésped. Los oligosacáridos también pueden estar presentes como glicanos no conjugados en los fluidos corporales y la leche humana, en los que también modulan importantes procesos inmunológicos y de desarrollo (Bode, Early Hum. Dev. 1-4 (2015); Reily et al., Nat. Rev. Nephrol. 15, 346-366 (2019); Varki, Glycobiology 27, 3-49 (2017)). Existe un gran interés científico y comercial en las mezclas de oligosacáridos debido al amplio espectro funcional de los oligosacáridos. Sin embargo, la disponibilidad de mezclas de oligosacáridos es limitada ya que la producción se basa en la síntesis química o quimioenzimática o en la purificación a partir de fuentes naturales tales como, por ejemplo, la leche animal. Los procedimientos de síntesis química son laboriosos y requieren mucho tiempo y, debido a la gran cantidad de etapas involucradas, son difíciles de llevar a mayor escala. Los enfoques enzimáticos que utilizan glicosiltransferasas ofrecen muchas ventajas sobre la síntesis química. Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de un resto de azúcar desde un azúcar nucleotídico donador activado a aceptores sacáridos o no sacáridos (Coutinho et al., J. Mol. Biol. 328 (2003) 307-317). Estas glicosiltransferasas son la fuente para que los biotecnólogos sinteticen oligosacáridos y se utilizan tanto en enfoques (quimio)enzimáticos como en sistemas de producción basados en células. No obstante, la estereoespecificidad y la regioselectividad de las glicosiltransferasas siguen representando un desafío formidable. Además, los enfoques quimioenzimáticos necesitan regenerar *in situ* los donadores de azúcares nucleotídicos. La producción celular de oligosacáridos precisa un control estricto de la disponibilidad espaciotemporal de niveles adecuados de donadores de azúcares nucleotídicos en las proximidades de glicosiltransferasas complementarias. Debido a estas dificultades, los procedimientos actuales a menudo dan como resultado la síntesis de un único oligosacárido en lugar de una mezcla de oligosacáridos.

Priem et al. (Glycobiology 12, páginas 235-240 (2002)) describe una cepa de *E. coli* recombinante que expresa una beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (gen lgtA) y una beta-1,4-galactosiltransferasa (gen lgtB), ambas enzimas derivadas de *Neisseria meningitidis*. Tras la administración de lactosa, dicha cepa de *E. coli* produce lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-neohexaosa (LNnH) y lacto-N-neooctaosa (LNnO). Además, el documento EP2722394 A1 describe una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expresa una enzima con actividad de beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (gen nagA de *Aspergillus niger*) y una enzima con actividad de beta-galactosiltransferasa (gen lacZ de *Streptococcus thermophilus*). Tras la administración de lactosa y la lisis de dicha cepa, se producen lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa. Un objeto de la presente invención es proporcionar herramientas y procedimientos mediante los que pueda producirse una mezcla de oligosacáridos que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes por medio de una célula de una forma eficaz, y también eficaz en términos de costes y tiempo, y si es necesario, un proceso continuo. Según la invención, este y otros objetos se logran proporcionando una célula y un procedimiento para la producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes en el que la célula está modificada genéticamente para la producción de dichos oligosacáridos.

Descripción

Sorprendentemente se ha descubierto ahora que es posible producir mezclas de oligosacáridos que contienen al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes por medio de una única célula. La presente invención proporciona una célula modificada metabólicamente y un procedimiento para la producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar una célula que expresa al menos tres glicosiltransferasas y que es capaz de sintetizar (un) azúcar(es) nucleotídico(s) que es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas cultivando dicha célula en condiciones permisivas para producir dicha mezcla de oligosacáridos. Preferentemente, dicho procedimiento comprende separar al menos uno de dichos oligosacáridos de la mezcla neutra de oligosacáridos no fucosilados. Además, la presente invención proporciona una célula modificada metabólicamente para la producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes.

Definiciones

Las palabras utilizadas en la presente memoria descriptiva para describir la invención y sus diversas formas de realización deben entenderse no solo en el sentido de sus significados comúnmente definidos, sino que incluyen por definición especial en la estructura de la presente memoria descriptiva material o actos que superan el alcance de los significados comúnmente definidos. Por lo tanto, si se puede entender un elemento en el contexto de la presente memoria descriptiva de una forma que incluya más de un significado, entonces su uso en una reivindicación debe entenderse como genérico para todos los significados posibles respaldados por la memoria descriptiva y por la propia palabra.

Las diversas formas de realización y aspectos de las formas de realización de la invención divulgadas en el presente documento deben entenderse no solo en el orden y contexto específicamente descritos en la presente memoria descriptiva, sino que incluyen cualquier orden y cualquier combinación de los mismos. Cuando el contexto lo requiera, se considerará que todas las palabras utilizadas en singular incluyen el plural y viceversa. A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos descritos en el presente documento son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Generalmente, las etapas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante.

En las reivindicaciones que siguen a la presente memoria descriptiva, los caracteres de referencia utilizados para designar etapas de la reivindicación se proporcionan únicamente para facilitar la descripción y no pretenden implicar ningún orden particular para realizar las etapas.

Según la presente invención, el término "polinucleótido(s)" generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. "Polinucleótido(s)" incluye, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias o regiones monocatenarias, bicatenarias y tricatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser regiones monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, "polinucleótido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas de dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más moléculas, pero más normalmente involucran solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido(s)" también incluye ADN o ARN tal como se han descrito anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por motivos de estabilidad o por otros motivos son "polinucleótido(s)" según la presente invención. Además, deben entenderse abarcados por el término "polinucleótidos" los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como, por ejemplo, inosina, o bases modificadas, tales como, por ejemplo, bases tritiladas. Se apreciará que se han realizado una gran diversidad de modificaciones en el ADN y el ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal como se emplea en el presente documento, abarca tales formas de polinucleótidos modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluidas, por ejemplo, células simples y complejas. El término "polinucleótido(s)" también abarca polinucleótidos cortos a los que a menudo se hace referencia como oligonucleótido(s).

"Polipéptido(s)" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido(s)" se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a cadenas más largas generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. "Polipéptido(s)" incluye aquellos modificados mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, pero también mediante técnicas de modificación química. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación, y son bien conocidas por el experto. El mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grado variable en varios sitios de un polipéptido determinado. Además, un polipéptido determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier parte de un polipéptido, incluida la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxi. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, selenoilación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares

ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraduccionales y también pueden elaborarse mediante procedimientos completamente sintéticos.

La expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido", tal como se utiliza en el presente documento, abarca polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido de la invención. El término también abarca polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidas por un fago integrado o una secuencia de inserción o edición) junto con regiones adicionales que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" a partir de su estado natural, es decir, si es de origen natural, se ha cambiado o se ha retirado de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales que coexisten con el mismo en su estado natural está "aislado", tal como se emplea el término en el presente documento. De forma similar, una secuencia "sintética", tal como se utiliza el término en el presente documento, significa cualquier secuencia que se haya generado sintéticamente y no se haya aislado directamente de una fuente natural. "Sintetizado", tal como se utiliza el término en el presente documento, significa cualquier secuencia generada sintéticamente y no aislada directamente de una fuente natural.

Los términos "recombinante" o "transgénico" o "modificado metabólicamente" o "modificado genéticamente", tal como se utilizan en el presente documento con referencia a una célula o célula huésped, se usan indistintamente e indican que la célula replica un ácido nucleico heterólogo, o expresa un péptido o proteína codificada por un ácido nucleico heterólogo (es decir, una secuencia "extraña a dicha célula" o una secuencia "extraña a dicha ubicación o entorno en dicha célula").

Se describe que dichas células se transforman con al menos un gen heterólogo o exógeno, o se describe que se transforman mediante la introducción de al menos un gen heterólogo o exógeno. Las células modificadas metabólicamente, recombinantes o transgénicas pueden contener genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener genes que se encuentran en la forma nativa de la célula, en las que los genes se modifican y se reintroducen en la célula por medios artificiales. Los términos también abarcan células que contienen un ácido nucleico endógeno a la célula que se ha modificado o su expresión o actividad se ha modificado sin retirar el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución de genes, sustitución de un promotor; mutación específica de sitio; y técnicas relacionadas. En consecuencia, un "polipéptido recombinante" es aquel que se ha producido por una célula recombinante. Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", tal como se utiliza en el presente documento, es aquella que se origina a partir de una fuente extraña a la célula particular (por ejemplo, de una especie diferente) o, si proviene de la misma fuente, está modificada con respecto a su forma o lugar original en el genoma. Por lo tanto, un ácido nucleico heterólogo operativamente unido a un promotor proviene de una fuente diferente de aquella de la que se ha derivado el promotor o, si es de la misma fuente, está modificado con respecto a su forma o lugar original en el genoma. La secuencia heteróloga puede introducirse de forma estable, por ejemplo mediante transfección, transformación, conjugación o transducción, en el genoma de la célula del microorganismo huésped, pudiendo aplicarse técnicas que dependerán de la célula y de la secuencia que se quiera introducir. Un experto en la técnica conoce varias técnicas que se divulgan, por ejemplo, por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). El término célula o microorganismo "mutante", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a una célula o microorganismo que está modificado genéticamente.

El término "endógeno", dentro del contexto de la presente invención, se refiere a cualquier secuencia de polinucleótido, polipéptido o proteína que sea una parte natural de una célula y se presente en su ubicación natural en el cromosoma celular. El término "exógeno" se refiere a cualquier secuencia de polinucleótido, polipéptido o proteína que se origina fuera de la célula en estudio y no es una parte natural de la célula o que no se encuentra en su ubicación natural en el cromosoma o plásmido celular.

El término "heterólogo" cuando se utiliza con referencia a un polinucleótido, gen, ácido nucleico, polipéptido o enzima se refiere a un polinucleótido, gen, ácido nucleico, polipéptido o enzima que es de una fuente, o se deriva de una fuente, distinta de la especie del organismo huésped. Por el contrario, un polinucleótido, gen, ácido nucleico, polipéptido o enzima "homólogo" se utiliza en el presente documento para indicar un polinucleótido, gen, ácido nucleico, polipéptido o enzima que se deriva de la especie del organismo huésped. Cuando se hace referencia a una secuencia reguladora génica o a una secuencia de ácido nucleico auxiliar utilizada para mantener o manipular una secuencia génica (por ejemplo, un promotor, una región 5' no traducida, una región 3' no traducida, una secuencia de adición de poli A, una secuencia de intrón, un sitio de empalme, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de entrada al ribosoma interno, una región de homología del genoma, un sitio de recombinación, etc.), "heterólogo" significa que la secuencia reguladora o la secuencia auxiliar no está asociada de forma natural con el gen con el que la secuencia de ácido nucleico reguladora o auxiliar está yuxtapuesta en un constructo, genoma, cromosoma o episoma. Por lo tanto, un promotor unido operativamente a un gen al que no está unido operativamente en su estado natural (es decir, en el genoma de un organismo no modificado genéticamente) se denomina en el presente documento "promotor heterólogo", incluso aunque el promotor pueda derivarse de la misma especie (o, en algunos casos, del mismo organismo) que el gen al que está unido.

El término "actividad modificada" de una proteína o una enzima se refiere a un cambio en la actividad de la proteína o la enzima en comparación con la actividad de tipo silvestre, es decir, natural, de dicha proteína o enzima. Dicha actividad modificada puede ser una actividad abolida, alterada, reducida o retardada de dicha proteína o enzima en comparación con la actividad de tipo natural de la proteína o la enzima, pero también puede ser una actividad acelerada o mejorada de dicha proteína o enzima en comparación con la actividad de tipo silvestre de la proteína o la enzima. Una actividad modificada de una proteína o una enzima se obtiene mediante la expresión modificada de dicha proteína o enzima o se obtiene mediante la expresión de una forma modificada, es decir, mutante de la proteína o enzima. Una actividad modificada de una enzima se refiere además a una modificación en la constante de Michaelis aparente K_m y/o la velocidad máxima aparente ($V_{m\acute{a}x}$) de la enzima.

El término "expresión modificada" de un gen se refiere a un cambio en la expresión en comparación con la expresión de tipo silvestre de dicho gen en cualquier fase del proceso de producción de la proteína codificada. Dicha expresión modificada es una expresión más baja o más alta en comparación con el tipo silvestre, en la que el término "expresión más alta" también se define como "sobreexpresión" de dicho gen en el caso de un gen endógeno o "expresión" en el caso de un gen heterólogo que no está presente en la cepa de tipo silvestre. La expresión más baja o expresión reducida se obtiene mediante tecnologías comunes bien conocidas por un experto (tales como el uso de ARNⁱ, CrispR, CrispRi, riboconmutadores, recombinación, recombinación homóloga, mutagénesis de ADN^{mc}, ARNⁱ, miARN, ARN^{as}, mutación de genes, inactivación de genes, mutagénesis de transposones, ...) que se utilizan para cambiar los genes de tal manera que sean menos capaces (es decir, estadísticamente significativamente "menos capaces" en comparación con un gen funcional de tipo silvestre) o completamente incapaces (tales como genes inactivados) de producir productos finales funcionales. Además de cambiar el gen de interés de tal manera que se obtenga una expresión más baja tal como se ha descrito anteriormente, también se puede obtener una expresión más baja cambiando la unidad de transcripción, el promotor, una región no traducida, el sitio de unión al ribosoma, la secuencia de Shine Dalgarno o el terminador de la transcripción. Se puede obtener una expresión más baja o una expresión reducida, por ejemplo, mutando uno o más pares de bases en la secuencia del promotor o cambiando la secuencia del promotor completamente a un promotor constitutivo con una fuerza de expresión más baja en comparación con el tipo silvestre o un promotor inducible que da como resultado una expresión regulada o un promotor reprimible que da como resultado una expresión regulada. La sobreexpresión o la expresión se obtiene mediante tecnologías comunes bien conocidas por un experto, en las que dicho gen es parte de un "casete de expresión" que se refiere a cualquier secuencia en la que está presente una secuencia promotora, una secuencia de región no traducida (que contiene una secuencia de unión a ribosoma o una secuencia de Shine Dalgarno), una secuencia codificante y opcionalmente un terminador de la transcripción, y con la que se obtiene la expresión de una proteína activa funcional. Dicha expresión es constitutiva o está regulada.

El término "expresión constitutiva" se define como la expresión que no está regulada por factores de transcripción distintos de las subunidades de ARN polimerasa (por ejemplo, los factores sigma bacterianos) en determinadas condiciones de crecimiento. Ejemplos no limitantes de dichos factores de transcripción son CRP, LacI, ArcA, Cra, IclR en *E. coli*. Estos factores de transcripción se unen a una secuencia específica y pueden bloquear o potenciar la expresión en determinadas condiciones de crecimiento. La ARN polimerasa se une a una secuencia específica para iniciar la transcripción, por ejemplo a través de un factor sigma en huéspedes procarióticos.

El término "expresión por un inductor natural" se define como una expresión facultativa o reguladora de un gen que solo se expresa en una determinada condición natural del huésped (por ejemplo, cuando el organismo está de parto o durante la lactancia), como respuesta a un cambio ambiental (que incluye, por ejemplo, pero sin limitación, hormonas, calor, frío, luz, estrés/señalización oxidativa u osmótica), o depende de la posición de la etapa de desarrollo o el ciclo celular de dicha célula huésped, incluyendo, pero sin limitación, apoptosis y autofagia.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias reconocidas por los sistemas transcripcional y traduccional de las células, que permiten la transcripción y la traducción de una secuencia polinucleotídica para dar un polipéptido. Por lo tanto, dichas secuencias de ADN son necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en una célula u organismo particular. Dichas secuencias de control pueden ser, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de unión a ribosomas, secuencias de Shine Dalgarno, secuencias de Kozak y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. El ADN de una presecuencia o líder secretor puede estar unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilite la traducción. Dichas secuencias de control pueden controlarse también con productos químicos externos, tales como, pero sin limitación, IPTG, arabinosa, lactosa, alo-lactosa, ramnosa o fucosa mediante un promotor inducible o mediante un circuito genético que o bien induce o bien reprime la transcripción o la traducción de dicho polinucleótido para dar un polipéptido.

En general, "unidas operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. El término "glicosiltransferasa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enzima capaz de catalizar la transferencia de restos de azúcar desde moléculas donadoras activadas a moléculasceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos. Los oligosacáridos sintetizados como tales pueden ser de tipo lineal o de tipo ramificado y pueden contener múltiples bloques de construcción de monosacáridos. Se ha descrito una clasificación de glicosiltransferasas utilizando difosfoazúcar nucleotídico, monofosfoazúcar nucleotídico y fosfatos de azúcar y proteínas relacionadas en distintas familias basadas en secuencias (Campbell et al., Biochem. J. 326, 929-939 (1997)) y está disponible en la página de Internet de CAZy (CArbohydrate-Active EnZymes) (www.cazy.org).

Tal como se utiliza en el presente documento, la glicosiltransferasa se puede seleccionar de la lista que comprende, pero sin limitación: galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, ramnosiltransferasas.

Las galactosiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo galactosilo (Gal) de un donador de UDP-galactosa (UDP-Gal) a un aceptor de glicano. Las galactosiltransferasas comprenden beta-1,3-galactosiltransferasas, beta-1,4-galactosiltransferasas, alfa-1,3-galactosiltransferasas y alfa-1,4-galactosiltransferasas que transfieren un residuo Gal de UDP-Gal a un aceptor de glicano a través de enlaces alfa- o beta-glucosídicos. Las galactosiltransferasas se pueden encontrar, pero sin limitación, en las familias CAZy GT2, GT6, GT8, GT25 y GT92. Las galactosiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo galactosilo (Gal) de un donador de UDP-galactosa (UDP-Gal) a un aceptor de glicano. Las glucosiltransferasas comprenden alfa-glucosiltransferasas, beta-1,2-glucosiltransferasas, beta-1,3-glucosiltransferasas y beta-1,4-glucosiltransferasas que transfieren un residuo de Glc de UDP-Glc a un aceptor de glicano mediante enlaces alfa o beta-glucosídicos. Las glucosiltransferasas se pueden encontrar, pero sin limitación, en las familias CAZy GT1, GT4 y GT25. Las mannosiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo manosa (Man) de un donador de GDP-manosa (GDP-Man) a un aceptor de glicano. Las mannosiltransferasas comprenden alfa-1,2-mannosiltransferasas, alfa-1,3-mannosiltransferasas y alfa-1,6-mannosiltransferasas que transfieren un residuo de Man de GDP-Man a un aceptor de glicano mediante enlaces alfa-glucosídicos. Las mannosiltransferasas se pueden encontrar, pero sin limitación, en las familias CAZy GT22, GT39, GT62 y GT69. Las N-acetilglucosaminiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo N-acetilglucosamina (GlcNAc) de un donador de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) a un aceptor de glicano. Se pueden encontrar N-acetilglucosaminiltransferasas, pero sin limitación, en las familias CAZy GT2 y GT4. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo N-acetilgalactosamina (GalNAc) de un donador de UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) a un aceptor de glicano. Se pueden encontrar N-acetilgalactosaminiltransferasas, pero sin limitación, en las familias CAZy GT7, GT12 y GT27. Las N-acetilmanosaminiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un grupo N-acetilmanosamina (ManNAc) de un donador de UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc) a un aceptor de glicano. Las xilosiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un residuo de xilosa (Xyl) de un donador de UDP-xilosa (UDP-Xyl) a un aceptor de glicano. Se pueden encontrar xilosiltransferasas, pero no se limitan a las familias CAZy GT61 y GT77. Las ramnosiltransferasas son glicosiltransferasas que transfieren un residuo de ramnosa de un donador de GDP-ramnosa a un aceptor de glicano. Las ramnosiltransferasas se pueden encontrar, entre otras, en las familias CAZy GT1, GT2 y GT102.

Los términos "azúcar nucleotídico" o "azúcar activado" se utilizan en el presente documento indistintamente y se refieren a formas activadas de monosacáridos. Los ejemplos de monosacáridos activados incluyen, pero sin limitación, UDP-galactosa (UDP-Gal), UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa o UDP-xilosa. Los azúcares nucleotídicos actúan como donadores de glicosilo en reacciones de glicosilación. Las reacciones de glicosilación son reacciones catalizadas por glicosiltransferasas.

"Oligosacárido", tal como se utiliza el término en el presente documento y tal como se entiende generalmente en el estado de la técnica, se refiere a un polímero de sacárido que contiene un pequeño número, generalmente de tres a veinte, de azúcares sencillos, es decir, monosacáridos. Los monosacáridos, tal como se utilizan en el presente documento, son azúcares reductores. Los oligosacáridos pueden ser azúcares reductores o no reductores y tener un extremo reductor y un extremo no reductor. Un azúcar reductor es cualquier azúcar que es capaz de reducir otro compuesto y se oxida él mismo, es decir, el carbono de carbonilo del azúcar se oxida para dar un grupo carboxilo. El oligosacárido, tal como se utiliza en la presente invención, puede tener una estructura lineal o puede incluir ramificaciones. El enlace (por ejemplo, enlace glicosídico, enlace galactosídico, enlace glucosídico, etc.) entre dos unidades de azúcar se puede expresar, por ejemplo, como 1,4, 1->4 o (1-4), que se utilizan indistintamente en el presente documento. Cada uno de los monosacáridos puede estar en forma cíclica (por ejemplo, piranosa o furanosa). Los enlaces entre las unidades de monosacáridos individuales pueden incluir alfa 1->2, alfa 1->3, alfa 1->4, alfa 1->6, alfa 2->1, alfa 2->3, alfa 2->4, alfa 2->6, beta 1->2, beta 1->3, beta 1->4, beta 1->6, beta 2->1, beta 2->3, beta 2->4 y beta 2->6. Un oligosacárido puede contener enlaces tanto alfa- como beta-glucosídicos o puede contener solo enlaces beta-glucosídicos.

El término "monosacárido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un azúcar que no se puede descomponer en azúcares más simples mediante hidrólisis, se clasifica o bien como aldosa o bien como cetosa y contiene uno o más grupos hidroxilo por molécula. Los monosacáridos son sacáridos que contienen solo un azúcar sencillo. Los ejemplos de monosacáridos comprenden hexosa, D-glucopiranososa, D-galactofuranosa, D-galactopiranososa, L-galactopiranososa, D-manopiranososa, D-alopiranososa, L-altropiranososa, D-gulopiranososa, L-idopiranososa, D-talopiranososa, D-ribofuranosa, D-ribopiranososa, D-arabinofuranosa, D-arabinofuranosa, L-arabinofuranosa, L-arabinofuranosa, D-xilopiranososa, D-lixopiranososa, D-eritrofuranososa, D-treofuranosa, heptosa, L-glicero-D-mano-heptopiranososa (LDmanHep), D-glicero-D-mano-heptopiranososa (DDmanHep), 6-desoxi-L-altropiranososa, 6-desoxi-D-gulopiranososa, 6-desoxi-D-talopiranososa, 6-desoxi-D-galactopiranososa, 6-desoxi-L-galactopiranososa, 6-desoxi-D-manopiranososa, 6-desoxi-L-manopiranososa, 6-desoxi-D-glucopiranososa, 2-desoxi-D-arabino-hexosa, 2-desoxi-D-eritropentosa, 2,6-didesoxi-D-arabino-hexopiranososa, 3,6-didesoxi-D-arabino-hexopiranososa, 3,6-didesoxi-L-arabino-hexopiranososa, 3,6-didesoxi-D-xilo-hexopiranososa, 3,6-didesoxi-D-ribo-hexopiranososa, 2,6-didesoxi-D-ribo-hexopiranososa, 3,6-didesoxi-L-xilo-hexopiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-galactopiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-manopiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-alopiranososa, 2-amino-2-desoxi-L-altropiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-gulopiranososa, 2-amino-2-desoxi-L-idopiranososa, 2-amino-2-desoxi-D-talopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-manopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-alopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-L-altropiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-gulopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-L-idopiranososa, 2-acetamido-2-desoxi-D-talopiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-D-galactopiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-L-galactopiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-L-manopiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-D-glucopiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-L-altropiranososa, 2-acetamido-2,6-didesoxi-D-talopiranososa, eritritol, arabinitol, xilitol, ribitol, glucitol, galactitol, manitol, D-ribo-Hex-2-ulopiranososa, D-arabino-Hex-2-ulofuranosa (D-fructofuranosa), D-arabino-Hex-2-ulopiranososa, L-xilo-Hex-2-ulopiranososa, D-lixo-Hex-2-ulopiranososa, D-treo-Pent-2-ulopiranososa, D-altro-Hept-2-ulopiranososa, 3-C-(hidroximetil)-D-eritofuranosa, 2,4,6-tridesoxi-2,4-diamino-D-glucopiranososa, 6-desoxi-3-O-metil-D-glucosa, 3-O-metil-D-ramnosa, 2,6-didesoxi-3-metil-D-ribohexosa, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-D-glucopiranososa, 2-acetamido-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-D-glucopiranososa, 2-glicolilamido-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-D-glucopiranososa, glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, glucosamina, manosa, xilosa, N-acetilmanosamina, N-acetilgalactosamina, galactosamina, ramnosa, fructosa y polioles.

El término "disacárido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sacárido compuesto por dos unidades de monosacárido. Los ejemplos de disacáridos comprenden lactosa (Gal-b1,4-Glc), lacto-N-biosa (Gal-b1,3-GlcNAc), N-acetilactosamina (Gal-b1,4-GlcNAc), LacDiNAc (GalNAc-b1,4-GlcNAc), N-acetilgalactosaminilglucosa (GalNAc-b1,4-Glc).

Los "oligosacáridos", tal como se utilizan en el presente documento, son estructuras de glicano que están compuestas por tres o más subunidades de monosacáridos que están unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos en una estructura lineal o ramificada. Preferentemente, el oligosacárido, tal como se describe en el presente documento, contiene monosacáridos seleccionados de la lista que se ha utilizado en el presente documento anteriormente. Los ejemplos de oligosacáridos incluyen, pero sin limitación, oligosacáridos de leche de mamífero y oligosacáridos de leche humana.

Tal como se utiliza en el presente documento, "oligosacárido de leche de mamífero" se refiere a oligosacáridos de leche de mamífero neutros no fucosilados tales como, pero sin limitación, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-hexaosa, lacto-N-neohexaosa, para-lacto-N-hexaosa y/o quitosano galactosilado.

Los oligosacáridos de la leche de mamíferos comprenden oligosacáridos presentes en la leche que se encuentran en cualquier fase durante la lactancia, incluida la leche de calostro de seres humanos y mamíferos, incluidos, pero sin limitación, vacas (*Bos taurus*), ovejas (*Ovis aries*), cabras (*Capra aegagrus hircus*), camellos bactrianos (*Camelus bactrianus*), caballos (*Equus ferus caballus*), cerdos (*Sus scropha*), perros (*Canis lupus familiaris*), osos pardos Ezo (*Ursus arctos yesoensis*), oso polar (*Ursus maritimus*), osos negros japoneses (*Ursus thibetanus japonicus*), mofetas rayadas (*Mephitis mephitis*), focas capuchinas (*Cystophora cristata*), elefantes asiáticos (*Elephas maximus*), elefante africano (*Loxodonta africana*), oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*), delfines mulares comunes (*Tursiops trunca*), ballenas minke del norte (*Balaenoptera acutorostrata*), ualabí de Tammar (*Macropus eugenii*), canguros rojos (*Macropus rufus*), zarigüeya común (*Trichosurus vulpecula*), koalas (*Phascolarctos cinereus*), quols orientales (*Dasyurus viverrinus*), ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*).

Un "oligosacárido fucosilado", tal como se utiliza en el presente documento y como se entiende generalmente en el estado de la técnica, es un oligosacárido que porta un residuo de fucosa. Dicho oligosacárido fucosilado es una estructura de sacárido que comprende al menos tres subunidades de monosacárido unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos, en la que al menos una de dichas subunidades de monosacárido es una fucosa. Un oligosacárido fucosilado puede contener más de un residuo de fucosa, por ejemplo dos, tres o más. Un oligosacárido fucosilado puede ser un oligosacárido neutro o un oligosacárido cargado, que comprende, por ejemplo, también estructuras de ácido siálico. La fucosa se puede unir a otras subunidades de monosacáridos que comprenden glucosa, galactosa y GlcNAc mediante enlaces alfa-glucosídicos que comprenden enlaces alfa-1,2, alfa-1,3, alfa-1,4, alfa-1,6.

Los ejemplos comprenden 2'-fucosil-lactosa (2'FL), 3-fucosil-lactosa (3FL), 4-fucosil-lactosa (4FL), 6-fucosil-lactosa (6FL), difucosil-lactosa (diFL), lactodifucotetraosa (LDFT), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I), lacto-N-fucopentaosa II

(LNFP II), lacto-N-fucopentaosa III (LNFP III), lacto-N-fucopentaosa V (LNFP V), lacto-N-fucopentaosa VI (LNFP VI), lacto-N-neofucopentaosa I, lacto-N-difucohexaosa I (LDFH I), lacto-N-difucohexaosa II (LDFH II), monofucosil-lacto-N-hexaosa III (MFLNH III), difucosil-lacto-N-hexaosa (DFLNHa), difucosil-lacto-N-neohexaosa, 3'-sialil-3-fucosillactosa, disialomonofucosil-lacto-N-neohexaosa, monofucosilmonosialil-lacto-N-octaosa (sialil Lea), sialil-lacto-N-fucohexaosa II, disialil-lacto-N-fucopentaosa II, monofucosildisialil-lacto-N-tetraosa.

Un "oligosacárido neutro", tal como se utiliza en el presente documento y tal como se entiende generalmente en el estado de la técnica, es un oligosacárido que no tiene carga negativa procedente de un grupo ácido carboxílico. Los ejemplos de dichos oligosacáridos neutros comprenden 2'-fucosil-lactosa (2'FL), 3-fucosil-lactosa (3FL), 2',3-difucosil-lactosa (diFL), lacto-N-triosa II, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-neofucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-fucopentaosa VI, lacto-N-neofucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, lacto-N-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-N-hexaosa, lacto-N-neohexaosa, para-lacto-N-hexaosa, para-lacto-N-neohexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa y difucosil-lacto-N-neohexaosa.

"Un oligosacárido neutro no fucosilado", tal como se utiliza en el presente documento y tal como se entiende generalmente en el estado de la técnica, es un oligosacárido que no tiene carga negativa procedente de un grupo ácido carboxílico y no contiene un residuo de fucosa. Los ejemplos de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados comprenden lacto-N-triosa II, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-N-hexaosa, lacto-N-neohexaosa, para-lacto-N-hexaosa y para-lacto-N-neohexaosa.

Una 'vía de galactosilación', tal como se utiliza en el presente documento, es una vía bioquímica que consiste en las enzimas y sus respectivos genes, galactosa-1-epimerasa, galactoquinasa, glucoquinasa, galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, UDP-glucosa 4-epimerasa, glucosa-1-fosfato, uridililtransferasa y/o glucosiltransferasa, combinadas con una galactosiltransferasa que da lugar a una galactosa unida en alfa o beta en el grupo hidroxilo 2, 3, 4 y/o 6 de un oligosacárido.

Una 'vía de carbohidratos de N-acetilglucosamina', tal como se utiliza en el presente documento, es una vía bioquímica que consiste en las enzimas y sus respectivos genes, L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, glucosamina-6-fosfato desaminasa, fosfoglucoamina mutasa, N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa, glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato uridililtransferasa, glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa y/o glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa, combinadas con una glicosiltransferasa que da lugar a una N-acetilglucosamina unida en alfa o beta al grupo hidroxilo 3, 4 y/o 6 de un oligosacárido.

El término "purificado" se refiere a material que está sustancialmente o esencialmente desprovisto de componentes que interfieren con la actividad de la molécula biológica. Para células, sacáridos, ácidos nucleicos y polipéptidos, el término "purificado" se refiere al material que está sustancialmente o esencialmente desprovisto de componentes que normalmente acompañan al material tal como se encuentra en su estado nativo. Normalmente, los sacáridos, oligosacáridos, proteínas o ácidos nucleicos purificados de la invención son al menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% u 85% puros, normalmente al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puros, medidos por la intensidad de la banda en un gel teñido con plata u otro procedimiento para determinar la pureza. La pureza u homogeneidad se puede indicar mediante una serie de medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína o ácido nucleico, seguida de visualización tras una tinción. Para determinados fines será necesaria una alta resolución y se utilizará HPLC o un medio similar de purificación. Para los oligosacáridos, la pureza se puede determinar usando procedimientos tales como, pero sin limitación, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, RMN, HPLC, electroforesis capilar o espectroscopia de masas.

El término "cultivo" se refiere al medio de cultivo en el que se cultiva o se fermenta la célula, la propia célula y los oligosacáridos que produce la célula en caldo completo, es decir, dentro (intracelularmente) así como fuera (extracelularmente) de la célula.

El término "precursor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sustancias que absorbe o sintetiza la célula para la producción específica de un oligosacárido neutro no fucosilado según la presente invención. En este sentido, un precursor puede ser un aceptor tal como se define en el presente documento, pero también puede ser otra sustancia, un metabolito, que se modifica en primer lugar dentro de la célula como parte de la ruta de síntesis bioquímica del oligosacárido. Los ejemplos de dichos precursores comprenden los aceptores tal como se definen en el presente documento, y/o glucosa, galactosa, fructosa, glicerol, manosa, maltosa, sacarosa, lactosa, glucosa-1-fosfato, galactosa-1-fosfato, UDP-glucosa, UDP-galactosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bisfosfato, glicerol-3-fosfato, dihidroxiacetona, gliceraldehído-3-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato, glucosamina-6-fosfato, glucosamina, N-acetil-glucosamina-6-fosfato, N-acetil-glucosamina, N-acetil-manosamina, N-acetilmanosamina-6-fosfato, UDP-N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina-1-fosfato, manosa-6-fosfato, manosa-1-fosfato, GDP-manosa y/o GDP-4-deshidro-6-desoxi- α -D-manosa.

Opcionalmente, la célula se transforma para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en transportador de lactosa, transportador de un azúcar activado

por nucleótidos en el que dicho transportador internaliza un precursor añadido al medio para la síntesis de oligosacáridos neutros no fucosilados.

El término "aceptor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a di- u oligosacáridos que pueden modificarse mediante una glicosiltransferasa. Los ejemplos de dichos aceptores comprenden lactosa, lacto-N-biosa (LNB), lacto-N-triosa, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), N-acetil-lactosamina (LacNAc), lacto-N-pentaosa (LNP), lacto-N-neopentaosa, para-lacto-N-pentaosa, para-lacto-N-neopentaosa, lacto-N-novopentaosa I, lacto-N-hexaosa (LNH), lacto-N-neohexaosa (LNnH), para-lacto-N-neohexaosa (pLNnH), para-lacto-N-hexaosa (pLNH), lacto-N-heptaosa, lacto-N-neoheptaosa, para-lacto-N-neoheptaosa, para-lacto-N-heptaosa, lacto-N-octaosa (LNO), lacto-N-neooctaosa, iso-lacto-N-octaosa, para-lacto-N-octaosa, iso-lacto-N-neooctaosa, novo-lacto-N-neooctaosa, para-lacto-N-neooctaosa, iso-lacto-N-nonaosa, novo-lacto-N-nonaosa, lacto-N-nonaosa, lacto-N-decaosa, iso-lacto-N-decaosa, novo-lacto-N-decaosa, lacto-N-neodecaosa, galactosilactosa, una lactosa extendida con 1, 2, 3, 4, 5 o un múltiplo de unidades de N-acetilactosamina y/o 1, 2, 3, 4, 5 o un múltiplo de unidades de lacto-N-biosa y un oligosacárido que contiene 1 o múltiples unidades de N-acetilactosamina y/o 1 o múltiples unidades de lacto-N-biosa o un intermedio en versiones de oligosacáridos de los mismos.

Descripción detallada de la invención

La invención se expone en la serie de reivindicaciones adjunta. Según una primera forma de realización, la presente invención proporciona una célula modificada metabólicamente para la producción de una mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. En el presente documento, se proporciona una única célula modificada metabólicamente que expresa al menos tres glicosiltransferasas y es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s) que es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas.

Según una segunda forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. El procedimiento comprende las etapas siguientes:

- i) proporcionar una célula que expresa al menos tres glicosiltransferasas y es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s), en el que dicho(s) azúcar(es) nucleotídico(s) es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas,
- ii) cultivar dicha célula en condiciones que permitan expresar dichas glicosiltransferasas y sintetizar dicho(s) azúcar(es) nucleotídico(s),
- iii) preferentemente, separar al menos uno de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados del cultivo.

Según la invención, dicho procedimiento para la producción de una mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes puede utilizar una célula no modificada metabólicamente o puede utilizar una célula modificada metabólicamente tal como se describe en el presente documento.

En el ámbito de la presente invención, se entiende que condiciones permisivas son condiciones relacionadas con parámetros físicos o químicos que incluyen, pero sin limitación, temperatura, pH, presión, presión osmótica y concentración de producto/educto.

En una forma de realización particular, las condiciones permisivas pueden incluir un intervalo de temperatura de 30 +/- 20 grados centígrados, un intervalo de pH de 7 +/- 3.

En otra forma de realización preferida del procedimiento de la invención, el cultivo se alimenta con un precursor para la síntesis de cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados presentes en dicha mezcla. En una forma de realización preferida adicional del procedimiento, el cultivo se alimenta con al menos dos precursores para la síntesis de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados presentes en la mezcla. Esto puede ser útil si se usan dos o más glicosiltransferasas de la misma clasificación que tienen una afinidad diferente para la producción de una mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados según la presente invención. La presente invención proporciona diferentes tipos de células para dicha producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende cuatro o más oligosacáridos neutros no fucosilados con una única célula modificada metabólicamente. Por ejemplo, la presente invención proporciona una célula en la que dicha célula expresa tres glicosiltransferasas diferentes y dicha célula sintetiza un único azúcar nucleotídico que es donador de dichas tres glicosiltransferasas expresadas. La presente invención también proporciona una célula en la que dicha célula expresa tres o más glicosiltransferasas y dicha célula sintetiza uno o más azúcar(es) nucleotídico(s) diferentes que es/son donador(es) de todas dichas glicosiltransferasas expresadas.

Según una forma de realización preferida del procedimiento y la célula según la invención, la célula modificada metabólicamente se modifica con módulos de expresión génica en los que la expresión de cualquiera de dichos módulos de expresión es constitutiva o se crea mediante un inductor natural.

Dichos módulos de expresión también se conocen como unidades transcripcionales y comprenden polinucleótidos para la expresión de genes recombinantes que incluyen secuencias de genes codificantes y señales de control transcripcional y/o traduccional apropiadas que están operativamente unidas a los genes codificantes. Dichas señales de control comprenden secuencias promotoras, regiones no traducidas, sitios de unión a ribosomas y secuencias terminadoras. Dichos módulos de expresión pueden contener elementos para la expresión de un único gen recombinante pero también pueden contener elementos para la expresión de más genes recombinantes o pueden organizarse en una estructura de operón para la expresión integrada de dos o más genes recombinantes. Dichos polinucleótidos pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir módulos de expresión incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York o en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, N.Y. (1989 y actualizaciones anuales).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la célula se modifica con uno o más módulos de expresión. Los módulos de expresión pueden integrarse en el genoma de dicha célula o pueden presentarse a dicha célula en un vector. Dicho vector puede estar presente en forma de plásmido, cósmido, fago, liposoma o virus, que se va a transformar/transfectar de forma estable en dicha célula modificada metabólicamente. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Estos vectores pueden contener marcadores de selección tales como, pero sin limitación, marcadores de antibióticos, marcadores auxotróficos, marcadores de toxina-antitoxina, marcadores de ARN sentido/antisentido. Los constructos del sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan, y además generan, la expresión. En general, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un huésped puede usarse, a este respecto, para la expresión. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una diversidad de técnicas rutinarias bien conocidas, tales como, por ejemplo, las expuestas por Sambrook et al., véase anteriormente. Para la producción recombinante, las células pueden modificarse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula puede efectuarse mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986), y Sambrook et al., 1989, anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, un módulo de expresión comprende polinucleótidos para la expresión de al menos un gen recombinante. Dicho gen recombinante está involucrado en la expresión de un polipéptido que actúa en la síntesis de dicha mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados; o dicho gen recombinante está vinculado a otras vías en dicha célula huésped que no están involucradas en la síntesis de dicha mezcla de tres o más oligosacáridos neutros no fucosilados. Dichos genes recombinantes codifican proteínas endógenas con una expresión o actividad modificada, preferentemente dichas proteínas endógenas se sobreexpresan; o dichos genes recombinantes codifican proteínas heterólogas que se introducen y se expresan de manera heterogénea en dicha célula modificada, preferentemente se sobreexpresan. Las proteínas endógenas pueden tener una expresión modificada en la célula que también expresa una proteína heteróloga.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la expresión de cada uno de dichos módulos de expresión es constitutiva o está creada por un inductor natural. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión constitutiva debe entenderse como la expresión de un gen que se transcribe continuamente en un organismo. La expresión creada por un inductor natural debe entenderse como una expresión facultativa o reguladora de un gen que solo se expresa en una determinada condición natural del huésped (por ejemplo, cuando el organismo está de parto o durante la lactancia), como respuesta a un cambio ambiental (que incluye, por ejemplo, pero sin limitación, hormonas, calor, frío, luz, estrés/señalización oxidativa u osmótica), o depende de la posición de la etapa de desarrollo o el ciclo celular de dicha célula huésped, incluyendo, pero sin limitación, apoptosis y autofagia.

En una forma de realización del procedimiento y/o la célula según la invención, la mezcla de oligosacáridos está compuesta de oligosacáridos neutros no fucosilados. Los oligosacáridos neutros son estructuras de oligosacáridos que no contienen una subunidad de monosacárido cargada negativamente, que incluyen ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), comúnmente conocido como ácido siálico, ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), glucuronato y galacturonato. Los oligosacáridos neutros también se denominan oligosacáridos no ácidos. El ácido siálico pertenece a la familia de los derivados del ácido neuramínico (ácido 5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-ulosónico). El Neu5Gc es un derivado del ácido siálico, que se forma por hidroxilación del grupo N-acetilo en C5 de Neu5Ac. Los oligosacáridos neutros son oligosacáridos no sialilados y, por tanto, no contienen una subunidad de monosacárido ácido. Los oligosacáridos neutros no fucosilados son oligosacáridos no fucosilados sin carga que carecen de subunidades de fucosa.

En una forma de realización del procedimiento y/o la célula según la invención, la mezcla de oligosacáridos comprende al menos tres oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes que difieren en el grado de polimerización (DP). El

grado de polimerización de un oligosacárido se refiere al número de unidades de monosacárido presentes en la estructura del oligosacárido. Tal como se utiliza en el presente documento, el grado de polimerización de un oligosacárido es tres (DP3) o más, comprendiendo este último uno cualquiera de 4 (DP4), 5 (DP5), 6 (DP6) o más. La mezcla de oligosacáridos tal como se describe en el presente documento comprende preferentemente al menos tres oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes que difieren entre sí en el grado de polimerización.

Según una forma de realización del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula produce una mezcla que comprende cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes o más de cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. En una forma de realización, dicha mezcla comprende al menos cuatro oligosacáridos diferentes, en la que tres de los oligosacáridos tienen un grado diferente de polimerización. En una forma de realización, todos dichos oligosacáridos presentes en la mezcla tienen un grado de polimerización diferente tal como se describe en el presente documento.

En una forma de realización del procedimiento y/o la célula según la invención, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas se elige de la lista que comprende galactosiltransferasas, glicosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, ramnosiltransferasas y xilosiltransferasas tal como se definen en el presente documento.

En un aspecto adicional del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula está modificada en la expresión o actividad de al menos una de dichas glicosiltransferasas. En una forma de realización preferida, dicha glicosiltransferasa es una proteína endógena de la célula con una expresión o actividad modificada, preferentemente dicha glicosiltransferasa endógena está sobreexpresada; alternatively dicha glicosiltransferasa es una proteína heteróloga que se introduce y se expresa de forma heterogénea en dicha célula, preferentemente se sobreexpresa. Dicha glicosiltransferasa endógena puede tener una expresión modificada en la célula que también expresa una glicosiltransferasa heteróloga.

En otro aspecto del procedimiento y/o la célula de la invención, al menos una de dichas glicosiltransferasas es una N-acetilglucosaminiltransferasa y la célula es capaz de sintetizar UDP-GlcNAc. La UDP-GlcNAc puede proporcionarse por una enzima expresada en la célula o por el metabolismo de la célula. Dicha célula que produce una UDP-GlcNAc puede expresar enzimas que convierten, por ejemplo GlcNAc, que se va a añadir a la célula, en UDP-GlcNAc. Estas enzimas pueden ser una N-acetil-D-glucosamina quinasa, una N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa, una fosfoglucoamina mutasa y una N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa/glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa de varias especies, incluidas *Homo sapiens*, *Escherichia coli*. Preferentemente, la célula se modifica para producir UDP-GlcNAc. De forma más preferida, la célula se modifica para potenciar la producción de UDP-GlcNAc. Dicha modificación puede ser una o más elegidas del grupo que comprende la inactivación de una N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa, la sobreexpresión de una L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, la sobreexpresión de una a fosfoglucoamina mutasa y la sobreexpresión de una N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa/glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa.

En otro aspecto del procedimiento y/o la célula de la invención, al menos una de dichas glicosiltransferasas es una galactosiltransferasa y la célula es capaz de sintetizar UDP-Gal. La UDP-Gal puede proporcionarse por una enzima expresada en la célula o por el metabolismo de la célula. Dichas células productoras de UDP-Gal pueden expresar una enzima que convierte, por ejemplo, UDP-glucosa, en UDP-Gal. Esta enzima puede ser, por ejemplo, la UDP-glucosa-4-epimerasa GalE tal como se conoce de varias especies, incluidas *Homo sapiens*, *Escherichia coli* y *Rattus norvegicus*. Preferentemente, la célula se modifica para producir UDP-Gal. De forma más preferida, la célula se modifica para potenciar la producción de UDP-Gal. Dicha modificación puede ser una cualquiera o más elegidas del grupo que comprende la inactivación de un gen que codifica 5'-nucleotidasa/UDP-azúcar hidrolasa bifuncional, la inactivación de un gen que codifica galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y la sobreexpresión de un gen que codifica UDP-glucosa-4-epimerasa.

En otra forma de realización del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula es capaz de sintetizar uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos elegidos de la lista que comprende UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa, UDP-xilosa. En una forma de realización preferida, dicha célula está diseñada metabólicamente para la producción de un azúcar nucleotídico. En otra forma de realización preferida, la célula se modifica y/o se diseña genéticamente para la producción optimizada de un azúcar nucleotídico.

Según el procedimiento y/o la célula de la invención, al menos uno de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de dicha mezcla está galactosilado, glucosilado, xilosilado, manosilado, contiene una N-acetilglucosamina, contiene una N-acetilgalactosamina, contiene una ramnosa y/o contiene una N-acetilmanosamina.

Preferentemente, la mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados comprende al menos un oligosacárido de 3 o más subunidades de monosacárido unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos, en la que al menos uno de dichos residuos de monosacárido es un residuo de GlcNAc. Dicho oligosacárido puede contener más de un residuo de GlcNAc, por ejemplo dos, tres o más. La GlcNAc puede estar presente en el extremo reductor del oligosacárido. Dicha GlcNAc

también puede estar presente en el extremo no reductor de dicho oligosacárido. Dicha GlcNAc también puede estar presente dentro de la estructura del oligosacárido. La GlcNAc se puede unir a otras subunidades de monosacáridos tales como, por ejemplo, galactosa.

- 5 Como alternativa o adicionalmente, la mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados comprende al menos un oligosacárido galactosilado y contiene al menos una subunidad de monosacárido de galactosa. Dicho oligosacárido galactosilado es una estructura de sacárido que comprende al menos tres subunidades de monosacárido unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos, en la que al menos una de dichas subunidades de monosacárido es una galactosa. Dicho oligosacárido galactosilado puede contener más de un residuo de galactosa, por ejemplo dos, tres o más.
- 10 La galactosa se puede unir a otras subunidades de monosacáridos que comprenden glucosa y GlcNAc. En una forma de realización preferida del procedimiento y/o la célula de la invención, cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados se transloca al exterior de la célula mediante un transporte pasivo, es decir, sin medios de un sistema de transporte activo que consuma energía de dicha célula.
- 15 En otra forma de realización preferida del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula se modifica metabólicamente además para
 - i) la expresión modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
 - 20 ii) la actividad modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
 - iii) la expresión de una proteína de membrana homóloga, y/o
 - 25 iv) la expresión de una proteína de membrana heteróloga,en el que dicha proteína de membrana participa en la secreción de cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados al exterior de dicha célula. Dicha célula puede expresar una de dichas proteínas de membrana que está involucrada en la secreción de cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados desde dicha célula al exterior de dicha célula. Dicha célula también puede expresar más de una de dichas proteínas de membrana. Una
- 30 cualquiera de dichas proteínas de membrana puede translocar uno o más de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados al exterior de dicha célula. Dicha célula que produce una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados puede translocar cualquiera de dichos oligosacáridos mediante difusión pasiva, proteínas de membrana de canal, proteínas transportadoras de membrana, proteínas vehículo de membrana.
- 35 En otra forma de realización preferida del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula se modifica metabólicamente además para
 - i) la expresión modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
 - 40 ii) la actividad modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
 - iii) la expresión de una proteína de membrana homóloga, y/o
 - 45 iv) la expresión de una proteína de membrana heteróloga,en el que dicha proteína de membrana está involucrada en la absorción de un precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. El término "precursor" debe entenderse tal como se explica en las definiciones divulgadas en el presente documento. Dicha célula puede expresar una de dichas proteínas de membrana que está involucrada en la absorción de cualquier tipo de precursor utilizado en la síntesis de uno cualquiera
- 50 de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. Dicha célula también puede expresar más de una de dichas proteínas de membrana, involucradas en la captación de al menos uno de dichos precursores. Dicha célula puede modificarse para la absorción de más de un precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados.
- 55 En otra forma de realización del procedimiento y/o la célula, la célula produce un precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización preferida, dicha célula produce uno o más precursores para la síntesis de dicha mezcla de oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización más preferida, dicha célula se modifica para una producción optimizada de cualquiera de dichos precursores para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados.
- 60 En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados con una célula en el que dicha célula convierte completamente uno cualquiera de dichos precursores en uno cualquiera de dichos oligosacáridos.
- 65 En una forma de realización preferida del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula confiere resistencia mejorada a los bacteriófagos. Dicha mejora de la resistencia de los bacteriófagos puede derivarse de la expresión

reducida de una proteína de membrana endógena y/o de la mutación de un gen que codifica una proteína de membrana endógena. Se entiende que el término "insensible a fagos" o "resistente a fagos" o "resistencia a fagos" o "perfil de resistencia a fagos" significa una cepa bacteriana que es menos sensible, y preferentemente insensible a la infección y/o destrucción por fagos y/o inhibición del crecimiento. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "actividad antifagos" o "resistente a la infección por al menos un fago" se refieren a un aumento en la resistencia de una célula bacteriana que expresa un sistema funcional de resistencia al fago a la infección por al menos una familia de fagos en comparación con una célula bacteriana de la misma especie en la misma etapa de desarrollo (por ejemplo, estado de cultivo) que no expresa un sistema funcional de resistencia a fagos, tal como puede determinarse, por ejemplo, por viabilidad bacteriana, lisogenia de fagos, replicación genómica de fagos y degradación genómica de fagos. El fago puede ser un fago lítico o un fago temperado (lisógeno). Las proteínas de membrana involucradas en la resistencia a los bacteriófagos de una célula comprenden OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, BtuB, TolC, LamB, FhuA, TonB, FadL, Tsx, FepA, YncD, PhoE y NfrA y sus homólogos.

En una forma de realización preferida del procedimiento y/o la célula de la invención, la célula confiere una viscosidad reducida. La viscosidad reducida de una célula se puede obtener mediante una biosíntesis de la pared celular modificada. La biosíntesis de la pared celular se puede modificar para que comprenda la síntesis reducida o abolida de, por ejemplo, poli-N-acetil-glucosamina, el antígeno enterobacteriano común, celulosa, ácido colánico, oligosacáridos centrales, glucanos periplásmicos osmorregulados y glucosilglicerol, glicano y trehalosa.

En otra forma de realización del procedimiento y/o la célula de la invención, al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos por dicha célula es un oligosacárido de leche de mamífero. Dicha célula puede producir un oligosacárido de leche de mamífero en dicha mezcla producida de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados. Dicha célula puede producir más de un oligosacárido de leche de mamífero en dicha mezcla producida de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización preferida, todos dichos oligosacáridos en la mezcla producida de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados son oligosacáridos de leche de mamífero.

Según la presente invención, el procedimiento descrito en el presente documento comprende preferentemente una etapa de separación de al menos uno de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de dicho cultivo.

La expresión "separar de dicho cultivo" significa cosechar, recolectar o recuperar cualquiera de dichos oligosacáridos de la célula y/o del medio de su crecimiento.

Uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados se puede separar de forma convencional del medio de cultivo acuoso en el que se cultivó la célula. En caso de que dicho oligosacárido todavía esté presente en las células que producen la mezcla neutra de oligosacáridos no fucosilados, se pueden utilizar formas convencionales para liberar o extraer dicho oligosacárido de las células, tales como destrucción celular usando pH alto, choque térmico, sonicación, prensa francesa, homogeneización, hidrólisis enzimática, hidrólisis química, hidrólisis con disolventes, detergente, hidrólisis,... El medio de cultivo y/o el extracto celular juntos y por separado pueden usarse después para separar dicho oligosacárido. Esto implica preferentemente clarificar dicha mezcla que contiene oligosacáridos para eliminar partículas suspendidas y contaminantes, particularmente células, componentes celulares, metabolitos insolubles y desechos producidos mediante el cultivo de la célula genéticamente modificada. En esta etapa, dicha mezcla que contiene oligosacáridos se puede clarificar de forma convencional.

Preferentemente, dicha mezcla que contiene oligosacáridos se clarifica mediante centrifugación, floculación, decantación y/o filtración. Una segunda etapa de separación de dicho oligosacárido de dicha mezcla que contiene oligosacáridos implica preferentemente eliminar sustancialmente todas las proteínas, así como péptidos, aminoácidos, ARN y ADN y cualesquiera endotoxinas y glicolípidos que puedan interferir con la etapa de separación posterior, de dicha mezcla que contiene oligosacáridos, preferentemente después de haberla clarificado. En esta etapa, las proteínas y las impurezas relacionadas se pueden eliminar de dicha mezcla que contiene oligosacáridos de forma convencional. Preferentemente, las proteínas, sales, subproductos, color y otras impurezas relacionadas se eliminan de dicha mezcla que contiene oligosacáridos mediante ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, microfiltración, tratamiento con carbón o carbono activado, filtración de alto rendimiento de flujo tangencial, ultrafiltración de flujo tangencial, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico (tal como, pero sin limitación, intercambio catiónico, intercambio aniónico, intercambio iónico de lecho mixto), cromatografía de interacción hidrofóbica y/o filtración en gel (es decir, cromatografía de exclusión por tamaño), particularmente mediante cromatografía, más particularmente mediante cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de intercambio de ligandos. Con la excepción de la cromatografía de exclusión molecular, las proteínas y las impurezas relacionadas se retienen mediante un medio cromatográfico o una membrana seleccionada, dicho oligosacárido permanece en la mezcla que contiene oligosacárido mencionada.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento y una célula en los que una mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes se produce en y/o mediante un sistema de expresión o célula fúngica, de levadura, bacteriana, de insecto, de animal y de planta tal como se describe en el presente documento. El sistema o la célula de expresión se elige de la lista que comprende una bacteria, una levadura o un hongo, o se refiere a una célula vegetal o animal. Esta última bacteria pertenece preferentemente al filo de las

proteobacterias o al filo de las firmicutes o al filo de las cianobacterias o al filo Deinococcus-Thermus. Esta última bacteria perteneciente al filo Proteobacteria pertenece preferentemente a la familia Enterobacteriaceae, preferentemente a la especie *Escherichia coli*. Esta última bacteria se refiere preferentemente a cualquier cepa perteneciente a la especie *Escherichia coli* tales como, pero sin limitación, *Escherichia coli* B, *Escherichia coli* C, *Escherichia coli* W, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* Nissle. Más específicamente, este último término se refiere a cepas de *Escherichia coli* cultivadas - designadas como cepas de *E. coli* K12, que están bien adaptadas al entorno del laboratorio y, a diferencia de las cepas naturales, han perdido su capacidad de prosperar en el intestino. Ejemplos bien conocidos de las cepas de *E. coli* K12 son K12 de tipo silvestre, W3110, MG1655, M182, MC1000, MC1060, MC1061, MC4100, JM101, NZN111 y AA200. Por lo tanto, la presente invención se refiere específicamente a una célula o cepa de *Escherichia coli* mutada y/o transformada tal como se ha indicado anteriormente en la que dicha cepa de *E. coli* es una cepa K12. De forma más preferida, la cepa de *Escherichia coli* K12 es *E. coli* MG1655. Esta última bacteria perteneciente al filo Firmicutes pertenece preferentemente a la clase Bacilli, preferentemente al orden Lactobacillales, con miembros tales como *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* o Bacillales con miembros tales como los del género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* o, *B. amyloliquefaciens*. Esta última bacteria perteneciente al filo Actinobacteria, preferentemente perteneciente a la familia Corynebacteriaceae, con miembros tales como *Corynebacterium glutamicum* o *C. afermentans*, o perteneciente a la familia Streptomycetaceae con miembros tales como *Streptomyces griseus* o *S. fradiae*. Esta última levadura pertenece preferentemente al filo Ascomycota o al filo Basidiomycota o al filo Deuteromycota o al filo Zygomycetes. Esta última levadura pertenece preferentemente al género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Komagataella*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* o *Starmerella*. Este último hongo pertenece preferentemente al género *Rhizopus*, *Dictyostelium*, *Penicillium*, *Mucor* o *Aspergillus*.

El microorganismo o la célula tal como se utiliza en el presente documento es capaz de crecer en un monosacárido, disacárido, oligosacárido, polisacárido, poliol, un medio complejo o una mezcla de los mismos como fuente principal de carbono. El término principal se refiere a la fuente de carbono más importante para los bioproductos de interés, la formación de biomasa, la formación de dióxido de carbono y/o subproductos (tales como ácidos y/o alcoholes, tales como acetato, lactato y/o etanol), es decir, el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% de todo el carbono requerido se deriva de la fuente de carbono indicada anteriormente. En una forma de realización de la invención, dicha fuente de carbono es la única fuente de carbono para dicho organismo, es decir, el 100% de todo el carbono requerido se deriva de la fuente de carbono indicada anteriormente. Las principales fuentes de carbono comunes comprenden, pero sin limitación, glucosa, glicerol, fructosa, maltosa, lactosa, arabinosa, maltooligosacáridos, maltotriosa, sorbitol, xilosa, ramnosa, sacarosa, galactosa, manosa, metanol, etanol, trehalosa, almidón, celulosa, hemicelulosa, licor de maíz, jarabe con alto contenido en fructosa, acetato, citrato, lactato y piruvato. Por medio complejo se entiende un medio cuya constitución exacta no está determinada. Algunos ejemplos son melaza, licor de maceración de maíz, peptona, triptona o extracto de levadura.

En una forma de realización preferida adicional, el microorganismo o la célula descrito en el presente documento utiliza un metabolismo dividido que tiene una ruta de producción y una ruta de biomasa tal como se describe en el documento WO2012/007481. Dicho organismo puede, por ejemplo, modificarse genéticamente para acumular fructosa-6-fosfato alterando los genes seleccionados entre el gen de la fosfoglucoisomerasa, el gen de la fosfofructoquinasa, el gen de la fructosa-6-fosfato aldolasa, el gen de la fructosa isomerasa y/o el gen de la fructosa:PEP fosfotransferasa.

En una forma de realización preferida adicional, los procedimientos tal como se describen en el presente documento también proporcionan una purificación adicional de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de la mezcla de oligosacáridos. Se puede lograr una purificación adicional de dichos oligosacáridos, por ejemplo, mediante el uso de carbón o carbono (activado), nanofiltración, ultrafiltración o intercambio iónico para eliminar cualquier ADN, proteína, LPS, endotoxinas u otras impurezas restantes. También se pueden utilizar alcoholes, tales como etanol, y mezclas acuosas de alcoholes. Otra etapa de purificación se logra mediante la cristalización, la evaporación o la precipitación del producto. Otra etapa de purificación consiste en secar, secar por pulverización o liofilizar el oligosacárido neutro no fucosilado producido.

En una forma de realización de ejemplo, la separación y purificación de al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos se realiza en un proceso que comprende las etapas siguientes en cualquier orden:

a) poner en contacto el cultivo o una versión clarificada del mismo con una membrana de nanofiltración con un corte de peso molecular (MWCO) de 600-3500 Da que garantiza la retención del/de los oligosacárido(s) producido(s) y permite el paso de al menos una parte de las proteínas y sales, subproductos, color y otras impurezas relacionadas,

b) realizar un proceso de diafiltración sobre el retenido de la etapa a), usando dicha membrana, con una solución acuosa de un electrolito inorgánico, seguido de una diafiltración opcional con agua pura para eliminar el exceso del electrolito,

c) y recoger el retenido enriquecido en el/los oligosacárido(s) en forma de sal del catión de dicho electrolito.

En una forma de realización de ejemplo alternativa, la separación y purificación de al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos se realiza en un proceso, que comprende las etapas siguientes en cualquier orden:

someter el cultivo o una versión clarificada del mismo a dos etapas de filtración por membrana usando diferentes membranas, en las que

- una membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 Dalton, y
- la otra membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 y aproximadamente 800 Dalton.

En una forma de realización de ejemplo alternativa, la separación y purificación de al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos se realiza en un proceso, que comprende las etapas siguientes en cualquier orden, que comprende la etapa de tratar el cultivo o una versión clarificada del mismo con un fuerte resina de intercambio catiónico en forma de H^+ y una resina de intercambio aniónico débil en forma de base libre.

En una forma de realización de ejemplo alternativa, la separación y purificación de al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos se realiza de la forma siguiente. El cultivo que comprende el oligosacárido producido, la biomasa, los componentes del medio y los contaminantes, y en el que la pureza del oligosacárido producido en el caldo de fermentación es < 80 por ciento, se aplica a las siguientes etapas de purificación:

- i) separación de la biomasa del cultivo,
- ii) tratamiento con intercambiador de iones catiónico para la eliminación de material cargado positivamente,
- iii) tratamiento con intercambiador de iones aniónico para la eliminación de material cargado negativamente,
- iv) etapa de nanofiltración y/o etapa de electrodiálisis,

en el que se proporciona una solución purificada que comprende los oligosacáridos producidos con una pureza superior o igual al 80 por ciento. Opcionalmente, la solución purificada se seca por pulverización.

En una forma de realización de ejemplo alternativa, la separación y purificación de al menos uno de los oligosacáridos neutros no fucosilados producidos se realiza en un proceso que comprende las etapas siguientes en cualquier orden: tratamiento enzimático del cultivo; retirada de la biomasa del cultivo; ultrafiltración; nanofiltración; y una etapa de cromatografía en columna. Preferentemente dicha cromatografía en columna es una columna única o una columna múltiple. De forma más preferida, la etapa de cromatografía en columna es cromatografía en lecho móvil simulada. Dicha cromatografía en lecho móvil simulada comprende preferentemente i) al menos 4 columnas, en las que al menos una columna comprende una resina de intercambio catiónico débil o fuerte; y/o ii) cuatro zonas I, II, III y IV con diferentes caudales; y/o iii) un eluyente que comprende agua; y/o iv) una temperatura de operación de 15 grados a 60 grados centígrados.

En una forma de realización específica, la presente invención proporciona el oligosacárido o la mezcla de oligosacáridos producidos que se secan por aspersión hasta obtener un polvo, en el que el polvo secado por aspersión contiene < 15 por ciento en peso de agua, preferentemente < 10 por ciento en peso de agua, de forma más preferida < 7 por ciento en peso de agua, de la forma más preferida < 5 por ciento en peso de agua.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una célula modificada metabólicamente tal como se describe en el presente documento para la producción de una mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes. Para la identificación de los oligosacáridos en la mezcla que comprende al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes producidos en la célula tal como se describe en el presente documento, los bloques de construcción monoméricos (por ejemplo, la composición de unidades de monosacárido o glicano), la configuración anomérica de las cadenas laterales, la presencia y la ubicación de los grupos sustituyentes, el grado de polimerización/peso molecular y el patrón de enlace pueden identificarse mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, análisis de metilación, escisión reductiva, hidrólisis, CG-EM (cromatografía de gases-espectrometría de masas), MALDI-EM (desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas), ESI-EM (ionización por electropulverización-espectrometría de masas), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta o de índice de refracción), HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada), CE (electroforesis capilar), técnicas de espectroscopia IR (infrarroja)/Raman y espectroscopia RMN (resonancia magnética nuclear). La estructura cristalina se puede resolver utilizando, por ejemplo, RMN de estado sólido, FT-IR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) y WAXS (dispersión de rayos X de ángulo grande). El grado de polimerización (DP), la distribución del DP y la polidispersidad se pueden determinar, por ejemplo, mediante viscosimetría y SEC (SEC-HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento). Para identificar los componentes monoméricos de los sacáridos se pueden utilizar procedimientos tales como, por ejemplo, hidrólisis catalizada por ácido, HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) o CGL (cromatografía gas-líquido) (después de la conversión en acetatos de alditol). Para determinar los enlaces glicosídicos, se metila el sacárido con yoduro de metilo y base fuerte en DMSO, se realiza una hidrólisis, se lleva a cabo una reducción a alditoles parcialmente metilados, se realiza una acetilación a

acetatos de alditol metilados y el análisis se realiza por CGL/EM (cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masas). Para determinar la secuencia de oligosacáridos se lleva a cabo una despolimerización parcial utilizando un ácido o enzimas para determinar las estructuras. Para identificar la configuración anomérica, el oligosacárido se somete a análisis enzimático, por ejemplo, se pone en contacto con una enzima que es específica para un tipo particular de enlace, por ejemplo, beta-galactosidasa o alfa-glucosidasa, etc., y se puede usar RMN para analizar los productos.

Productos que comprenden la mezcla de oligosacáridos

En algunas formas de realización, una mezcla de oligosacáridos producida tal como se describe en el presente documento se incorpora a un alimento (por ejemplo, alimento para seres humanos o pienso), suplemento dietético, ingrediente farmacéutico, ingrediente cosmético o medicamento. En algunas formas de realización, la mezcla de oligosacáridos se mezcla con uno o más ingredientes adecuados para alimentos, piensos, suplementos dietéticos, ingredientes farmacéuticos, ingredientes cosméticos o medicamentos. En algunas formas de realización, el suplemento dietético comprende al menos un ingrediente prebiótico y/o al menos un ingrediente probiótico.

Un "prebiótico" es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos beneficiosos para el huésped, particularmente microorganismos en el aparato gastrointestinal. En algunas formas de realización, un suplemento dietético proporciona múltiples prebióticos, incluida la mezcla de oligosacáridos producida y/o purificada mediante un proceso divulgado en la presente memoria descriptiva, para promover el crecimiento de uno o más microorganismos beneficiosos. Los ejemplos de ingredientes prebióticos para suplementos dietéticos incluyen otras moléculas prebióticas (tales como HMO) y polisacáridos vegetales (tales como inulina, pectina, b-glucano y xilooligosacárido). Un producto "probiótico" normalmente contiene microorganismos vivos que reemplazan, o se suman a, la microflora gastrointestinal, en beneficio del receptor. Los ejemplos de dichos microorganismos incluyen especies de *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*), especies de *Bifidobacterium* (por ejemplo, *B. animalis*, *B. longum* y *B. infantis* (por ejemplo, Bi-26)) y *Saccharomyces boulardii*. En algunas formas de realización, una mezcla de oligosacáridos producida y/o purificada mediante un proceso de la presente memoria descriptiva se administra por vía oral en combinación con dicho microorganismo. Los ejemplos de otros ingredientes para suplementos dietéticos incluyen disacáridos (tales como lactosa), monosacáridos (tales como glucosa y galactosa), espesantes (tales como goma arábiga), reguladores de la acidez (tales como citrato trisódico), agua, leche desnatada y aromas.

En algunas formas de realización, la mezcla de oligosacáridos se incorpora a un alimento para bebés humanos (por ejemplo, fórmula infantil). La fórmula infantil es generalmente un alimento elaborado para alimentar a neonatos como sustituto total o parcial de la leche materna humana. En algunas formas de realización, la fórmula infantil se vende en forma de polvo y se prepara para alimentar a un neonato con biberón o taza mezclándola con agua. La composición de la fórmula infantil está diseñada generalmente para imitar de forma aproximada la leche materna humana. En algunas formas de realización, una mezcla de oligosacáridos producida y/o purificada mediante un proceso de la presente memoria descriptiva se incluye en la fórmula infantil para proporcionar beneficios nutricionales similares a los proporcionados por los oligosacáridos presentes en la leche materna humana. En algunas formas de realización, la mezcla de oligosacáridos se mezcla con uno o más ingredientes de la fórmula infantil. Los ejemplos de ingredientes de fórmula infantil incluyen leche descremada, fuentes de carbohidratos (por ejemplo, lactosa), fuentes de proteínas (por ejemplo, concentrado de proteína de suero y caseína), fuentes de grasas (por ejemplo, aceites vegetales, tales como palma, aceite de cártamo con alto contenido oleico, colza, coco y/o aceite de girasol; y aceites de pescado), vitaminas (tales como vitaminas A, B₆, B₁₂, C y D), minerales (tales como citrato de potasio, citrato de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, citrato de sodio y fosfato de calcio) y posiblemente oligosacáridos de la leche humana (HMO). Dichos HMO pueden incluir, por ejemplo, DiFL, lacto-N-triosa II, LNT, LNnT, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-neofucopentaosa, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-neofucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, lacto-N-difucohexaosa II, 6'-galactosilactosa, 3'-galactosilactosa, lacto-N-hexaosa y lacto-N-neohexaosa.

En algunas formas de realización, uno o más ingredientes de la fórmula infantil comprenden leche descremada, una fuente de carbohidratos, una fuente de proteínas, una fuente de grasas y/o una vitamina y minerales.

En algunas formas de realización, uno o más ingredientes de la fórmula infantil comprenden lactosa, concentrado de proteína de suero y/o aceite de cártamo con alto contenido oleico.

En algunas formas de realización, la concentración de la mezcla de oligosacáridos en la fórmula infantil es aproximadamente la misma concentración que la concentración de oligosacáridos generalmente presente en la leche materna humana. En algunas formas de realización, la concentración de cada uno de los oligosacáridos individuales en la mezcla de oligosacáridos en la fórmula infantil es aproximadamente la misma concentración que la concentración de ese oligosacárido presente en general en la leche materna humana.

En algunas formas de realización, la mezcla de oligosacáridos se incorpora a una preparación alimenticia, en la que dicho alimento se elige de la lista que comprende alimento para mascotas, sustituto de la leche animal, producto veterinario, alimento posdestete o alimentación de fluencia.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos anteriormente y que se describen a continuación son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Generalmente, las etapas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante.

Otras ventajas se desprenden de las formas de realización específicas y de los ejemplos. Naturalmente, las características mencionadas anteriormente y las características que se explicarán a continuación se pueden utilizar no solo en las combinaciones indicadas en cada caso, sino también en otras combinaciones o por sí mismas, sin apartarse del alcance de la presente invención.

La presente invención se refiere a una célula modificada metabólicamente que produce una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes, en la que dicha célula

- expresa al menos tres glicosiltransferasas, y
- es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s), en la que dichos azúcar(es) nucleotídico(s) es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas.

En una forma de realización adicional y/o alternativa, dicha célula está modificada con módulos de expresión génica, caracterizada por que la expresión de cualquiera de dichos módulos de expresión es constitutiva o se crea mediante un inductor natural. En una forma de realización adicional y/o alternativa, dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos tres oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes que difieren en el grado de polimerización.

En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas se elige de la lista que comprende galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, ramnosiltransferasas. En una forma de realización adicional y/o alternativa, dicha célula está modificada en la expresión o la actividad de al menos una de dichas glicosiltransferasas. En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas es una N-acetilglucosaminiltransferasa y uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos donadores es UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas es una galactosiltransferasa y uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos donadores es UDP-galactosa (UDP-Gal). En una forma de realización adicional y/o preferida, uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos se elige de la lista que comprende UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa, UDP-xilosa. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha mezcla comprende al menos un oligosacárido neutro no fucosilado que está galactosilado, glucosilado, xilosilado, manosilado, contiene una N-acetilglucosamina, contiene una N-acetilgalactosamina, contiene una ramnosa y/o contiene una N-acetilmanosamina. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos un oligosacárido que comprende una unidad de monosacárido de N-acetilglucosamina. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos un oligosacárido galactosilado. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula se modifica genéticamente adicionalmente para

- i) la expresión modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
- ii) la actividad modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
- iii) la expresión de una proteína de membrana homóloga, y/o
- iv) la expresión de una proteína de membrana heteróloga,

en la que dicha proteína de membrana está involucrada en la secreción de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de dicha mezcla al exterior de dicha célula. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula se modifica genéticamente adicionalmente para

- i) la expresión modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
- ii) la actividad modificada de una proteína de membrana endógena, y/o
- iii) la expresión de una proteína de membrana homóloga, y/o
- iv) la expresión de una proteína de membrana heteróloga,

en el que dicha proteína de membrana está involucrada en la absorción de un precursor para la síntesis de cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula produce un precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización adicional y/o preferida, uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados es un oligosacárido de leche de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, todos dichos oligosacáridos neutros no fucosilados son oligosacáridos de leche de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula se selecciona del grupo que consiste en células de microorganismos, plantas o animales, en la que preferentemente dicho microorganismo es una bacteria, un hongo o una levadura, en la que preferentemente dicha planta es arroz, algodón, colza, soja, maíz o planta de maíz, en la que preferentemente dicho animal es un insecto, pez, ave o mamífero no humano, siendo preferentemente dicha célula animal una línea celular de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula es una célula de una bacteria, preferentemente de una cepa de *Escherichia coli*, de forma más preferida de una cepa de *Escherichia coli* que es una cepa K-12, de forma incluso más preferida la cepa de *Escherichia coli* K-12 es *E. coli* MG1655. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula es una célula de levadura.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes mediante una célula, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- i) proporcionar una célula que expresa al menos tres glicosiltransferasas y es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s), en el que dicho(s) azúcar(es) nucleotídico(s) es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas,
- ii) cultivar dicha célula en condiciones que permitan expresar dichas glicosiltransferasas y sintetizar dichos azúcares nucleotídicos,
- iii) preferentemente, separar al menos uno de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de dicho cultivo.

En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula es una célula modificada metabólicamente tal como se describe en el presente documento. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos tres oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes que difieren en el grado de polimerización. En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas se elige de la lista que comprende galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, ramnosiltransferasas. En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas es una N-acetilglucosaminiltransferasa y uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos donadores es UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). En una forma de realización adicional y/o preferida, una cualquiera de dichas glicosiltransferasas es una galactosiltransferasa y uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos donadores es UDP-galactosa (UDP-Gal). En una forma de realización adicional y/o preferida, uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos se elige de la lista que comprende UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa, UDP-xilosa. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos un oligosacárido que comprende una unidad de monosacárido de N-acetilglucosamina. En una forma de realización adicional y/o preferida, la mezcla de oligosacáridos comprende al menos un oligosacárido galactosilado. En una forma de realización adicional y/o preferida, uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados está galactosilado, glucosilado, xilosilado, manosilado, contiene una N-acetilglucosamina, contiene una N-acetilgalactosamina, contiene una ramnosa y/o contiene una N-acetilmanosamina. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula usa al menos un precursor para la síntesis de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos, preferentemente dicha célula usa dos o más precursores para la síntesis de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula produce un precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización adicional y/o preferida, uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados es un oligosacárido de leche de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, todos dichos oligosacáridos neutros no fucosilados son oligosacáridos de leche de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicho precursor para la síntesis de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados se convierte completamente en uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha separación comprende al menos una de las etapas siguientes: clarificación, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, microfiltración, tratamiento con carbón o carbono activado, filtración de alto rendimiento de flujo tangencial, ultrafiltración de flujo tangencial, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofoba y/o filtración en gel, cromatografía de intercambio de ligandos. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicho procedimiento comprende además la purificación de uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados a partir de dicha célula. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha purificación comprende al menos una de las etapas siguientes: uso de carbón o carbono activado, uso de carbón vegetal, nanofiltración, ultrafiltración o intercambio iónico, uso de alcoholes, uso de mezclas acuosas de alcoholes, cristalización, evaporación, precipitación, secado, secado por pulverización o liofilización. En

una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula se selecciona del grupo que consiste en células de microorganismos, plantas o animales, en la que preferentemente dicho microorganismo es una bacteria, un hongo o una levadura, en la que preferentemente dicha planta es arroz, algodón, colza, soja, maíz o planta de maíz, en la que preferentemente dicho animal es un insecto, pez, ave o mamífero no humano, siendo preferentemente dicha célula animal una línea celular de mamífero. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula es una célula de una bacteria, preferentemente de una cepa de *Escherichia coli*, de forma más preferida de una cepa de *Escherichia coli* que es una cepa K-12, en la que de forma incluso más preferida la cepa de *Escherichia coli* K-12 es *E. coli* MG1655. En una forma de realización adicional y/o preferida, dicha célula es una célula de levadura.

La presente invención se refiere además al uso de una célula tal como se describe en el presente documento, o el uso de un procedimiento tal como se describe en el presente documento, para la producción de una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes.

La invención se describirá con más detalle en los ejemplos.

Los ejemplos siguientes servirán como ilustración y aclaración adicional de la presente invención y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos *Escherichia coli*

Medios

El medio Luria Broth (LB) consistía en el 1% de triptona peptona (Difco, Erembodegem, Bélgica), el 0,5% de extracto de levadura (Difco) y el 0,5% de cloruro de sodio (VWR, Lovaina, Bélgica). El medio mínimo utilizado en los experimentos de cultivo en placas de 96 pocillos o en matraces agitados contenía 2,00 g/l de NH₄Cl, 5,00 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2,993 g/l de KH₂PO₄, 7,315 g/l de K₂HPO₄ y 8,372 g/l de MOPS, 0,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de MgSO₄·7H₂O, 30 g/l de sacarosa o 30 g/l de glicerol, 1 ml/l de solución de vitamina, 100 µl/l de solución de molibdato y 1 ml/l de solución de selenio. Tal como se especifica en los ejemplos respectivos, se añadieron adicionalmente al medio 20 g/l de lactosa, 20 g/l de LacNAc y/o 20 g/l de LNB como precursor(es). El medio mínimo se ajustó a un pH de 7 con KOH 1 M. La solución de vitaminas consistía en 3,6 g/l de FeCl₂·4H₂O, 5 g/l de CaCl₂·2H₂O, 1,3 g/l de MnCl₂·2H₂O, 0,38 g/l de CuCl₂·2H₂O, 0,5 g/l de CoCl₂·6H₂O, 0,94 g/l de ZnCl₂, 0,0311 g/l de H₃BO₄, 0,4 g/l de Na₂EDTA·2H₂O y 1,01 g/l de tiamina·HCl. La solución de molibdato contenía 0,967 g/l de NaMoO₄·2H₂O. La solución de selenio contenía 42 g/l de SeO₂.

El medio mínimo para las fermentaciones contenía 6,75 g/l de NH₄Cl, 1,25 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2,93 g/l de KH₂PO₄ y 7,31 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de MgSO₄·7H₂O, 30 g/l de sacarosa o 30 g/l de glicerol, 1 ml/l de solución de vitamina, 100 µl/l de solución de molibdato y 1 ml/l de solución de selenio con la misma composición descrita anteriormente. Tal como se especifica en los ejemplos respectivos, se añadieron adicionalmente al medio 20 g/l de lactosa, 20 g/l de LacNAc y/o 20 g/l de LNB como precursor(es).

El medio complejo se esterilizó en autoclave (121 °C, 21 min) y el medio mínimo mediante filtración (0,22 µm Sartorius). Cuando fue necesario, el medio se hizo selectivo añadiendo un antibiótico: por ejemplo cloranfenicol (20 mg/l), carbenicilina (100 mg/l), espectinomicina (40 mg/l) y/o kanamicina (50 mg/l).

Plásmidos

Los plásmidos pKD46 (plásmido auxiliar Red, resistencia a ampicilina), pKD3 (contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (cat) flanqueado por FRT), pKD4 (contiene un gen de resistencia a kanamicina (kan) flanqueado por FRT) y pCP20 (expresa actividad de FLP recombinasa) se obtuvieron del Prof. R. Cunin (Vrije Universiteit Brussel, Bélgica en 2007). Los plásmidos se mantuvieron en el huésped. *E. coli* DH5alfa (F, phi80d/*acZΔM15*, Δ(*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, lambda⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) comprado en Invitrogen.

Cepas y mutaciones

Se obtuvo *Escherichia coli* K12 MG1655 [A⁻, f⁻, rph-1] del Coli Genetic Stock Center (Estados Unidos), N^o de referencia de la cepa CGSC: 7740, en marzo de 2007. Las alteraciones de genes, las introducciones de genes y los reemplazos de genes se realizaron utilizando la técnica publicada por Datsenko y Wanner (PNAS 97 (2000), 6640-6645). Esta técnica se basa en la selección de antibióticos tras una recombinación homóloga realizada por la recombinasa lambda Red. La catálisis posterior de una flippasa recombinasa garantiza la eliminación del casete de selección de antibiótico en la cepa de producción final. Los transformantes que portaban un plásmido auxiliar Red pKD46 se cultivaron en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 mg/l) y L-arabinosa (10 mM) a 30 °C hasta una DO₆₀₀ nm de 0,6. Las células se hicieron electrocompetentes lavándolas con 50 ml de agua helada, una primera vez, y con 1 ml de agua helada, una segunda vez. Después, las células se resuspendieron en 50 µl de agua helada. La electroporación se realizó con 50 µl de células y 10-100 ng de producto de ADN bicatenario lineal utilizando un Gene Pulser™ (BioRad) (600 Ω, 25 µFD

y 250 voltios). Después de la electroporación, las células se añadieron a 1 ml de medio LB, se incubaron durante 1 hora a 37 °C y finalmente se extendieron sobre agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol o 50 mg/l de kanamicina para seleccionar transformantes resistentes a antibióticos. Los mutantes seleccionados se verificaron mediante PCR con cebadores cadena arriba y cadena abajo de la región modificada y se cultivaron en agar LB a 42 °C para detectar la pérdida del plásmido auxiliar. Se comprobó la sensibilidad a ampicilina de los mutantes. Los amplicones lineales de ADN-bc se obtuvieron mediante PCR utilizando pKD3, pKD4 y sus derivados como plantilla. Los cebadores utilizados tenían una parte de la secuencia complementaria a la plantilla y otra parte complementaria al lado del ADN cromosómico en el que debe tener lugar la recombinación. Para la inactivación genómica, la región de homología se diseñó 50 nt cadena arriba y 50 nt cadena abajo del codón de inicio y de detención del gen de interés. Para la inserción genómica, se debía respetar el punto de partida transcripcional (+1). Los productos de la PCR se purificaron por PCR, se digirieron con DpnI, se volvieron a purificar en un gel de agarosa y se suspendieron en tampón de elución (Tris 5 mM, pH 8,0). Los mutantes seleccionados se transformaron con el plásmido pCP20, que es un plásmido resistente a ampicilina y cloranfenicol que muestra replicación sensible a la temperatura e inducción térmica de la síntesis de FLP. Los transformantes resistentes a ampicilina se seleccionaron a 30°C, después de lo cual algunos se purificaron en colonias en LB a 42°C y después se analizaron para determinar la pérdida de toda resistencia a antibióticos y del plásmido auxiliar FLP. Las inactivaciones e inserciones génicas se verifican con cebadores de control.

Para producir lactosa (Gal-b1,4-Glc), la cepa mutante se derivó de *E. coli* K12 MG1655 y se modificó con inactivaciones genómicas de los genes de *E. coli lacZ*, *glk* y el operón de *E. coli galETKM*, junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para el gen de N-acetilglucosamina beta-1,4-galactosiltransferasa (IgtB) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09 y UDP-glucosa 4-epimerasa (galE) de *E. coli* con la SEQ ID NO 10.

Para producir lacto-N-triosa (LN3, LNT-II, GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc) y oligosacáridos neutros no fucosilados que se originan a partir de la misma que comprenden lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neotetraosa (LNnT), la cepa mutante se derivó de *E. coli* K12 MG1655 y se modificó con una inactivación de los genes de *E. coli LacZ* y *nagB* y con una inserción genómica de una unidad transcripcional constitutiva para galactósido beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (LgtA) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07. Para la producción de LNT o LNnT, la cepa mutante se modifica adicionalmente con unidades transcripcionales constitutivas para la N-acetilglucosamina beta-1,3-galactosiltransferasa (WbgO) de *E. coli* O55:H7 con la SEQ ID NO 08 o la N-acetilglucosamina beta-1,4-galactosiltransferasa (LgtB) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09, respectivamente, que pueden suministrarse a la cepa mediante inserción genómica o desde un plásmido de expresión. Opcionalmente, se podrían añadir múltiples copias de los genes *LgtA*, *wbgO* y/o *LgtB* a las cepas de *E. coli* mutantes. Además, la producción de LNT y/o LNnT puede potenciarse mediante la producción mejorada de UDP-GlcNAc mediante la modificación de las cepas con una o más inserciones genómicas de una unidad transcripcional constitutiva para la L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa mutante glmS*54 de *E. coli* con la SEQ ID NO 06 (que se diferencia de la glmS de tipo silvestre en una mutación A39T, una mutación R250C y una mutación G472S). Además, las cepas pueden modificarse opcionalmente para potenciar la producción de UDP-galactosa con inactivaciones genómicas de los genes *ushA* y *galT* de *E. coli*. Las cepas de *E. coli* mutantes también se pueden adaptar opcionalmente con una inserción genómica de una unidad transcripcional constitutiva para la UDP-glucosa-4-epimerasa (galE) de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, la fosfogalactosaminasa mutasa (glmM) de *E. coli* con la SEQ ID NO 17 y la N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa/glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa (glmU) de *E. coli* con la SEQ ID NO 18. Las cepas mutantes también podrían adaptarse opcionalmente para el crecimiento en sacarosa mediante inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas que contienen un transportador de sacarosa (CscB) de *E. coli* W con la SEQ ID NO 01, una fructosa quinasa (Frk) procedente de *Z. mobilis* con la SEQ ID NO 02 y una sacarosa fosforilasa procedente de *B. adolescentis* con la SEQ ID NO 03.

Para producir N-acetilglucosamina (LacNAc, Gal-b-1,4-GlcNAc) o lacto-N-biosa (LNB, Gal-b1,3-GlcNAc), las cepas mutantes se derivaron de *E. coli* K12 MG1655 que comprende inactivaciones de los genes de *E. coli nagA* y *nagB* y una inserción genómica de una unidad transcripcional constitutiva que contiene una glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa (GNA1) de *Saccharomyces cerevisiae* con la SEQ ID NO 05. Las cepas mutantes se modificaron adicionalmente con unidades transcripcionales constitutivas para la N-acetilglucosamina beta-1,3-galactosiltransferasa (WbgO) de *E. coli* O55:1-17 con la SEQ ID NO 08 para producir LNB o la N-acetilglucosamina beta-1,4-galactosiltransferasa (LgtB) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09 para producir LacNAc. Esas unidades transcripcionales para WbgO y LgtB pueden suministrarse a las cepas mediante inserción genómica o desde un plásmido de expresión. Opcionalmente, se podrían añadir múltiples copias de los genes *wbgO* y/o *LgtB* a las cepas de *E. coli* mutantes. Opcionalmente, las cepas mutantes pueden modificarse con una unidad transcripcional constitutiva para la variante mutada de la L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa (glmS*54) de *E. coli* con la SEQ ID NO 06 para potenciar la síntesis de UDP-GlcNAc. Opcionalmente, las cepas mutantes pueden modificarse adicionalmente con una unidad transcripcional constitutiva para la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19 para potenciar la producción de GlcNAc. Además, las cepas pueden modificarse opcionalmente para potenciar la producción de UDP-galactosa con inactivaciones genómicas de los genes *ushA* y *galT* de *E. coli*. Las cepas de *E. coli* mutantes también se pueden adaptar opcionalmente con una inserción genómica de una unidad transcripcional constitutiva para la UDP-glucosa-4-epimerasa (galE) de *E. coli* con la SEQ ID NO 10. Las cepas mutantes también pueden adaptarse opcionalmente para el crecimiento en sacarosa mediante inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas que contienen un transportador de sacarosa (CscB) de *E. coli* W con la SEQ ID NO 01,

una fructosa quinasa (Frk) procedente de *Z. mobilis* con la SEQ ID NO 02 y una sacarosa fosforilasa procedente de *B. adolescentis* con la SEQ ID NO 03.

Preferentemente, pero no necesariamente, las glicosiltransferasas se fusionaron en el extremo N-terminal a una etiqueta MBP para mejorar su solubilidad (Fox et al., Protein Sci. 2001, 10(3), 622-630).

Todos los promotores constitutivos, UTR y secuencias terminadoras se originaron a partir de las bibliotecas descritas por Mutalik et al (Nat. Methods 2013, N° 10, 354-360) y Cambray et al. (Nucleic Acids Res. 2013, 41(9), 5139-5148). Todos los genes se ordenaron sintéticamente en Twist Bioscience (twistbioscience.com) o IDT (eu.idtdna.com) y el uso de codones se adaptó utilizando las herramientas del proveedor.

Todas las cepas se almacenaron en crioviales a -80 °C (cultivo en LB durante la noche mezclado en una proporción 1:1 con glicerol al 70%).

15 **Condiciones de cultivo**

Se inició un precultivo de experimentos en placas de microtitulación de 96 pocillos a partir de un criovial, en 150 µl de LB y se incubó durante la noche a 37 °C en un agitador orbital a 800 rpm. Este cultivo se utilizó como inóculo para una placa de microtitulación cuadrada de 96 pocillos, con 400 µl de medio mínimo mediante dilución 400x. Después, estas placas de cultivo finales de 96 pocillos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital a 800 rpm durante 72 h, o menos, o más. Para medir las concentraciones de azúcar al final del experimento de cultivo, se tomaron muestras de caldo completo de cada pocillo hirviendo el caldo de cultivo durante 15 minutos a 60 °C antes de centrifugar las células (= promedio de las concentraciones de azúcar intracelular y extracelular).

Se inició un precultivo para el biorreactor a partir de un criovial entero de 1 ml de una determinada cepa, se inoculó en 250 ml o 500 ml de medio mínimo en un matraz con agitación de 1 l o de 2,5 l y se incubó durante 24 h a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Después se inoculó un biorreactor de 5 l (250 ml de inóculo en 2 l de medio discontinuo); el proceso se controló mediante el programa informático de control MFCS (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania). Las condiciones de cultivo se fijaron en 37 °C y agitación máxima; los caudales de gas a presión dependieron de la cepa y del biorreactor. El pH se controló a 6,8 usando H₂SO₄ 0,5 M y NH₄OH al 20%. Los gases de escape se enfriaron. Se añadió una solución al 10% de agente antiespumante de silicona cuando se produjo espuma durante la fermentación.

35 **Densidad óptica**

La densidad celular de los cultivos se supervisó frecuentemente midiendo la densidad óptica a 600 nm (Implen Nanophotometer NP80, Westburg, Bélgica o con un lector de microplacas Spark 10M, Tecan, Suiza).

40 **Análisis analítico**

Los patrones tales como, pero sin limitación, sacarosa, lactosa, N-acetilactosamina (LacNAc), lacto-N-biosa (LNB), lacto-N-triosa II (LN3), lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neo-tetraosa (LNnT) se adquirieron de Carbosynth (Reino Unido), Elicityl (Francia) e IsoSep (Suecia). Otros compuestos se analizaron con patrones elaborados internamente.

Los oligosacáridos se analizaron en un UPLC Waters Acquity clase H con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) o detección de índice de refracción (RI). Se inyectó un volumen de 0,7 µl de muestra en una columna Waters Acquity UPLC BEH Amide (2,1 × 100 mm; 130 Å; 1,7 µm) con una columna Acquity UPLC BEH Amide VanGuard, 130 Å, 2,1 × 5 mm. La temperatura de la columna fue de 50°C. La fase móvil consistía en una solución de un % de agua y un % de acetonitrilo a la que se añadió el 0,2% de trietilamina. El procedimiento fue isocrático con un flujo de 0,130 ml/min. El detector ELS tenía una temperatura del tubo de deriva de 50 °C y la presión del gas N₂ era de 50 psi, la ganancia de 200 y la velocidad de datos de 10 pps. La temperatura del detector RI se fijó en 35 °C.

Los oligosacáridos también se analizaron en un UPLC Waters Acquity clase H con detección de índice de refracción (RI). Se inyectó un volumen de 0,5 µl de muestra en una columna Waters Acquity UPLC BEH Amide (2,1 × 100 mm; 130 Å; 1,7 µm). La temperatura de la columna fue de 50°C. La fase móvil consistía en una mezcla del 72% de acetonitrilo y el 28% de tampón de acetato de amonio (100 mM) a la que se añadió el 0,1% de trietilamina. El procedimiento fue isocrático con un flujo de 0,260 ml/min. La temperatura del detector RI se fijó en 35 °C.

Para el análisis en un espectrómetro de masas, se utilizó un Waters Xevo TQ-MS con ionización por pulverización electrónica (ESI) con una temperatura de desolvatación de 450 °C, un flujo de gas de desolvatación de nitrógeno de 650 l/h y un voltaje de cono de 20 V. La EM se operó en monitoreo de iones seleccionados (SIM) en modo negativo para todos los oligosacáridos. La separación se realizó en un UPLC Waters Acquity con una columna Thermo Hypercarb (2,1 × 100 mm; 3 µm) a 35 °C. Se usó un gradiente en el que el eluyente A era agua ultrapura con el 0,1% de ácido fórmico y en el que el eluyente B era acetonitrilo con el 0,1% de ácido fórmico. Los oligosacáridos se separaron en 55 min utilizando el gradiente siguiente: un aumento inicial del 2 al 12% del eluyente B a lo largo de un periodo de 21 min, un segundo aumento del 12 al 40% del eluyente B a lo largo de un periodo de 11 min y un tercer

aumento del 40 al 100% del eluyente B a lo largo de un periodo de 5 min. Como etapa de lavado se utilizó el 100% del eluyente B durante 5 min. Para el equilibrio de la columna, la condición inicial del 2% de eluyente B se restableció en 1 min y se mantuvo durante 12 min.

Los azúcares en concentraciones bajas (inferiores a 50 mg/l) se analizaron en un sistema Dionex HPAEC con detección amperométrica pulsada (PAD). Se inyectó un volumen de 5 µl de muestra en una columna Dionex CarboPac PA200 de 4 x 250 mm con una columna protectora Dionex CarboPac PA200 de 4 x 50 mm. La temperatura de la columna se ajustó a 30 °C. Se usó un gradiente en el que el eluyente A era agua desionizada, en el que el eluyente B era hidróxido de sodio 200 mM y en el que el eluyente C era acetato de sodio 500 mM. Los oligosacáridos se separaron en 60 min manteniendo mientras una proporción constante del 25% del eluyente B mediante el uso del gradiente siguiente: una etapa isocrática inicial mantenida durante 10 min del 75% de eluyente A, un aumento inicial del 0 al 4% de eluyente C a lo largo de un periodo de 8 min, una segunda etapa isocrática mantenida durante 6 min del 71% de eluyente A y el 4% de eluyente C, un segundo aumento del 4 al 12% de eluyente C a lo largo de un periodo de 2,6 min, una tercera etapa isocrática mantenida durante 3,4 min del 63% de eluyente A y el 12% de eluyente C y un tercer aumento del 12 al 48% de eluyente C a lo largo de un periodo de 5 min. Como etapa de lavado se utilizó el 48% de eluyente C durante 3 min. Para el equilibrio de la columna, la condición inicial del 75% de eluyente A y el 0% de eluyente C se restableció en 1 min y se mantuvo durante 11 min. El flujo aplicado fue de 0,5 ml/min.

Ejemplo 2. Materiales y procedimientos *Saccharomyces cerevisiae*

Medios

Las cepas se cultivaron en medio de levadura definido sintético (SD) con mezcla de suplemento completa (CSM) (SD CSM) o CSM con mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas (*drop out*) (SD CSM-His) que contenía 6,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (YNB sin AA, Difco), 20 g/l de agar (Difco) (cultivos sólidos), 22 g/l de glucosa monohidrato o 20 g/l de lactosa y 0,79 g/l de CSM o 0,77 g/l de CSM-His (MP Biomedicals).

Cepas

Se usó *S. cerevisiae* BY4742 creada por Brachmann et al. (Yeast (1998) 14:115-32), disponible en la colección de cultivos Euroscarf. Todas las cepas mutantes se crearon mediante recombinación homóloga o transformación con plásmidos utilizando el procedimiento de Gietz (Yeast 11:355-360, 1995).

Plásmidos

Para producir UDP-galactosa, se derivó un plásmido de expresión de levadura de la serie de plásmidos pRS420 (Christianson et al., 1992, Gene 110: 119-122.) que contiene el marcador de selección HIS3 y una unidad transcripcional constitutiva para galE de *E. coli* con la SEQ ID NO 10. Para producir LN3 y oligosacáridos derivados de LN3 tales como LNT o LNTnT, este plásmido se modificó adicionalmente con unidades transcripcionales constitutivas para la permeasa de lactosa LAC12 de *K. lactis* con la SEQ ID NO 11, el galactósido beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (IgtA) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y la N-acetilglucosamina beta-1,3-galactosiltransferasa (WbgO) de *E. coli* O55:H7 con la SEQ ID NO 08 o la N-acetilglucosamina beta-1,4-galactosiltransferasa (IgtB) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09, respectivamente.

Preferentemente, pero no necesariamente, las glicosiltransferasas se fusionaron en el extremo N-terminal a una etiqueta SUMOstar (por ejemplo, obtenida de pYSUMOstar, Life Sensors, Malvern, PA) para mejorar su solubilidad.

Los plásmidos se mantuvieron en el huésped *E. coli* DH5alpha (F, phi80d/*lacZ*deltaM15, delta(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, lambda⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) comprado en Invitrogen.

Expresión heteróloga y homóloga

Los genes que se necesitaba expresar, ya fuera a partir de un plásmido o del genoma, se sintetizaron sintéticamente con una de las siguientes empresas: DNA2.0, Gen9, IDT o Twist Bioscience. La expresión podría facilitarse adicionalmente optimizando el uso de codones al uso de codones del huésped de expresión. Los genes se optimizaron utilizando las herramientas del proveedor.

Condiciones de cultivo

En general, las cepas de levadura se cultivaron inicialmente en placas SD CSM para obtener colonias individuales. Estas placas se cultivaron durante 2-3 días a 30°C. Partiendo de una única colonia, se cultivó un precultivo durante la noche en 5 ml a 30 °C, con agitación a 200 rpm. Se inocularon experimentos posteriores en matraces agitados de 125 ml con el 2% de este precultivo, en 25 ml de medio. Estos matraces de agitación se incubaron a 30 °C con una agitación orbital de 200 rpm.

Promotores de expresión genética

Los genes se expresaron utilizando promotores constitutivos sintéticos, tal como se describe por Blazeck (Biotechnology and Bioengineering, Vol. 109, Nº 11, 2012).

5 Ejemplo 3 (ejemplo de referencia). Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 se modificó con una inactivación del gen de *E. coli* *nagB* junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para la fosfatasa *yqaB* de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, *GNA1* con la SEQ ID NO 05 de *S. cerevisiae* y *LgtB* con SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis* para producir LacNAc. En una etapa siguiente, la nueva cepa se transformó adicionalmente con un plásmido de expresión que contenía una unidad transcripcional constitutiva para la galactósido beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (*LgtA*) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07. Mediante la acción posterior de las enzimas homólogas *EcGlmS*, *EcGlmM* y *EcGlmU*, la cepa mutante produce UDP-GlcNAc, que la utiliza la proteína *LgtA* heteróloga para modificar LacNAc, lo que da lugar a la producción de GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n que están formadas por unidades repetidas de N-acetil-lactosamina que están unidas en beta1,3 entre sí, en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono.

20 Ejemplo 4. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc, beta-Gal-(1,4)-beta-GlcNAc-(1,3)-[beta-GlcNAc-(1,6)]-beta-Gal-(1,4)-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc con un huésped de E. coli modificado

La cepa de *E. coli* mutante tal como se ha descrito en el ejemplo 3 se modificó adicionalmente con un segundo plásmido de expresión que contenía una unidad transcripcional constitutiva para la N-acetilglucosaminiltransferasa *GCNT2* humana con la SEQ ID NO 12. Cuando se evaluó en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1 en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono, la nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc, GlcNAc-b1,6-Gal-b1,4-GlcNAc, estructuras de (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y beta-Gal-(1,4)-beta-GlcNAc-(1,3)-[beta-GlcNAc-(1,6)]-beta-Gal-(1,4)-GlcNAc en muestras de caldo completo.

Ejemplo 5. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-LacNAc, LN3, LNnT y Gala1,3-LNnT con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* modificada para producir LacNAc tal como se ha descrito en el ejemplo 3 se modificó adicionalmente con una inactivación genómica del gen de *E. coli* *lacZ* y se transformó con un plásmido de expresión compatible que contenía una unidad transcripcional constitutiva para el dominio catalítico C-terminal de la alfa-1,3-galactosiltransferasa bovina (*a3FTcd*) con la SEQ ID NO 13. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-LacNAc (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc), LN3, LNnT y Gal-a1,3-LNnT (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc) en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor.

45 Ejemplo 6. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc (Galb1,4-GlcNAc)_n y poli-LacNAc GalNAc-ilada con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 se modificó con una inactivación de los genes de *E. coli* *nagB* y *lacZ* junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para el *glmS**54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, *GNA1* con la SEQ ID NO 05 de *S. cerevisiae*, la fosfatasa *yqaB* de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, el galactósido beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (*LgtA*) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, *LgtB* con la SEQ ID NO 09, la 4-epimerasa (*WbpP*) de *Pseudomonas aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y la β 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (*LgtD*) de *Haemophilus influenzae* con la SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo comprende glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor, la nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc, es decir, (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y estructuras de poli-LacNAc GalNAc-ilada.

60 Ejemplo 7. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LNB, LN3, LNT, GalNAc-b1,3-lactosa, Galb1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-LNB y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNB con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* se modificó con inactivación genómica del gen de *E. coli* *nagB* e inserciones genómicas de casetes de expresión constitutivos para la fosfatasa *yqaB* de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, *GNA1* con la SEQ ID NO 05 de *S. cerevisiae* y *WbgO* con la SEQ ID NO 08 de *E. coli* O55:H7 para producir LNB. En la etapa siguiente, el LNB que

produce la cepa de *E. coli* se modifica adicionalmente con una inactivación del gen de *E. coli lacZ* y con inserciones de unidades de expresión constitutivas para la 4-epimerasa (WbpP) de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14, el galactósido beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (LgtA) de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y la β 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (LgtD) de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo comprende glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor, la nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LNB, LN3, LNT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-b1,3-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-LNB y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNB.

Ejemplo 8. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LNT, LNnT y estructuras poligalactosiladas en un huésped de E. coli modificado cuando se evalúa en fermentaciones de alimentación por lotes

Una cepa de *E. coli* modificada para producir LNnT tal como se ha descrito en el ejemplo 1, se modifica adicionalmente con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para WbgO de *E. coli* O55:H7 con la SEQ ID NO 08. En una etapa siguiente, la nueva cepa se evalúa en un proceso de fermentación de alimentación por lotes en un biorreactor de 5 litros tal como se ha descrito en el ejemplo 1. En este ejemplo se usa sacarosa como fuente de carbono y se añade lactosa en el medio discontinuo como precursor. Se toman muestras de caldo regulares y los azúcares producidos se miden tal como se ha descrito en el ejemplo 1. El análisis UPLC muestra que el caldo de fermentación de la cepa seleccionada tomada en puntos temporales regulares en la fase de alimentación por lotes contiene una mezcla de oligosacáridos que comprende lacto-N-triosa II (LN3), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-tetraosa (LNT), para-lacto-N-neopentaosa, para-lacto-N-pentaosa, para-lacto-N-neohexaosa, para-lacto-N-hexaosa, beta-(1,3)galactosil-para-lacto-N-neopentaosa y beta-(1,4)galactosil-para-lacto-N-pentaosa.

Ejemplo 9. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende estructuras de lactosa galactosilada y GalNAc-ilada con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* optimizada para UDP-galactosa tal como se ha descrito en el ejemplo 1, se modifica adicionalmente con una inactivación del gen de *E. coli lacZ* y una inserción de una unidad de expresión constitutiva para la α 1,4-galactosiltransferasa (LgtC) de *Neisseria gonorrhoeae* con la SEQ ID NO 16 para producir lactosa alfa-1,4-galactosilada (Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc) cuando se cultiva en glicerol y lactosa. En una etapa siguiente, la cepa mutante se transforma con un plásmido de expresión que comprende unidades de expresión constitutivas para WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. Además de su actividad de β 1,3-N-Acetil-galactosaminiltransferasa, la enzima HiLgtD también tiene actividad de β 1,3-galactosiltransferasa y puede añadir una galactosa a una molécula de GalNAc terminal no reductora, dando como resultado una Galb1,3-GalNAc terminal en el extremo no reductor de un glicano. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc (Gal- α 1,4-lactosa), GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc (GalNAc-b1,3-lactosa), Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc (globo-N-tetraosa) y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc cuando se evalúa en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor.

Ejemplo 10. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNT, GalNAc-b1,3-LNT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* modificada para producir LNT tal como se ha descrito en el ejemplo 1 se modifica adicionalmente con inserciones de unidades de expresión constitutivas para WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNT, GalNAc-b1,3-LNT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento, según las condiciones de cultivo del ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor.

Ejemplo 11. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa y estructuras de (GalNAc)-poli-LNnT con un huésped de E. coli modificado

Una cepa de *E. coli* modificada para producir LNnT tal como se ha descrito en el ejemplo 1 se modifica adicionalmente con inserciones de unidades de expresión constitutivas para WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, así como estructuras de poli-LNnT (mediante actividad alternativa de NmlgtA y NmlgtB) y estructuras de poli-LNnT galNAc-ilada (mediante actividad adicional de HiLgtD) en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo del ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono y lactosa como precursor.

Ejemplo 12. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-LacNAc, LN3, LNnT y Gala1,3-LNnT con un huésped de E. coli modificado

Se modificó una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 con inactivaciones genómicas de los genes de *E. coli lacZ*, *glk* y el operón de *E. coli galETK*, junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para *lgtB* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09 y la UDP-glucosa 4-epimerasa (*galE*) de *E. coli* con la SEQ ID NO 10 para producir lactosa (Gal-b1,4-Glc). En las etapas siguientes, la cepa mutante se modificó adicionalmente con una inactivación del gen de *E. coli nagB* junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para el *glmS**54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli* y *GNA1* con la SEQ ID NO 05 de *S. cerevisiae* para producir GlcNAc y LacNAc. En una etapa final, la nueva cepa se transformó adicionalmente con un plásmido de expresión que contenía unidades transcripcionales constitutivas para *LgtA* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y el dominio catalítico C-terminal de la alfa-1,3-galactosiltransferasa bovina (*a3FTcd*) con la SEQ ID NO 13. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-lactosa, Gal-a1,3-LacNAc (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc), LN3, LNnT y Gal-a1,3-LNnT (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc) en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono.

Ejemplo 13. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GalNAc-b1,3-lactosa (b3'-GalNAcL), Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y poli-LacNAc GalNAc-ilada con un huésped de E. coli modificado

Se modificó una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 con inactivaciones genómicas de los genes de *E. coli lacZ*, *glk* y el operón de *E. coli galETK*, junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para *lgtB* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09 y la UDP-glucosa 4-epimerasa (*galE*) de *E. coli* con la SEQ ID NO 10 para producir lactosa (Gal-b1,4-Glc). En las etapas siguientes, la cepa mutante se modificó adicionalmente con una inactivación del gen de *E. coli nagB* junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para el *glmS**54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli* y *GNA1* con la SEQ ID NO 05 de *S. cerevisiae* para producir GlcNAc y LacNAc. En una etapa final, la nueva cepa se transformó adicionalmente con un plásmido de expresión que contenía unidades transcripcionales constitutivas para *WbpP* de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14, *LgtA* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y *LgtD* de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo comprende glicerol como fuente de carbono, la nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc, es decir, (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y poli-LacNAc GalNAc-ilada.

Ejemplo 14. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende estructuras de lactosa galactosilada y GalNAc-ilada con un huésped de E. coli modificado

Se modificó una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 con inactivaciones genómicas de los genes de *E. coli nagB*, *ushA*, *galT*, *lacZ*, *glk* y el operón de *E. coli galETKM*, junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para *lgtB* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09, *galE* de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, la α 1,4-galactosiltransferasa (*LgtC*) de *N. gonorrhoeae* con la SEQ ID NO 16 y el *glmS**54 mutante de *E. coli* con la SEQ ID NO 06. En una etapa siguiente, la cepa mutante se transformó con un plásmido de expresión que comprende unidades de expresión constitutivas para *WbpP* de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y *LgtD* de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,4-Gal-b1,4-Glc (Gal-a1,4-lactosa), Gal-a1,4-Gal-a1,4-Gal-b1,4-Glc, Gal-a1,4-Gal-a1,4-Gal-a1,4-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc (GalNAc-b1,3-lactosa), Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-a1,4-Gal-b1,4-Glc (globo-N-tetraosa) y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-Gal-a1,4-Gal-b1,4-Glc cuando se evalúa en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo proporcionadas en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono.

Ejemplo 15. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa y estructuras de (GalNAc)-poli-LNnT con un huésped de E. coli modificado

Se modificó una cepa de *E. coli* K-12 MG1655 con inactivaciones genómicas de los genes de *E. coli nagB*, *lacZ*, *glk* y el operón de *E. coli galETKM*, junto con inserciones genómicas de unidades transcripcionales constitutivas para *lgtB* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 09, *galE* de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, *LgtA* de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, el *glmS**54 mutante de *E. coli* con la SEQ ID NO 06, *WbpP* de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y *LgtD* de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. La nueva cepa produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa así como estructuras de poli-LNnT y estructuras de poli-LNnT galNAc-ilada en muestras de caldo completo cuando se evalúan en un experimento de crecimiento según las condiciones de cultivo en el ejemplo 1, en las que el medio de cultivo contiene glicerol como fuente de carbono.

Ejemplo 16 (ejemplo de referencia). Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un plásmido pRS420 de expresión de levadura que contiene el marcador de selección HIS3 y que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, galE de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y LgtB con la SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis*. Cuando se evalúa en medio con mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas SD CSM-Ura-His, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n.

Ejemplo 17. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc, beta-Gal-(1,4)-beta-GlcNAc-(1,3)-[beta-GlcNAc-(1,6)]-beta-Gal-(1,4)-GlcNAc y estructuras de poli-LacNAc con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un plásmido pRS420 de expresión de levadura que contiene el marcador de selección HIS3 y que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, galE de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, LgtB con la SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis* y la N-acetilglucosaminidasa beta-1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa humana GCNT2 con SEQ ID NO 12. Cuando se evalúa en medio con mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas SD CSM-Ura-His, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc, GlcNAc-b1,6-Gal-b1,4-GlcNAc, estructuras de (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y beta-Gal-(1,4)-beta-GlcNAc-(1,3)-[beta-GlcNAc-(1,6)]-beta-Gal-(1,4)-GlcNAc.

Ejemplo 18. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-LacNAc, LN3, LNnT y Gala1,3-LNnT con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un plásmido pRS420 de expresión de levadura que contiene el marcador de selección HIS3 y que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, galE de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, LgtB con la SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis* y el dominio catalítico C-terminal de la alfa-1,3-galactosiltransferasa bovina (a3FTcd) con la SEQ ID NO 13. Cuando se evalúa en medio con mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas SD CSM-Ura-His, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal-a1,3-LacNAc (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc), LN3, LNnT y Gal-a1,3-LNnT (Gal-a1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc).

Ejemplo 19. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y poli-LacNAc GalNAc-ilada con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un cromosoma artificial de levadura (YAC) que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, galE de *E. coli* con la SEQ ID NO 10, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, LgtB con la SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis*, WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en medio SD CSM que comprende lactosa, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LacNAc, LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-LacNAc, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LacNAc, estructuras de poli-LacNAc, es decir, (Gal-b1,4-GlcNAc)_n y estructuras de poli-LacNAc GalNAc-ilada.

Ejemplo 20. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LNB, LN3, LNT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-LNB y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNB con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un YAC que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, WbgO con la SEQ ID NO 08 de *E. coli* O55:H7, WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en medio SD CSM que comprende lactosa, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LNB, LN3, LNT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal-b1,3-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-LNB y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNB.

Ejemplo 21. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende estructuras de lactosa galactosilada y GalNAc-ilada con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un YAC que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, la fosfatasa yqaB de *E. coli* con la SEQ ID NO 19, galE de *E. coli*

con la SEQ ID NO 10, WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07 y LgtD de *H. influenzae* con la SEQ ID NO 15, la α 1,4-galactosiltransferasa (LgtC) de *N. gonorrhoeae* con la SEQ ID NO 16. Cuando se evalúa en medio SD CSM que comprende lactosa, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc (Gal- α 1,4-lactosa), Gal- α 1,4-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc, Gal- α 1,4-Gal- α 1,4-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc, GalNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc (GalNAc-b1,3-lactosa), Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, GalNAc-b1,3-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc (globo-N-tetraosa) y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-Gal- α 1,4-Gal-b1,4-Glc.

Ejemplo 22. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNT, GalNAc-b1,3-LNT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un YAC que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, WbgO de *E. coli* O55:H7 con la SEQ ID NO 08, WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en medio SD CSM que comprende lactosa, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNT, GalNAc-b1,3-LNT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa.

Ejemplo 23. Producción de una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa y estructuras de (GalNAc)-poli-LNnT con un huésped de *S. cerevisiae* modificado

Una cepa de *S. cerevisiae* se transformó con un YAC que comprende unidades transcripcionales constitutivas para el glmS*54 mutante con la SEQ ID NO 06 de *E. coli*, LgtA de *N. meningitidis* con la SEQ ID NO 07, LgtB con la SEQ ID NO 09 de *N. meningitidis*, WbpP de *P. aeruginosa* con la SEQ ID NO 14 y LgtD de *H. influenzae* con SEQ ID NO 15. Cuando se evalúa en medio SD CSM que comprende lactosa, la cepa de levadura mutante produce una mezcla de oligosacáridos que comprende LN3, LNnT, GalNAc-b1,3-LNnT, Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-LNnT, GalNAc-b1,3-lactosa y Gal-b1,3-GalNAc-b1,3-lactosa, así como estructuras de poli-LNnT y estructuras de poli-LNnT galNAc-ilada.

REIVINDICACIONES

1. Una célula modificada metabólicamente que produce una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes, en la que dicha célula
 - expresa al menos tres glicosiltransferasas, y
 - es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s), en la que dicho(s) azúcar(es) nucleotídico(s) es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas.
2. Célula según la reivindicación 1, en la que dicha célula está modificada genéticamente para la producción de dichos oligosacáridos.
3. Célula según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha célula está modificada con módulos de expresión génica, caracterizada por que la expresión de cualquiera de dichos módulos de expresión es constitutiva o está creada por un inductor natural.
4. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha mezcla de oligosacáridos comprende al menos tres oligosacáridos diferentes que difieren en el grado de polimerización.
5. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que una cualquiera de dichas glicosiltransferasas se elige de la lista que comprende galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, ramnosiltransferasas, ferasas, estando preferentemente dicha célula modificada en la expresión o la actividad de al menos una de dichas glicosiltransferasas.
6. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos se elige de la lista que comprende UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-galactosa (UDP-Gal), UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa, UDP-xilosa.
7. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha mezcla comprende al menos un oligosacárido neutro no fucosilado que está galactosilado, glucosilado, xilosilado, manosilado, contiene una N-acetilglucosamina, contiene una N-acetilgalactosamina, contiene una ramnosa, y/o contiene una N-acetilmanosamina.
8. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que uno cualquiera, preferentemente la totalidad, de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados es/son (un) oligosacárido(s) de leche de mamífero.
9. Un procedimiento para producir una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes por medio de una célula, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
 - a. proporcionar una célula que expresa al menos tres glicosiltransferasas y es capaz de sintetizar uno o más azúcar(es) nucleotídico(s), en el que dicho(s) azúcar(es) nucleotídico(s) es/son donador(es) de dichas glicosiltransferasas,
 - b. cultivar dicha célula en condiciones que permitan expresar dichas glicosiltransferasas y sintetizar dichos azúcares nucleotídicos,
 - c. preferentemente, separar al menos uno de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados de dicho cultivo.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula es una célula modificada metabólicamente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, en el que una cualquiera de dichas glicosiltransferasas se elige de la lista que comprende galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilmanosaminiltransferasas, xilosiltransferasas, glucosaminiltransferasas, ramnosiltransferasas.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que uno cualquiera de dichos azúcares nucleotídicos se elige de la lista que comprende UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc), GDP-manosa (GDP-Man), UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-ramnosa, UDP-xilosa.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que uno cualquiera de dichos oligosacáridos neutros no fucosilados está galactosilado, glucosilado, xilosilado, manosilado, contiene una N-acetilglucosamina, contiene una N-acetilgalactosamina, contiene una ramnosa y/o contiene una N-acetilmanosamina.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicha célula usa al menos un precursor para la síntesis de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos, preferentemente dicha célula usa dos o más precursores para la síntesis de uno cualquiera o más de dichos oligosacáridos.

15. Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, para la producción de una mezcla de al menos cuatro oligosacáridos neutros no fucosilados diferentes.