



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-168961- -00000-0000

Fecha: 2011-12-07 15:54:43

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 71

**DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

TITULO: SÍNTESIS DE HMO.

SOLICITANTE: JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GmbH.

DIRECCIÓN: Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach, Alemania.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 07 de diciembre de 2011

P2011/000218

OLARTEM

OLARTE MOURE & AS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-168961- -00000-0000

Fecha: 2011-12-07 15:54:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 71


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000218

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GmbH

Dirección: Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach, Alemania

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/004112

Fecha Junio 08, 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/142305

Fecha Diciembre 16, 2010

6

Título (54) SÍNTESIS DE HMO.

Clasificación Internacional (51) C12N 15/63; C12N 1/00.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de
Solicitud

9

Comprobante de pago No. 11-

Fecha Diciembre de 2011

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. **ADJUNTO COPIA SIMPLE. VER EXP. Nº 11-076.212**

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2009/004112

Stefan JENNEWEIN

Am Burgweg 108,
52080 Aachen,
Alemania.
Nacionalidad: Alemana

Eric HÜFNER

Zur Sieg 8, 53773 Hennef
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Julia PARKOT

Trankgasse 8
51143 Köln
Alemania
Nacionalidad: Alemana

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-
- / -



No. 11-168961- -00000-0000

Fecha: 2011-12-07 15:54:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 71



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0070998

Bogotá D.C., Julio 22 de 2011 - 16:31:08

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444451770	22/07/2011	2.855.000.00

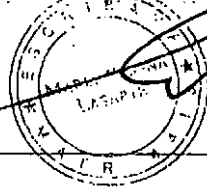
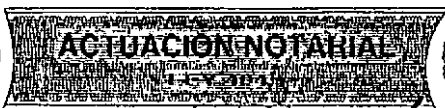
*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____



9 00 23 830

N 014024083

1 FOLIO 417.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CIENTO ONCE.- SUSTI-
2 TUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de OLARTE, Carlos
3 Reinaldo y otro del Poder otorgado por JENNEWAIN BIOTECHNOLOGIE GmbH.- -
4 En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día TREIN-
5 TA de AGOSTO del año DOS MIL ONCE, ante mí María Silvina Lasarte, Escribana Auto-
6 rizante, titular del Registro Notarial número 1788, COMPARECE: Dagmar MESSERER,
7 argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli,
8 soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de
9 Identificación Tributaria número 27-2038389-27, domiciliada legalmente en la Avenida
10 Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es ma-
11 yor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRI-
12 MERO: Que la Sociedad "JENNEWAIN BIOTECHNOLOGIE GmbH", con domicilio en
13 Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach, Alemania, le confirió con fecha 13 de Julio de 2011 en
14 dicho país, un Poder, el cual mediante Escritura número 109, del día de la fecha otorgada ante
15 mí, al folio 410, protocolo corriente de este Registro Notarial a mi cargo, fue incorporado y
16 transcripto al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista y en lo pertinente
17 transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el referido poder se
18 encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado, suspendido ni limitado
19 en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia DICE: Que en uso de la facultad
20 conferida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder mencionado a favor Carlos Reinaldo
21 OLARTE y/o Juan Guillermo MOURE PÉREZ, al sólo y único objeto de que en nombre y
22 representación de la Sociedad "JENNEWAIN BIOTECHNOLOGIE GmbH", y actuando
23 en forma individual, indistinta y/o alternadamente, se presente exclusivamente ante las autori-
24 dades de COLOMBIA que correspondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y
25 con las facultades que surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO



N 014024083

410.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CIENTO NUEVE.- ...- En la Ciudad 26
Autónoma de Buenos Aires, ..., el día TREINTA de AGOSTO del año DOS MIL ONCE, 27
ante mí ..., Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788, COMPARECE: 28
Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y 29
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 30
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria número 27-2038389-27, domiciliada 31
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos Aires.- 32
La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y la compare- 33
ciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la Autorizante, LA IN- 34
CORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del PODER que le fuera conferido 35
en Bonn, Alemania, el día 13 de Julio de 2011, por la Sociedad "JENNEWEIN BIOTECH- 36
NOLOGIE GmbH", con domicilio en Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach, Alemania, sobre 37
cuya plena vigencia responde la requirente bajo juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: 38
a) Que el instrumento de poder cuya incorporación y transcripción a este protocolo solicita la 39
compareciente, se encuentra extendido en idioma castellano, certificadas las firmas por nota- 40
rio en idioma alemán, legalizado con el Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 41
de octubre de 1961 en idioma alemán y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la 42
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo manifestado 43
tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega en este acto del 44
original del instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al idioma nacional, 45
el que agrego a la presente y transcripto dice: "PODER Los abajo firmante/s Jennewein Bio- 46
technologie GmbH domiciliados en Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach, Alemania declaran 47
por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general amplio y suficiente para recabar 48
de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes 49
de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad inte- 50



ACTUACION NOTARIAL



N 014024084

1 lectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas
2 autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular
3 descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos,
4 justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y
5 valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cual-
6 quier orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación
7 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el
8 futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de
9 fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad
10 intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier
11 jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los falsificadores, usur-
12 padores o imitadores y contra los tenedores de artículos que infrinjan su nombre, marcas o
13 patentes de invención, seguir los juicios por oposición u otros en que fueran parte como acto-
14 res o demandados, defender el nombre, las marcas, patentes y modelos y/o de derechos de
15 propiedad intelectual y/o nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de
16 nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere neces-
17 rio ante cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos,
18 rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posi-
19 ciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar,
20 transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar-
21 gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de
22 los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir de
23 nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias
24 que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo sustituir el presente poder
25 en todo o en parte. ... Dado y firmado en - Siguen dos firmas ilegibles - Hay un sello que dice:



N 014024084

Jennewein Biotechnologie GmbH - Maarweg 32 D-53619 Rheinbreitbach".- ES COPIA
FIEL, doy fe.- En hojas adjuntas consta: a) La certificación notarial de las firmas obrantes en
el poder, en idioma alemán, efectuada por el abogado Marcus Mohr, representante oficialmen-
te designado del Escribano Benno Garschina, de Bonn, Alemania; y b) La legalización de la
firma y sello del nombrado abogado, en idioma alemán, efectuada por la Presidenta del Tribu-
nal Regional de Bonn, Alemania, Condesa de Schwerin (Sello de Apostilla de la Convención
de La Haya del 5 de octubre de 1961).- A continuación, en hojas adjuntas sigue la referida
traducción al idioma nacional la que transcrita textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PÚ-
BLICA - (A continuación de un PODER otorgado en idioma nacional por la Sociedad "Jen-
newein Biotechnologie GmbH", con sede en Rheinbreitbach, Alemania, figuran los siguientes
textos, que traducidos dicen: La versión en inglés es para su información únicamente.- Nom-
bre de la Solicitante - Domicilio de la Solicitante - Lugar y fecha de otorgamiento - Firma de
la Solicitante - Reg. de Actas (enmendado: 2952/2011) - Por la presente certifico la autentici-
dad de las firmas trazadas en mi presencia (por la Sra. Amélie Jennewein) así como la ya re-
conocida (por el Dr. Stefan Jennewein) provenientes de los siguientes: 1.- Dr. Stefan Jenne-
wein, que nació el 03-02-1971; 2.- Sra. Amélie Jennewein, que nació el 02-08-1975, con do-
micilio comercial en Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach.- El Dr. Jennewein demostró su
identidad presentando su Pasaporte Oficial de la República Federal de Alemania; la Sra. Jen-
newein es de mi personal conocimiento.- El Dr. Jennewein y la Sra. Jennewein actúan repre-
sentando conjuntamente a la Sociedad de Responsabilidad Limitada, inscripta en el Registro
de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Montabaur, con el N° HRB 20721, que
lleva la razón social "Jennewein Biotechnologie GMBH", con sede en Rheinbreitbach, domi-
cilio comercial en Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach.- En base a qué tuve a la vista el Regis-
tro de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Montsbaur HRB 20721, del día de la
fecha, certifico que el Dr. Stefan Jennewein y la Sra. Amélie Jennewein, en su carácter de



N 014024085

1 Gerentes, están autorizados a la representación conjunta de la Sociedad "Jennwein Biotech-
2 nologic GmbH", con sede en Rheinbreitbach.- Además certifico que en base a mi inspección
3 arriba mencionada, que la "Jennwein Biotechnologie GMBH" es una sociedad fundada le-
4 galmente, operando según la legislación, supeditada al derecho alemán, según se desprende
5 del Registro de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Montabaur HRB 20721. Adc-
6 más la Sociedad tiene su sede central en Rheinbreitbach.- Finalmente declaro que el poder
7 adjunto a esta certificación notarial, se otorgó de acuerdo con las leyes respectivas que rigen
8 en el lugar de otorgamiento, que se refieren a formalidades legales. Además doy fe que se
9 trata de un poder acorde con dichas leyes.- La pregunta de la representante del Escribano de si
10 se tomó alguna medida previa en el sentido del Art.3, Pár.1, Apartado 1, N° 7 de la Ley de
11 Certificaciones fue contestada por todos los comparecientes por la negativa.- Bonn, 13 de
12 julio de 2011 - (Firmado y aclarado:) Marcus Mohr, en carácter de representante oficialmente
13 designado del Escribano Benno Garschina, de Bonn - (Hay un sello en oblea ilegible).-
14 APOSTILLA - (Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961) - País: República Federal
15 de Alemania.- Este documento público fue firmado por el abogado Marcus Mohr en su carác-
16 ter de representante oficialmente designado del Escribano Benno Garschina, de Bonn, estando
17 provisto del sello de Escribano Garschina.- Certificado en Bonn, el 15-07-2011, por la Presi-
18 denta del Tribunal Regional de Bonn, con el número 1536-1537/2011.- Sello (Hay un sello en
19 oblea adherido ilegible y una firma aclarada:) Condesa de Schwerin.- ES TRADUCCIÓN
20 FIEL de las partes pertinentes en los idiomas inglés y alemán que constan en el documento
21 adjunto, y que he vertido al idioma nacional, en Buenos Aires, el 11 de agosto de 2011.- Hay
22 una firma ilegible.- Hay un sello que dice: "Laura Thieberger - Matrícula de Traductores -
23 Alemán - Francés - Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III - 98 - (La Plata) - Inglés - Tomo III:
24 Folio 14 (Cap.) - Tomo III Folio 329 (La Plata) - Colegio de Traductores Públicos N° 173".-
25 ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUC-

CECBA - LEY404 GCBA
APOSTILLA

110831 116325



31/08/2011

09:46:13

CECBA - LEY404 GCBA
LEGALIZACION

110831 464879



31/08/2011

09:46:13



024085

TORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización

Nº 67836/11. Sigue una firma ilegible: Mayra Fiorella Pugliese".- ES COPIA FIEL, doy fe.-

...- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...- En este

estado la compareciente DICE: Que en la forma expresada deja INCORPORADO y TRANS-

CRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana

Autorizante, expida primera copia de la presente.- Constancias Notariales: Identidad de la

compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la

Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente; quien así la otorga y en prueba de

conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA

LASARTE. Escribana. Está mi sello. ...".- ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la

escritura de referencia, doy fe.- CUARTO: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el

presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; b) Que

los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus

partes; y c) Que el presente instrumento no se encuentra alcanzado por el Impuesto de Sellos.-

Constancias Notariales: Identidad de la Compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil):

Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- Informo a la compareciente respec-

to de los alcances de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del derecho de leer por

sí este instrumento.- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de

conformidad la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARÍA SILVINA

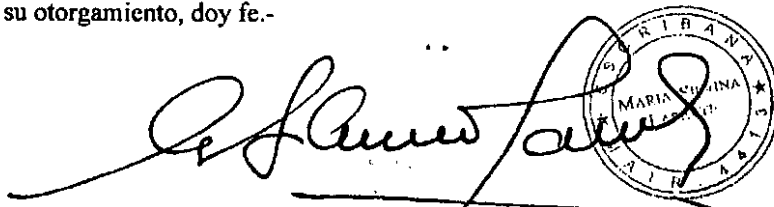
LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante

mí, al folio 417 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE

expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados

correlativamente desde el número N 014024083 al presente inclusive; que sello y firmo en la

fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-






L 010336847

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano MARIA SILVINA LASARTE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 110831464879/3. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Miércoles 31 de Agosto de 2011

ESC. HUGO DANIEL HADIS
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO de
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: REPÚBLICA ARGENTINA
El presente documento público: **DE LEGALIZACIÓN**
2. Ha sido firmado por **HUGO DANIEL HADIS**
3. Quien actúa en calidad de **CONSEJERO**
4. Lleva el sello/timbre del **COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES**.
5. En **LA CIUDAD DE BUENOS AIRES** 6. El día **31/08/2011**
7. Por **EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES**
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO (Convenio 02/09/2003).
8. Bajo el Número: **110831116325**
9. Sello/Timbre:
10. Firma:



[Firma manuscrita]

LOS FOTOGRAFAMPIEUGA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 December 2010 (16.12.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/142305 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/004112
- (22) International Filing Date:
8 June 2009 (08.06.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant (for all designated States except US): JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): JENNEWEIN, Stefan [DE/DE]; Maarweg 32, 53619 Rheinbreitbach (DE). HÜFNER, Eric [DE/DE]; Zur Sieg 8, 53773 Hennef (DE). PARKOT, Julia [DE/DE]; Trankgasse 8, 51143 Köln (DE).
- (74) Agent: LAUFER, Gabriele; Witte, Weller & Partner, Postfach 10 54 62, 70047 Stuttgart (DE).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: HMO SYNTHESIS

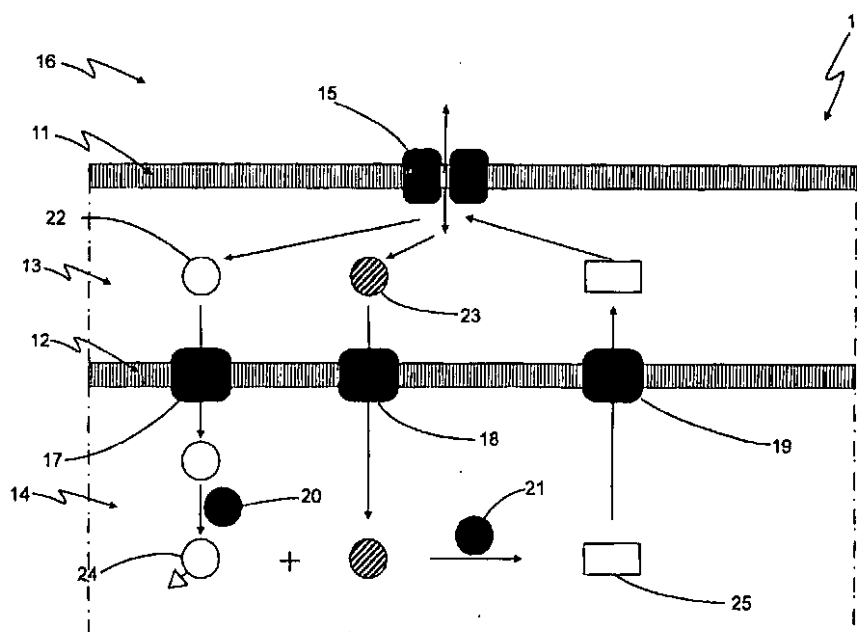


Fig. 1

(57) Abstract: The present invention relates to a cell to be stably cultured in a medium, which cell is adjusted for the production of oligosaccharides, the cell being transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for an enzyme involved in oligosaccharide synthesis. In addition the cell is transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein of the sugar efflux transporter family, a functional homolog or derivative thereof. Further, the invention concerns a method for the production of oligosaccharides involving above cell.

WO 2010/142305 A1

HMO synthesis

The present invention relates to a cell to be stably cultured in a medium, which cell is adjusted for the production of oligosaccharides, the cell being transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for an enzyme involved in oligosaccharide synthesis.

Such cells are known for example from Dumon *et al.*, 2001.

It has been long known that human mother's milk, besides lactose, comprises a complex mixture of oligosaccharides called Human Milk Oligosaccharides (HMO). This oligosaccharide fraction of human mother's milk is unique with respect to composition and quantity. In contrast to other mammals, human mother's milk comprises an oligosaccharide concentration ranging from 7 to 12 g/L, which is by a factor of 10 to 100 higher than in most other mammals (Boehm & Stahl, 2007, Kunz *et al.*, 2000, Newburg & Neubauer, 1995).

Today, more than 80 compounds, belonging to HMOs, have been structurally characterized. Generally, HMOs are characterized, unlike other oligosaccharides found in the human body, by a lactose moiety at the reducing end, and fucose and/or sialic acid at the non-reducing end.

Two basic types are distinguished: Oligosaccharides of type I structure have fucose α 1,4-linked to GlcNAc, whereas those of type II structure show α 1,3-fucosylation of GlcNAc or glucose; either type may contain α 1,2-linked fucose to galactose. The most prominent oligosaccharides are 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose.

These structures are closely related to epitopes of epithelial cell surface glycoconjugates, the Lewis histo-blood group antigens such as Lewis x (Le^x) ($Gal(\beta$ 1-4)[Fuc-(α 1-3)]GlcNAc(β 1)) (Newburg, 2001). The structural homology of HMO to epithelial epitopes accounts for protective properties against bacterial pathogens.

For example, the virulence of pathogenic *Escherichia coli* (Cravioto *et al.*, 1991), *Vibrio cholerae* (Coppa *et al.*, 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Andersson *et al.*, 1986) or *Campylobacter jejuni* (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003) can be drastically reduced by the binding of pathogens to HMO instead of to human mucosal surface glycans, and also the binding to toxins like the heat-stable enterotoxin of *E. coli* (Crane *et al.*, 1994).

Besides the mentioned local effects in the intestinal tract, HMOs are also capable of eliciting systemic effects in infants by entering the systemic circulation (Gnoth *et al.*, 2001). The impact of HMOs on protein-carbohydrate interactions, e.g., selectin-leukocyte binding, can modulate immune responses and reduce inflammatory responses (Bode, 2006, Kunz & Rudloff, 2006).

In order to reduce the frequency of infections acquired by neonates and, therefore, as well infant mortality, it is of course highly desirable to generally provide infants with nutrition including HMOs. This may be easily achieved in societies, where breast-feeding is commonly and widely practiced. This, however, is not generally the case.

There exist a number of medical reasons, like the possible transmission of infectious diseases from mother to child, which under certain circumstances argue against breast feeding. In many African countries, for example, breast feeding may be a major reason for HIV-infections during infancy.

Also cultural circumstances may lead to refusal of breast feeding, as is the case in major industrial countries like, for example, the US.

Due to the fact that HMOs can be found in natural sources, such as the milk of other mammals, only in low concentrations, the extraction of oligosaccharides from natural sources is not suited for satisfying the demand for HMOs.

The chemical synthesis of oligosaccharides is laborious and requires multiple protection and deprotection steps (Kretzschmar & Stahl, 1998), therefore generally being relatively expensive and bearing low recovery-rates.

Therefore, fermentative production of oligosaccharides utilizing biotechnically engineered organisms is a promising alternative solution for large-scale HMO synthesis.

During the past decade, several successful attempts of HMO synthesis using either fermentation with recombinant *E. coli* or *in vitro* enzymatic conversion, have been published. These attempts have mainly concentrated on synthesizing fucosylated compounds belonging to or closely resembling HMOs.

For example, several publications describe the synthesis of Lewis structures lacto-*N*-neofucopentaose, lacto-*N*-neodifucohexaose and lacto-*N*-neodifucooctaose, as well as 2'- and 3-fucosyllactose (Albermann *et al.*, 2001, Dumon *et al.*, 2006, Dumon *et al.*, 2001, Dumon *et al.*, 2004, Koizumi *et al.*, 2000). In these cases, enzymatic fucosylation of educts like, for example, lactose, is carried out by fucosyltransferases (FucTs).

Most publications reporting production of fucosylated compounds in this connection describe the use of FucTs originating from *Helicobacter pylori*. Generally, human FucTs can as well be utilized for this purpose. However, when overexpressed in bacterial cells, FucTs from bacterial sources are generally less prone for problems such as misfolding and insolubility.

Further, most published systems for the synthesis of fucosylated compounds rely on the endogenous GDP-fucose pool of *E. coli*, which is normally used for the synthesis of the fucose-containing exopolysaccharide colonic acid (Grant *et al.*, 1970). In these cases, the availability of GDP-fucose is of course a bottleneck, restricting synthesis efficiency.

Recently, the inventors of the present invention have described a novel whole-cell production process utilizing the enzyme Fkp (Parkot *et al.*, 2008), the entire contents of this patent application being incorporated herein by reference.

Fkp (Coyne *et al.*, 2005), which originates from *Bacteroides fragilis*, is a bifunctional enzyme, which possesses both fucokinase and L-fucose-1-P-guanylyltransferase activity. Hence, exogenously supplied fucose is first phosphorylated and then nucleotide-activated to form the important precursor molecule GDP-fucose. The Fkp-based L-fucose salvage pathway has been successfully used to synthesize fucosylated oligosaccharides (Parkot *et al.*, 2008).

Even though, on the level of biochemical synthesis as such, important strategies have been developed, the known methods for *in vivo* oligosaccharide synthesis all bear certain disadvantages, inhibiting, at most, the mass production of oligosaccharides.

The true difficulty in producing, in cells, oligosaccharides at high rates is on one hand the massive intracellular enrichment of the produced oligosaccharides and nucleotide by-products, and on the other hand the extraction of the produced oligosaccharides.

Due to intracellular enrichment, the products of the synthesis reaction may gradually develop a product-inhibitory effect on the synthetic enzymes. At a certain point, the synthesis thus becomes inefficiently slow. Further, the products may reach cytotoxic concentrations driving the cells into lysis or at least metabolic arrest. In any case, no continuous intracellular production of oligosaccharides is possible.

Further, it can be expected that the accumulation of excessive amounts of oligosaccharides will eventually lead to cell lysis and cell death. This cell lysis or the later performed cell lysis used for the extraction of the synthesized oligosaccharides from the cell will lead to a complex mixture of target oligosaccharides and cell compo-

nents (metabolites, debris). The purification of the target oligosaccharide from this complex mixture is costly and thus for most oligosaccharides not economical.

Under these circumstances, biotechnical oligosaccharide production is very inefficient and hard to control, especially since known biotechnical oligosaccharide production is performed using batch culturing, such batch culturing being, from the economical point of view, highly unsatisfactory.

In view of the above, it is an object of the invention to improve the methods of biotechnical production of oligosaccharides in such a way that the production is facilitated and made more controllable, and in that generally the output of oligosaccharides is enhanced.

According to the invention, this and other objects are achieved by providing a cell of the kind mentioned at the outset, the cell in addition being transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein of the sugar efflux transporter family, a functional homolog or derivative thereof.

The object of the invention is thus achieved completely.

According to the invention, oligosaccharides are understood to be short polymers of monosaccharides, comprising at least 2 sugar-subunits. The oligosaccharides may either be branched or form a linear chain of subunits. Moreover, the sugar subunits of oligosaccharides may feature a number of chemical modifications. Accordingly, the oligosaccharides according to the present invention may comprise one or more non-sugar moieties.

Nucleic acid sequence, according to the invention, describes a genetic code, represented by a nucleic acid polymer, like e.g. a desoxyribonucleic acid polymer or a ribonucleic acid polymer. The genetic code may thereby include coding sequences, including information for forming a protein, or non-coding regions comprising for

example promoter regions, regions for the attachment of regulatory or auxiliary compounds, spacers and structural sequences influencing the secondary or tertiary structure of the nucleic acid polymer itself and/or participating in its processing.

"Transformed to comprise", according to the present invention, relates to any method of inserting at least one additional nucleic acid sequence into cells, the nucleic acid sequence thereafter being present inside the cell either as a plasmid or being integrated into the cells chromosome/chromosomes. Known transformation methods comprise for example chemical transformation or electroporation. Stable transgenesis, even in the absence of selective agents, can generally be achieved by chromosomal integration of at least one additional nucleic acid sequence. For this purpose, the cell may be infected with a virus or phage. Alternatively, other means of homologous and non-homologous recombination using, for example, virus- or transposon-based systems, may be applied.

For biotechnological applications, the export of larger oligosaccharides from cells is a complex problem. This is primarily the case, because only few cellular mechanisms relating to such transport have been identified. The reason for the infrequent occurrence of oligosaccharide export from cells is that oligosaccharide synthesis is consuming a large amount of cellular resources. The loss of these compounds is therefore generally unfavorable for the cell.

Moreover, the majority of known mechanisms for oligosaccharide export involve the chemical modification of the oligosaccharides, for example by linking them to lipid-moieties (Alaimo *et al.* 2006). Consequently, the oligosaccharides are not only membrane-borne, inhibiting their release into the medium, but as well chemically linked to lipid-moieties, reducing their solubility in aqueous media. Accordingly, such mechanisms are hardly suited for being employed in large scale production of oligosaccharides.

The Sugar Efflux Transporter (SET) family, first described by Liu and co-workers (Liu *et al.* 1999a) for *E. coli*, comprises proteins SetA, SetB and SetC. Homologues (amino

acid identities >50%) of the transporter proteins are found primarily in *Enterobacteriaceae* (Liu *et al.* 1999a).

Besides glucose and lactose, the SET exporter proteins display substrate specificity for certain mono- and di-saccharides as well as, for example, the inducer molecule isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and toxic sugar analogue *o*-nitrophenyl- β -D-thiogalactoside (ONPG) (Liu *et al.*, 1999b). Biochemical studies showed, however, that, for example, SetA exhibits a very low to zero transport activity for larger or bulkier molecules such as heptoses or trisaccharides.

For above reasons, it could not be expected that exporter proteins of the SET family would be suitable at all for the transport of oligosaccharides.

However, the inventors have found that, surprisingly, the overexpression of SET exporter proteins leads to a very efficient export of oligosaccharides.

Moreover, SET proteins have been shown to export lactose, one of the educts of the synthesis reaction. It was therefore to be expected, that the synthesis of oligosaccharides obtained in the modified cells would proceed very inefficiently and slow due to a constant drain of educt from the cells.

By contrast, the inventors have been able to show for the first time that, despite the overexpression of SET exporter proteins, the synthesis of oligosaccharides obtained in the modified cells is highly productive.

Generally, it is preferred if the cell is selected from the group consisting of bacteria, fungi, animal and plant cells. It is thereby in particular preferred if the cell is an *Escherichia coli* cell.

The advantage hereby is that *E. coli* cells offer high metabolic activity and a high reproduction rate. In addition, *E. coli* is one of the best characterized organisms for molecular biological and biotechnical purposes. Many techniques for the transforma-

tion and cultivation of bacteria known in the art have been especially adapted to *E. coli*. In addition, *E. coli* strains with a variety of genetic backgrounds are commercially available.

Further, it is preferred, if the enzyme is selected from the group comprising glycosyltransferase, Leloir type glycosyltransferase, non-Leloir glycosyltransferase, sialyltransferase, galactosyltransferase, fucosyltransferase, mannosyltransferase, N-acetylglucosaminyltransferase, N-acetylgalactosaminyltransferase.

According to one embodiment, the enzyme is a fucosyltransferase.

Moreover, it is preferred, if the sugar efflux transporter is SetA or a derivative thereof.

The advantage in this case is that SetA, amongst the biochemically characterized members of the SET family of exporter proteins, features the widest substrate specificity. Hence, the widest variety of oligosaccharides can, at least potentially be exported and thus produced, using SetA.

It is also preferred, if the cell is further transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein facilitating or promoting the import of educts required for oligosaccharide synthesis.

Hereby, it is advantageous, that the educt concentration inside the cell is increased. Under normal circumstances, the import of educts such as fucose or lactose is limited by the availability of corresponding importer proteins. In case of a cell adjusted for the large scale synthesis of oligosaccharides, however, the import of educts, relying on endogenous levels of importer proteins, may be insufficient for constantly supplying the synthesis reaction with educts. This problem can be met by overexpressing the respective importer proteins.

Importer proteins with relevance in the present case are primarily importers for mono- or disaccharides such as lactose importers, for example *E. coli* β -galactoside

permease (LacY), or fucose importers, for example *E. coli* fucose permease (FucP), but as well may comprise importers for nucleotides and other educts.

It is especially preferred, if the cell is transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein selected from the group consisting of lactose transporter, fucose transporter, sialic acid transporter, galactose transporter, mannose transporter, *N*-acetylglucosamine transporter, *N*-acetylgalactosamine transporter, ABC-transporter, transporter for a nucleotide-activated sugar and transporter for a Nucleobase, Nucleoside or Nucleotide.

In this connection, a nucleotide-activated sugar may be, but is not limited to, GDP-fucose, CMP-sialic acid, UDP-galactose, UDP-glucose, GDP-mannose, UDP-glucosamine or UDP-galactosamine.

Further, the term nucleobase stands for Guanin, Cytosin, Adenin, Thymin and Uracil. Nucleoside stands for Guanosin, Cytidin, Adenosin, Thymidin and Uridin whereas a nucleotide may be a mono-, di- or triphosphate of Guanosin, Cytidin, Adenosin, Thymidin or Uridin.

In addition, it is preferred, if the cell is further transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein selected from the group consisting of nucleotidyltransferase, guanylyltransferase, uridylyltransferase, Fkp, L-fucose kinase, fucose-1-phosphate guanylyltransferase, CMP-sialic acid synthetase, galactose kinase, galactose-1-phosphate uridylyltransferase, glucose kinase, glucose-1-phosphate uridylyltransferase, mannose kinase, mannose-1-phosphate guanylyltransferase, GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose reductase, glucosamine kinase, glucosamine-phosphate acetyltransferase, *N*-acetyl-glucosamine-phosphate uridylyltransferase, UDP-*N*-acetylglucosamine 4-epimerase, UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase.

In this connection, the term nucleotidyl transferase generally relates to enzymes that can transfer nucleotides onto phosphosugars, be it naturally occurring sugars or non-natural sugars.

The advantage hereby is that, as described as well in Parkot et al. 2008, included herein by reference, the intracellular pools of nucleotide-activated sugars like GDP-fucose can be supplemented. Hence, oligosaccharide synthesis is made more efficient.

Moreover, it is generally preferred, if the cell's catabolic pathway for selected mono-, di- or oligosaccharides involved in and/or required for the synthesis of oligosaccharides is at least partially inactivated.

Here, the advantage lies in the fact that the overall synthesis efficiency can be increased. This is the case because less educts destined for oligosaccharide synthesis are consumed by the endogenous metabolism of the cell.

In the embodiment described below, for example, cells are employed, which are deficient in lactose degradation. This can be accomplished by inactivating the enzyme β -galactosidase, which is encoded by the gene *lacZ*. This genetic modification prevents the intracellular cleavage of lactose into quickly metabolizable monosaccharides glucose and galactose. Thus, lactose is present in higher concentration as acceptor molecule for subsequent glycosylation/fucosylation reactions.

In an alternative embodiment, the cells used for oligosaccharide synthesis are, alone or in addition to the *lacZ*-deficiency described above, deficient for L-fucose degradation. This can be achieved by inactivating the gene *fucA* coding for the key catabolic enzyme fucose-1-phosphate aldolase (FucA) of the fucose degradation pathway.

Of course, there are also other techniques available, ranging from enzymatic inhibitors to stably transfected RNAi constructs, which may be employed in order to at least partially inactivate catabolic pathways.

Within the scope of the present invention, it is generally preferred if the oligosaccharides comprise at least three subunits and/or feature a molecular weight of at least about 480 g/mol.

All HMOs of major importance have a molecular weight above this threshold.

The present invention further concerns a method for the production of oligosaccharides, comprising the steps of:

- a) providing a cell according to the invention,
- b) culturing the cell in a medium under conditions permissive for the production of said oligosaccharides,
- c) extracting said oligosaccharides from the culture medium.

In the scope of the present invention, permissive conditions are understood to be conditions relating to physical or chemical parameters including but not limited to temperature, pH, pressure, osmotic pressure and product/educt concentration.

In a particular embodiment, the permissive conditions may include a temperature-range of 30 +/- 20 °C, a pH-range of 7 +/- 3.

The method described above affords the advantage, that oligosaccharides can be extracted directly from the culture medium, whereas the known methods require the lysis of the cells and subsequent extraction of oligosaccharides from the resulting lysate.

In this connection, it is preferred if step b) is performed using a continuous flow bioreactor.

The advantage is that, using a continuous flow bioreactor, the amount of oligosaccharides produced can be easily increased. This is the case, because the synthesis occurs continuously at a relatively high level.

It is also preferred, if the medium in step b) comprises one or more substances selected from the group consisting of basic supplements for supporting cellular growth and propagation, selective agents, effectors of gene activity and educts required for the synthesis of oligosaccharides.

Typical supplements for supporting cellular growth and propagation are extensively known from the prior art and are described for example in Sambrook and Russel, 2001. Such basic supplements account for the general nutritional demand of cultured cells, containing for example proteins, carbohydrates, lipids and minerals.

Also selective agents like antibiotics are extensively known from the prior art, for example Sambrook and Russel, 2001. Such agents can be used in order to protect cultures of genetically modified cells from persisting contamination with competing organisms such as fungi or bacteria. Further, for example in bacterial populations, selective agents may be utilized in order to stabilize the genetic information comprised on a plasmid.

Effectors of gene activity may be used to selectively induce or repress the activity of certain genes or sets of genes within a cell. Such effectors range from simple chemical compounds such as isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) to more complex compounds like hormones. Such effectors of gene activity are extensively known from the prior art, for example from Sambrook and Russel, 2001.

Further, it is preferred if the educts are selected from the group consisting of arabinose, threose, erythrose, ribose, ribulose, xylose, glucose, D-2-deoxy-2-amino-glucose, N-acetylglucosamine, glucosamine, fructose, mannose, galactose, N-acetylgalactosamine, galactosamine, sorbose, fucose, N-acetylneuraminic acid, glycoside, non-natural sugar, nucleobase, nucleoside, nucleotide and any possible di- or polymer thereof.

It is generally preferred, if the oligosaccharides comprise at least three subunits and/or feature a molecular weight of at least about 480 g/mol.

According to an embodiment of the present invention, the oligosaccharide produced by the method described above is fucosyllactose, the advantage in this case being, that fucosyllactose is one of the most prominent compounds being present in HMOs.

Further advantages follow from the description of the embodiments and the attached drawings.

It goes without saying that the abovementioned features and the features which are still to be explained below can be used not only in the respectively specified combinations, but also in other combinations or on their own, without departing from the scope of the present invention.

Several embodiments of the invention are illustrated in the figures and explained in more detail in the following description. In the figures:

- Fig. 1 shows a schematic overview of oligosaccharide synthesis and transport inside a gram negative bacterial cell modified according to the invention;
- Fig. 2 shows the results of 3-fucosyllactose-measurements in the cellular moist mass and supernatants of bacterial cultures, comparing different genotypes; and
- Fig. 3 shows a comparison between the amounts of 3-fucosyllactose synthesized in bacterial cultures with different genotypes.

Example 1: Oligosaccharide synthesis and transport inside a gram negative bacterial cell

Fig.1 shows a section of a gram negative bacterial cell 10. A gram negative bacterial cell 10 according to the invention is comprised of an outer membrane 11, a plasma

membrane 12, a periplasmic space 13, located in between said outer membrane 11 and said plasma membrane 12, and a cytosol 14, enclosed within said plasma membrane 12. The outer membrane comprises porins through which water-soluble compounds can pass from the medium 16 into the periplasmic space 13 and vice versa.

According to one embodiment of the present invention, the plasma membrane comprises FucP, serving as a first educt-transporter 17, LacY, serving as a second educt transporter 18, and SetA, serving as a product exporter.

Further, Fkp, serving as a nucleotidyltransferase 20, and FutAco, serving as a glycosyltransferase 21, are comprised in the cytosol 14.

When, according to this embodiment, fucose, as a first educt 22, and lactose, as a second educt 23, are supplied to the medium 16, they enter the periplasmic space 13 through the porin 15. Then, the first educt 22 is transported by the first educt transporter 17 into the cytosol 14. In the cytosol, the first educt 22 is modified by the nucleotidyltransferase 20 resulting in a nucleotidylated first educt 24, GDP-fucose.

The second educt 23, is imported into the cytosol 14 by the second educt importer 15.

Then the glycosyltransferase 21 catalyses a reaction between the nucleotidylated first educt, GDP-fucose, and the second educt, lactose, resulting in an oligosaccharide 25, 3-fucosyllactose, and GDP (not shown).

Subsequently, the oligosaccharide 25 is exported from the cytosol 14 by the product exporter 19 (SetA) into the periplasmic space 13 and can leave the periplasmic space 13 via the porins 15, entering the medium 16.

Example 2: Material and methods

2.1 Construction of expression plasmids and development of *E. coli* strains

E. coli JM109(DE3) (Promega; www.promega.com) was used as initial host strain for the development of the *E. coli* production strain. All oligonucleotide primers used for the cloning procedures are listed in Table 1. Plasmids pACYC-*lacY* and pACYC-*lacY-setA* were constructed as follows: The genes *lacY* (corresponds to GenBank accession no. ACB02461) (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) and *setA* (corresponds to GenBank accession no. YP_025293) (GenBank) were amplified from genomic DNA of *E. coli* TOP10 (Invitrogen; www.invitrogen.com) using primers *lacY* NcoI forward/*lacY* EcoRI reverse and *setA* NdeI forward/*setA* XhoI reverse. The PCR products were subjected to restriction digest with the indicated enzymes, and ligated with the correspondingly digested expression vector pACYCDuet-1 (Novagen; www.merckbiosciences.co.uk).

The resulting plasmids were checked by restriction digest, agarose gel electrophoresis as well as sequencing with primers pACYCduetUP1, DuetDOWN-1-Primer, DuetUP2-Primer and T7-Terminator-Primer for the correct insertion of the genes (data not shown). The utilized plasmids pCOLA-*fkp-fucP* and pET-*futAco* have previously been constructed (Parkot *et al.*, 2008). To obtain the strains JM00, JM01 and JM02, different combinations of plasmids were introduced into *E. coli* JM109(DE3) by electroporation (Dower *et al.*, 1988). All plasmids and bacterial strains are listed in Table 2.

2.2 Inactivation of the fucose-catabolism in *E. coli*:

To prevent the degradation of externally supplied fucose, the *fucA* gene coding for the key catabolic enzyme L-fuculose-1-phosphate aldolase was deleted from the chromosome of *E. coli* JM109(DE3). All oligonucleotide primers used for the mutagenesis procedures are listed in Table 1. For construction of the *fucA* deletion mutant, the methodology of Datsenko and Wanner was applied (Datsenko and Wanner, 2000), using the primers *fucA*-knock-f and *fucA*-knock-r. The correct dele-

tion of *fucA* was confirmed by PCR using primers *fucA*-control-f and *fucA*-control-r flanking the chromosomal insertion site, and the fucose-negative phenotype was verified by plating the bacteria on M9 minimal agar (Sambrook and Russell, 2001) with supplemented fucose as the sole carbon source (data not shown).

Table 1. Primers used in this study.

Name	Sequence (5'→3')	Added restric- tion site
<i>fucA</i> -knock-f	AATTACTCTTCAATTCGTAACCCATAGGTTT TGAATTTCTCCAGCACTACGGCAATCTCTTC ATCGCTCAGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT CGAAGTTC	
<i>fucA</i> -knock-r	GGTGGGTAATTAAACGGCTAATTCAATAGT GTGAAAGGAACAACATTATTGCCCTGTTTT GAATCAGAGAGAGGGCTGACATGGGAATT AGCCATGGTCC	
<i>fucA</i> -control-f	CATTCTGTTAGCCATCATCCTTCTCC	
<i>fucA</i> -control-r	GAAGAAGATGGTGGGTAATTAAACGGC	
<i>setA</i> NdeI forward	AAGGGAAAAACATATGATCTGGATAATGAC GATGGCTCGCCGTATGAACGGTG	NdeI
<i>setA</i> XhoI reverse	AAGGGAAAAACTCGAGCCACGTCATCAAAC GTCTTTAACCTTTGCGG	XhoI
<i>lacY</i> NcoI forward	AAGGAAATATACCATGGGCTACTATTTAAAA AACACAACTTTTGGATGTTTCGG	NcoI
<i>lacY</i> EcoRI reverse	AAGGAAAACCGAATTCGATTGCTTAAGCGA CTTCATTCACTGACGACGCAGCAGGG	EcoRI
pACYCduetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	
DuetDOWN-1-Primer	GATTATGCGGCCGTGTACAA	
DuetUP2-Primer	TTGTACACGGCCGCATAATC	
T7-Terminator-Primer	TATGCTAGTTATTGCTCAG	

* Restriction endonuclease recognition sites are underlined.

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Name	Relevant characteristic(s)*	References
<i>E. coli</i> strains		
TOP10	F- <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(araleu)$ 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
JM109(DE3)	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZ\Delta M15</i>], IDE3	Promega
JM109(DE3) <i>fucA</i>	JM109(DE3) <i>fucA</i> deletion mutant	This study
JM00	Negative control strain, JM109(DE3) harboring empty vectors pCOLADuet-1, pETDuet-1 and pACYCDuet-1	This study
JM01	JM109(DE3) harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> and pACYC- <i>lacY</i>	This study
JM02	JM109(DE3) harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> and pACYC- <i>lacY-setA</i>	This study
JM03	JM109(DE3) harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> and pACYC- <i>lacY-setA</i>	This study
JM Δ 00	Negative control strain, JM109(DE3) $\Delta fucA$ harboring empty vectors pCOLADuet-1, pETDuet-1 and pACYCDuet-1	This study
JM Δ 01	JM109(DE3) $\Delta fucA$ harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> and pACYC- <i>lacY</i>	This study
JM Δ 02	JM109(DE3) $\Delta fucA$ harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> and pACYC- <i>lacY-setA</i>	This study
JM Δ 03	JM109(DE3) $\Delta fucA$ harboring pCOLA- <i>fkp-fucP</i> and pACYC- <i>lacY-setA</i>	This study

Plasmids		
pCOLADuet-1	expression vector, Km ^R	Novagen
pETDuet-1	expression vector, Ap ^R	Novagen
pACYCDuet-1	expression vector, Cm ^R	Novagen
pCOLA- <i>fkp-fucP</i>	harboring genes <i>fkp</i> and <i>fucP</i> , Km ^R	Parkot <i>et al.</i> , 2008
pET- <i>futAco</i>	harboring codon-optimized fucosyltransferase gene <i>futAco</i> of <i>H. pylori</i> , Ap ^R	Parkot <i>et al.</i> , 2008
pACYC- <i>lacY</i>	harboring gene <i>lacY</i> , Cm ^R	This study
pACYC- <i>lacY-setA</i>	harboring genes <i>lacY</i> and <i>setA</i> , Cm ^R	This study

Ap^R, ampicillin resistant; Km^R, kanamycin resistant; Cm^R, chloramphenicol resistant.

2.3 Culture conditions and preparation of cell extracts

E. coli strains were inoculated 1:100 from overnight cultures in 100 mL of mineral medium (Samain et al., 1999), containing 7.0 g L⁻¹ NH₄H₂PO₄, 7.0 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.0 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.5 g L⁻¹ citric acid, 2.0 g L⁻¹ KOH, 0.0045 g L⁻¹ thiamine·HCl and 7.5 mL L⁻¹ trace mineral solution. The trace mineral stock solution contained 70 mM nitrilotriacetate (pH 6.5), 7.5 g L⁻¹ ferric citrate, 1.3 g L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0.21 g L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 0.13 g L⁻¹ CuCl₂·2H₂O, 0.25 g L⁻¹ H₃BO₃, 1.2 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O and 0.15 g L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O. The medium was supplemented with 0.1% glucose and 1% glycerol as carbon source, and with 100 µg mL⁻¹ ampicillin, 50 µg mL⁻¹ kanamycin and/or 20 µg mL⁻¹ chloramphenicol before incubation in a rotary shaker at 37°C providing good aeration.

When the cultures reached an optical density (OD_{600 nm}) of approximately 1.0, the inducer isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) was added in a concentration of 0.5 mM, and the cultures were incubated overnight at 28°C under constant shaking. After approximately 16 hours, 40 mM L-fucose and 20 mM lactose were added. The cultures were then continuously incubated at 28°C under constant shaking.

At several time points, 20 mL samples of the cultures were collected, and cells were harvested by centrifugation. The culture supernatants were separated and immediately analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) or stored at -20°C. The cell pellets were washed with PBS (Sambrook and Russell, 2001), resuspended in 5 times the pellet weight of distilled water, and lysed by boiling for 10 min. To obtain intracellular fractions, the cell debris was separated by centrifugation and the clear cell lysate was stored at -20°C or immediately analyzed by HPAEC.

2.4 SDS-PAGE

The expression of heterologous proteins was checked by SDS-PAGE (Sambrook and Russell, 2001) (data not shown). Protein extracts were prepared in 1x SDS gel-loading buffer, and polyacrylamide gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

2.5 Detection of oligosaccharides by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)

Samples were analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) using a Decade II pulsed amperometric detector (PAD) (Antec Leyden; www.antec-leyden.nl) and a CarboPac PA20 column (Dionex; www.dionex.com) connected to a HPLC system (Shimadzu; www.shimadzu.eu). The detector sensitivity was set at 50 μ A with a 0.05-V applied pulse potential.

Mono-, di-, and oligosaccharides eluted with 10 mM sodium hydroxide at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. After 30 min isocratic elution with 10 mM NaOH the column was washed for 20 min with 200 mM NaOH to obtain constant retention times and thereafter regenerated with 10 mM NaOH for 20 min. For all analyzed samples, 20 μ L of 1:2 dH₂O-diluted solutions were used for HPAEC analysis. Analysis via HPAEC-PAD showed retention times on the used HPLC column of approximately 3.5 min for the L-fucose standard, approx. 15 min for the lactose standard, and approx. 11-12 min for the 3-fucosyllactose standard (data not shown). Standards of the substances

glycerol and glucose, which are added to the culture medium as carbon source, were recorded with a retention time of approx. 1.5 min and 7-8 min, respectively.

Example 3: Production of 3-fucosyllactose and SetA-dependent secretion into the culture medium by recombinant *E. coli*

The aim of this experiment was the investigation of SetA-mediated export of intracellular 3-fucosyllactose. *E. coli* strains JM01 and JM02 (see Table 2) were used for fermentation experiments. The strains JM01 and JM02, which both express the enzymes Fkp and FutAco (1,3-fucosyltransferase) as well as the transporter proteins FucP and LacY, only differ in expression of the SetA transporter. JM01 is not overproducing SetA, and JM02 is overproducing SetA.

Fig. 2 shows the amounts of 3-fucosyllactose in the moist cell mass and supernatant of *E. coli* cultures JM01 and JM02 determined by HPAEC-PAD analysis.

For determining the effect of SetA overexpression, measurements were performed 7, 24 and 32 hours post induction of *fkp*, *fucP*, *lacY*, *futAco* and *setA* expression.

In the figure, extracellular fractions of 3-fucosyllactose measured in *E. coli* JM01 (SetA not overexpressed) are represented by columns I, the intracellular fractions being represented by columns II. In case of *E. coli* JM02 (SetA-overexpressed), the extracellular fractions of 3-fucosyllactose are represented by columns III and intracellular fractions are represented by columns IV. All values represent the mean values from duplicate experiments, the error bars indicating the respective standard deviations.

These measurements show, that strain JM01, which does not overexpress SetA, accumulates 3-fucosyllactose in the cytosolic fraction.

By contrast, the intracellular concentration of 3-fucosyllactose in the case of strain JM002, overexpressing *setA*, is below detection level.

Further, the supernatants from JM01- and JM02-cultures exhibit a certain content of 3-fucosyllactose. Thereby, however, the content of 3-fucosyllactose found in the supernatant of the JM02 culture is greatly increased over the content of 3-fucosyllactose found in the supernatant of the JM01 culture. While after 32h, the concentration of 3-fucosyllactose in the supernatant of JM01 is approximately 21 mg L⁻¹, the 3-fucosyllactose concentration in the case of JM02 is above 51 mg L⁻¹.

The comparison of the total amounts of 3-fucosyllactose in cultures of *E. coli* JM01 and JM02 is depicted in Fig. 3.

Here the total amount of 3-fucosyllactose in *E. coli* JM01 cultures is represented by columns I and the total amount of 3-fucosyllactose in *E. coli* JM02 cultures is represented by columns II. Again, mean values from duplicate experiments are displayed.

After 32 h of incubation, the strain JM02 produces with 51.68 mg L⁻¹ approximately 57 % more 3-fucosyllactose in total than strain JM01 (32.99 mg L⁻¹).

Example 4: Discussion

The experimental results of the HPAEC-PAD analysis show, that strong differences in synthesis and transport of 3-fucosyllactose exist in between the strains JM01, without SetA overexpression, and JM02, overexpressing SetA.

To start with, 3-fucosyllactose is not detectable in the cellular moist mass of the JM02 culture, whereas a high concentration of 3-fucosyllactose can be measured in the supernatant.

This clearly indicates that the overexpression of SetA in *E. coli* leads to an extremely efficient export of 3-fucosyllactose from the cell.

Hence, the inventors have shown, that SetA, contrary to what was to be expected from the prior art, can efficiently export larger oligosaccharides featuring, in the present case, three subunits and a molecular mass of 488 g/mol.

By contrast, in the moist cell mass of the JM01, a considerable amount of 3-fucosyllactose is detected, whereas only comparably little 3-fucosyllactose is present in the supernatant.

This result shows that, in absence of overexpressed SetA, 3-fucosyllactose strongly accumulates in the cytosol of the bacterial cells. The fact that also under these circumstances 3-fucosyllactose is detected in the supernatant can, according to the current state of knowledge, be attributed to increased lysis of bacterial cells resulting from high intracellular 3-fucosyllactose concentrations.

When comparing the overall amounts of 3-fucosyllactose in the JM01- and JM02-cultures, it becomes evident that the overexpression of SetA not only leads to increased concentration of 3-fucosyllactose in the supernatant, but also heightens the total amount of synthesized 3-fucosyllactose (see Figure 3).

This increase in overall synthesis efficiency can be attributed to a higher cell viability of the cells overexpressing SetA, which viability would be due to the avoidance of product-cytotoxicity. Alternatively or in addition, the increase in overall synthesis efficiency can also be attributed to the avoidance of product-inhibitory effects on the synthetic enzymes due to product-export mediated by overexpressed SetA.

Hence, the inventors have shown that overexpression of the SetA transporter is an efficient way to enhance the output of oligosaccharide synthesis, accomplished by biotechnical methods employing culturable cells. Further, as product-inhibition of the relevant synthetic enzymes and cytotoxicity of the synthesis product can be mostly avoided, the production is facilitated and made more controllable.

List of References

Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F. & M. Aebi, (2006) Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J* 25(5): 967-976.

Albermann, C., W. Piepersberg & U. F. Wehmeier, (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr Res* 334: 97-103.

Andersson, B., O. Porras, L. A. Hanson, T. Lagergard & C. Svanborg-Eden, (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* 153: 232-237.

Bode, L., (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr* 136: 2127-2130.

Boehm, G. & B. Stahl, (2007) Oligosaccharides from milk. *J Nutr* 137: 847S-849S.

Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, B. Facinelli, L. Ferrante, R. Capretti & G. Orazio, (2006) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrhea pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res* 59: 377-382.

Coyne, M. J., B. Reinap, M. M. Lee & L. E. Comstock, (2005) Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307: 1778-1781.

Crane, J. K., S. S. Azar, A. Stam & D. S. Newburg, (1994) Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J Nutr* 124: 2358-2364.

Cravioto, A., A. Tello, H. Villafan, J. Ruiz, S. del Vedovo & J. R. Neeser, (1991) Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* 163: 1247-1255.

Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-5.

Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-45.

Dumon, C, C. Bosso, J. P. Uille, A. Heyraud & E. Samain, (2006) Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* 7: 359-365.

Dumon, C, B. Priem, S. L. Martin, A. Heyraud, C. Bosso & E. Samain, (2001) In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj J* 18: 465-474.

Dumon, C, E. Samain & B. Priem, (2004) Assessment of the two *Helicobacter pylori* alpha-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 20:412-419.

Gnoth, M. J., S. Rudloff, C. Kunz & R. K. Kinne, (2001) Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* 276: 34363-34370.

Grant, W. D., I. W. Sutherland & J. F. Wilkinson, (1970) Control of colanic acid synthesis. *J Bacteriol* 103: 89-96.

Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata, H. Nagano, J. Ohnishi & A. Ozaki, (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25: 213-217.

Kretzschmar, G. & W. Stahl, (1998) Large scale synthesis of linker-modified sialyl-Lewis(X), Lewis(X) and N-acetyllactosamine. *Tetrahedron* 54: 6341-6358.

Kunz, C. & S. Rudloff, (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 16: 1341-1346.

Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein & S. Strobel, (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 20: 699-722.

Liu, J. Y., P. F. Miller, M. Gosink & E. R. Olson, (1999a) The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31:1845-1851.

Liu, J. Y., P. F. Miller, J. Willard & E. R. Olson, (1999b) Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22977-22984.

Newburg, D. S., (2001) Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Adv Exp Med Biol* 501: 3-10.

Newburg, D. S. & S. H. Neubauer, (1995) Carbohydrates in milk. In: Handbook of Milk Composition. R. G. Jensen (ed). San Diego, CA: Academic Press, pp. 273-349.

Parkot, J., E. Hűfner & S. Jennewein, (2008) Synthesis of fucosylated compounds. European patent application EP08172267.

Ruiz-Palacios, G. M., L. E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia & D. S. Newburg, (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2 Gal beta 1, 4 GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* 278: 14112-14120.

Samain, E., V. Chazalet & R. A. Geremia, (1999) Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J Biotechnol* 72: 33-47.

Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Claims

1. Cell to be stably cultured in a medium, which cell is adjusted for the production of oligosaccharides, the cell being transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for an enzyme involved in oligosaccharide synthesis,

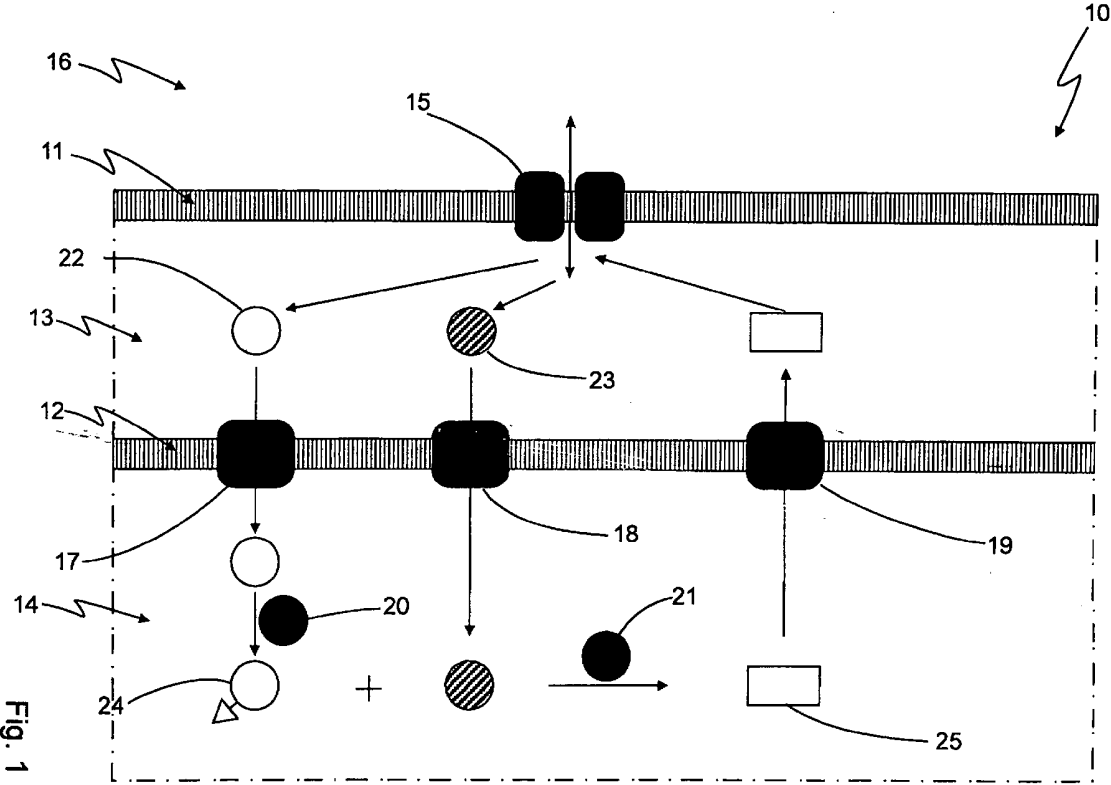
characterized in that

the cell in addition is transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein of the sugar efflux transporter family, a functional homolog or derivative thereof.
2. Cell according to claim 1, characterized in that the cell is selected from the group consisting of bacteria, fungi, animal and plant cells.
3. Cell according to claim 2, characterized in that the cell is an *Escherichia coli* cell.
4. Cell according to anyone of claims 1 to 3, characterized in that the enzyme is selected from the group comprising glycosyltransferase, Leloir type glycosyltransferase, non-Leloir glycosyltransferase, fucosyltransferase, sialyltransferase, galactosyltransferase, mannosyltransferase, *N*-Acetylglucosaminyltransferase, *N*-Acetylgalactosaminyltransferase.
5. Cell according to claim 4, characterized in that the enzyme is a fucosyltransferase.
6. Cell according to anyone of claims 1 to 5, characterized in that the sugar efflux transporter is SetA or a derivative thereof.

7. Cell according to anyone of claims 1 to 6, characterized in that it is further transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein facilitating or promoting the import of educts required for oligosaccharide synthesis.
8. Cell according to claim 7, characterized in that it is transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein selected from the group consisting of lactose transporter, fucose transporter, sialic acid transporter, galactose transporter, mannose transporter, *N*-acetylglucosamine transporter, *N*-acetylgalactosamine transporter, ABC-transporter, transporter for a nucleotide-activated sugar and transporter for a nucleobase, nucleoside or nucleotide.
9. Cell according to anyone of claims 1 to 8, characterized in that it is further transformed to comprise at least one nucleic acid sequence coding for a protein selected from the group consisting of nucleotidyltransferase, guanylyltransferase, uridylyltransferase, Fkp, L-fucose kinase, fucose-1-phosphate guanylyltransferase, CMP-sialic acid synthetase, galactose kinase, galactose-1-phosphate uridylyltransferase, glucose kinase, glucose-1-phosphate uridylyltransferase, mannose kinase, mannose-1-phosphate guanylyltransferase, GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose reductase, glucosamine kinase, glucosamine-phosphate acetyltransferase, *N*-acetyl-glucosamin-phosphate uridylyltransferase, UDP-*N*-acetylglucosamine 4-epimerase, UDP-*N*-acetyl-glucosamine 2-epimerase.
10. Cell according to anyone of claims 1 to 9, characterized in that it comprises a catabolic pathway for selected mono-, di- or oligosaccharides, which is at least partially inactivated, the mono-, di- or oligosaccharides being involved in and/or required for the synthesis of oligosaccharides.

11. Cell according to anyone of claims 1 to 10, characterized in that the oligosaccharides comprise at least three subunits and/or feature a molecular weight of at least about 480 g/mol.
12. Method for the production of oligosaccharides, comprising the steps of:
 - a) providing a cell according to anyone of claims 1 to 11,
 - b) culturing the cell in a medium under conditions permissive for the production of said oligosaccharides,
 - c) extracting said oligosaccharides from the culture medium.
13. Method according to claim 12, characterized in that step b) is performed using a continuous flow bioreactor.
14. Method according to claim 12 or 13, characterized in that, the medium in step b) comprises one or more substances selected from the group consisting of basic supplements for supporting cellular growth and propagation, selective agents, educts required for the synthesis of oligosaccharides, effectors of gene activity.
15. Method according to claim 14, characterized in that the educts are selected from the group consisting of arabinose, threose, erythrose, ribose, ribulose, xylose, glucose, D-2-deoxy-2-amino-glucose, N-acetylglucosamine, glucosamine, fructose, mannose, galactose, N-acetylgalactosamine, galactosamine, sorbose, fucose, N-acetylneuraminic acid, glycoside, non-natural sugar, nucleobase, nucleoside, nucleotide and any possible di- or polymer thereof.
16. Method according to anyone of claims 12 to 15, characterized in that the oligosaccharides comprise at least three subunits and/or feature a molecular weight of at least about 480 g/mol.

17. Method according to claim 16, characterized in that the oligosaccharide is fucosyllactose.



2/2

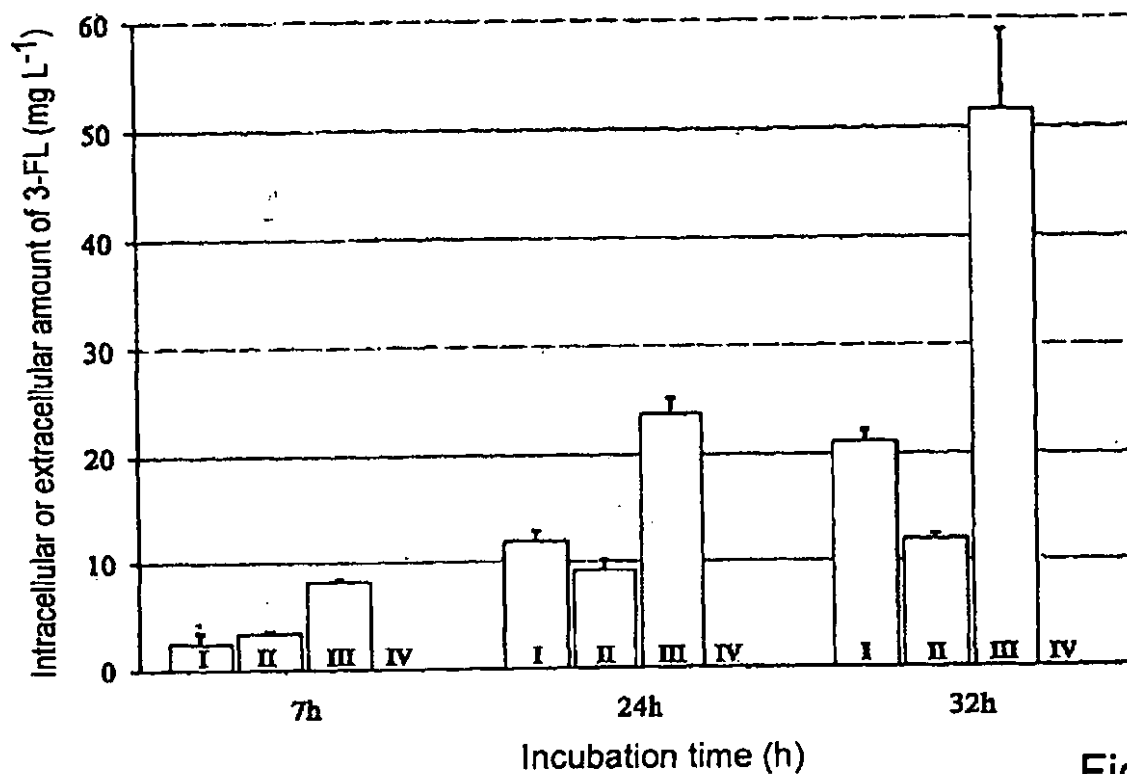


Fig. 2

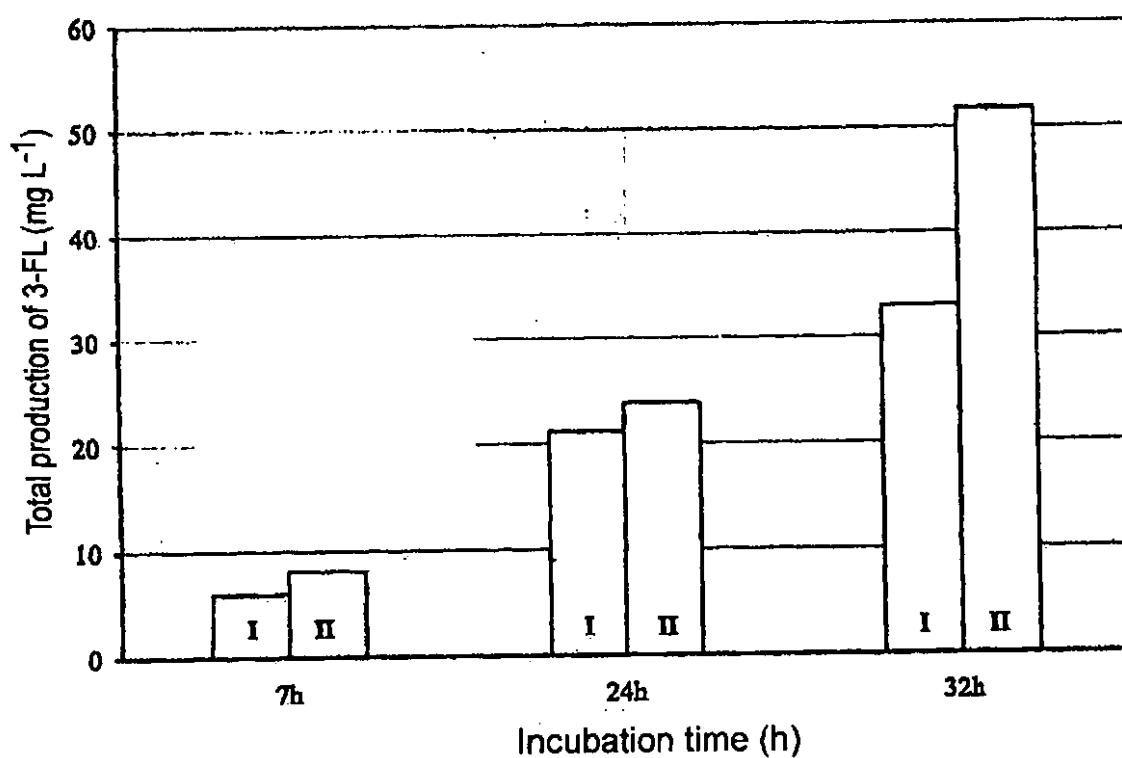


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/63 C12N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUMON CLAIRE ET AL: "In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of Helicobacter pylori alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered Escherichia coli" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, CHAPMAN & HALL, -- GB, no. 6, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 465-474, XP002380631 ISSN: 0282-0080	1-17
Y	the whole document	1-17
X	WO 99/11773 A1 (ABBOTT LAB [US]) 11 March 1999 (1999-03-11)	1-17
Y	the whole document	1-17
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2010

Date of mailing of the international search report

04/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISHIHARA HISAMITSU ET AL: "Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 104, no. 11, December 1999 (1999-12), pages 1621-1629, XP009130052 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-2
Y	CONDEMINE GUY: "Characterization of SotA and SotB, two Erwinia chrysanthemi proteins which modify isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside and lactose induction of the Escherichia coli lac promoter" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 182, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1340-1345, XP002332193 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "Functional and biochemical characterization of Escherichia coli sugar efflux transporters" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 33, 13 August 1999 (1999-08-13), pages 22977-22984, XP009129796 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "The identification of a new family of sugar efflux pumps in Escherichia coli" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 6, March 1999 (1999-03), pages 1845-1851, XP009129795 ISSN: 0950-382X the whole document	1-17
A	VACHON V ET AL: "TRANSMEMBRANE PERMEABILITY CHANNELS ACROSS THE OUTER MEMBRANE OF HAEMOPHILUS-INFLUENZAE TYPE B" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 162, no. 3, 1 June 1985 (1985-06-01), pages 918-924, XP009130006 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAULSEN I T ET AL: "Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 301, no. 1, 4 August 2000 (2000-08-04), pages 75-100, XP004472323 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-17

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/004112

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911773	A1	11-03-1999	AU 9220398 A	22-03-1999
			BG 104236 A	29-12-2000
			BR 9811733 A	05-09-2000
			CA 2302777 A1	11-03-1999
			CN 1273602 A	15-11-2000
			CO 4930313 A1	27-06-2000
			EP 1007651 A1	14-06-2000
			HU 0004709 A2	28-04-2001
			JP 2001520001 T	30-10-2001
			NO 20001105 A	05-05-2000
			PL 339132 A1	04-12-2000
			SK 3042000 A3	12-09-2000
			TR 200000500 T2	21-12-2000
			ZA 9807504 A	15-03-1999

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010)

(10) Número de publicación internacional
WO 2010/142305 A1

(51) Clasificación internacional de Patentes:
C12N 154/63 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/EP2009/004112
(22) Fecha de la presentación internacional
8 de junio de 2009 (8.06.2009)
(25) Idioma de la presentación: inglés
(26) Idioma de la publicación: inglés
(71) Solicitante (para todos los estados designados con
excepción de US) JENNEWEIN
BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Marweg 32,
53619 Rheinbreitbach (DE).
(72) Inventores; e
(71) Inventores/Solicitantes: (solamente para US)
JENNEWEIN, Stefan [DE/DE]; Maarweg 32, 53619
Rheinbreitbach (DE). HÜFNER, Eric [DE/DE]; Zur Sieg 8,
53773 Hennef (DE). PARKOT, Julia [DE/DE]; Trankgasse
8, 51143 Köln (DE).
(74) Representante: LAUFER, Gabriele; Witte, Weller &
Partner, Postfach 10 54 62, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Estados designados (en la medida en que no se
indique lo contrario para cada tipo de protección
nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: (en la medida en que no se
indique lo contrario para cada tipo de protección
regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW) Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con listado de secuencias en la descripción (regla 5.2(a))

(54) Título: Síntesis de HMO

(57) Resumen: Célula que puede ser cultivada de manera estable en un medio, que ha sido modificada para producir oligosacáridos, donde la célula ha sido transformada de manera tal que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una enzima que participa en la síntesis de los oligosacáridos. Además, la célula ha sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de la familia de los transportadores que participan en la exportación de los azúcares, o un homólogo funcional o un derivado de ésta. Método para producir oligosacáridos donde se emplea la célula mencionada.



Fig. 1

SÍNTESIS DE HMO

La presente invención se relaciona con una célula que puede ser cultivada de manera estable en un medio, que ha sido modificada para producir oligosacáridos, donde la célula ha sido transformada de manera tal que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una enzima que participa en la síntesis de los oligosacáridos.

Estas células se conocen, por ejemplo, a partir de Dumon et al., 2001.

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

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

Pueden distinguirse dos tipos básicos: los oligosacá-

ridos con estructuras del tipo I comprenden una fucosa unida a través de un enlace $\alpha 1,4$ a un residuo de GlcNAc, mientras que los oligosacáridos con estructuras del tipo II comprenden una fucosilación $\alpha 1,3$ en los residuos de GlcNAc o de glucosa. Cualquiera de ellos puede comprender una fucosa unida a través de un enlace $\alpha 1,2$ a una galactosa. Los oligosacáridos más prominentes son la 2'-fucosil-lactosa y la 3-fucosil-lactosa.

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

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

Además de los efectos locales en el tracto intestinal que se mencionaron con anterioridad, los HMO también pueden

provocar efectos sistémicos en los lactantes al ingresar en la circulación sistémica (Gnath et al., 2001). Los efectos que presentan los HMO sobre las interacciones entre las proteínas y los hidratos de carbono, por ejemplo, sobre la unión entre las selectinas y los leucocitos, abarcan la modulación de las respuestas inmunes y la reducción de las respuestas inflamatorias (Bode, 2006, Kunz y Rudloff, 2006).

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

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

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

Debido al hecho de que los HMO pueden hallarse solamente en concentraciones bajas en las fuentes naturales, tales como

la leche de otros mamíferos, la extracción de los oligosacáridos de las fuentes naturales no es apropiada para satisfacer la demanda de HMO.

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

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

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

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

En la mayoría de las publicaciones donde se describe la

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

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

Recientemente, los autores de la presente invención describieron un nuevo proceso de producción donde se emplean células completas y la enzima Fkp (Parkot et al., 2008). Los contenidos completos de la solicitud de patente correspondiente se incorporan en la presente a modo de referencia.

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

dos (Parkot et al., 2008).

Aunque se han desarrollado estrategias importantes sobre la base de una síntesis bioquímica como la que se mencionó con anterioridad, los métodos conocidos para sintetizar oligosacáridos in vivo presentan determinadas desventajas, que en el peor de los casos dan como resultado la inhibición de la producción en masa de oligosacáridos. Las dificultades más importantes en el contexto de la producción de oligosacáridos con rendimientos elevados a partir de células son el incremento descontrolado en la cantidad de los oligosacáridos producidos y los subproductos con nucleótidos en el interior de las células y la extracción de los oligosacáridos producidos.

Debido a que se acumulan en grandes cantidades en el interior de las células, los productos de la reacción de síntesis pueden inhibir gradualmente las enzimas que participan en la síntesis. Por lo tanto, en un punto determinado, la síntesis se torna ineficientemente lenta. Además, los productos pueden acumularse hasta alcanzar concentraciones citotóxicas, que pueden provocar la lisis de las células, o al menos una interrupción en su metabolismo. En cualquier caso, no es posible producir oligosacáridos continuamente en el interior de las células.

Adicionalmente, puede esperarse que la acumulación de cantidades excesivas de oligosacáridos eventualmente dé como resultado la lisis y la muerte de las células. Si se recurre a la lisis temprana o tardía de las células para extraer los oligosacáridos sintetizados, se obtiene una mezcla compleja

de los oligosacáridos deseados y diversos componentes de las células (metabolitos, restos). La purificación de los oligosacáridos deseados a partir de esta mezcla compleja es costosa, por lo que la mayoría de los oligosacáridos no son económicos.

Bajo estas circunstancias, la producción biotécnica de oligosacáridos es muy ineficiente y resulta difícil de controlar, especialmente si se tiene en cuenta que suele ponerse en práctica usando cultivos en lotes, los cuales no producen resultados satisfactorios desde el punto de vista económico.

Teniendo en cuenta lo anterior, un objetivo de la invención es mejorar los métodos de producción biotécnica de oligosacáridos para obtener procesos más sencillos y controlables y para incrementar el rendimiento de los oligosacáridos en general.

De acuerdo con la invención, estos y otros objetivos se cumplen cuando se provee una célula como la que se mencionó con anterioridad, que además ha sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de la familia de los transportadores que participan en la exportación de los azúcares, o un homólogo funcional o un derivado de ésta.

De esta manera, se cumple completamente el objetivo de la invención.

De acuerdo con la invención, los oligosacáridos hacen referencia a los polímeros cortos de monosacáridos que com-

prenden al menos 2 subunidades de azúcares. Los oligosacáridos pueden estar ramificados o pueden formar una cadena lineal de subunidades. Más aun, las subunidades de azúcares de los oligosacáridos pueden presentar numerosas modificaciones químicas. Por ende, los oligosacáridos de acuerdo con la presente invención pueden comprender una o más unidades que no son azúcares.

De acuerdo con la invención, una secuencia de ácido nucleico hace referencia a un código genético que está representado por un polímero de ácidos nucleicos, tal como un polímero de ácidos desoxirribonucleicos o un polímero de ácidos ribonucleicos. El código genético puede incluir secuencias codificantes que comprenden información para formar una proteína, así como regiones no codificantes, tales como regiones promotoras, regiones para fijar compuestos reguladores o auxiliares, separadores o secuencias estructurales que influyen en la estructura secundaria o terciaria del propio polímero de ácidos nucleicos y/o que participan en su procesamiento.

De acuerdo con la invención, la transformación hace referencia a cualquier método con el que puede insertarse al menos una secuencia de ácido nucleico adicional en una célula, de manera tal que la secuencia de ácido nucleico permanezca en el interior de la célula en forma de un plásmido o se integre en los uno o más cromosomas de la célula. Los métodos de transformación conocidos abarcan, por ejemplo, la transformación química y la electroporación. La transgénesis

estable, incluso en ausencia de agentes de selección, generalmente puede efectuarse integrando al menos una secuencia de ácido nucleico adicional en los cromosomas. Con este propósito, la célula puede infectarse con un virus o con un fago. Como alternativa, puede recurrirse a otros medios de recombinación homóloga o no homóloga, que por ejemplo, pueden comprender sistemas basados en virus o en transposones.

En el contexto de las aplicaciones biotecnológicas, la exportación de los oligosacáridos más grandes desde las células es un problema complejo. Esto se debe primariamente a que se han identificado unos pocos mecanismos celulares que participan en el transporte. La razón de la frecuencia reducida de la exportación de los oligosacáridos desde las células es que su síntesis implica el consumo de una gran cantidad de recursos intracelulares, por lo que la pérdida de estos compuestos generalmente resulta desfavorable para las células.

Más aun, la mayoría de los mecanismos conocidos con los que se exportan los oligosacáridos abarcan la modificación química de los oligosacáridos, por ejemplo, su unión a unidades lipídicas (Alaimo et al., 2006). En consecuencia, los oligosacáridos no solamente quedan anclados a la membrana, lo que impide su liberación en el medio, sino que también permanecen unidos a través de enlaces químicos a las unidades lipídicas, lo que reduce su solubilidad en los medios acuosos. Por lo tanto, estos mecanismos no son apropiados para emplearlos en la producción de oligosacáridos a gran escala.

La familia de los transportadores que participan en la

exportación de los azúcares (SET), que fue descrita por primera vez por Liu y sus colegas (Liu et al., 1999a) en *E. coli*, comprende las proteínas SetA, SetB y SetC. Pueden hallarse homólogos de las proteínas transportadoras (con identidades superiores a 50% a nivel de los aminoácidos) primariamente en las Enterobacteriaceae (Liu et al., 1999a).

Además de presentar especificidad por la glucosa y por la lactosa, las proteínas exportadoras de la familia SET presentan especificidad por determinados monosacáridos y determinados disacáridos, tales como la molécula inductora isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) y el análogo de azúcar tóxico O-nitrofenil- β -D-tiogalactósido (ONPG) (Liu et al., 1999b). Sin embargo, por medio de estudios bioquímicos se ha demostrado, por ejemplo, que SetA presenta una actividad de transporte reducida o nula con moléculas más grandes o voluminosas, tales como las heptosas o los trisacáridos.

Por las razones que se mencionaron con anterioridad, no puede esperarse que las proteínas exportadoras de la familia SET sean apropiadas para transportar los oligosacáridos.

Sin embargo, los inventores descubrieron que, mediante la sobreexpresión de las proteínas exportadoras de la familia SET, sorprendentemente se obtiene una exportación muy eficiente de oligosacáridos.

Más aun, se ha demostrado que las proteínas de la familia SET exportan lactosa, que es uno de los eductos en la reacción de síntesis. Entonces, podía esperarse que la síntesis de los oligosacáridos en las células modificadas procediera

con una eficiencia y una velocidad muy bajas, debido a la eliminación constante de los eductos de las células.

Sin embargo, los inventores demostraron por primera vez que, a pesar de la sobreexpresión de las proteínas exportadoras de la familia SET, la síntesis de oligosacáridos resulta altamente productiva en las células modificadas.

En general, resulta preferible que la célula se seleccione del grupo que consiste en las células bacterianas, las células fúngicas, las células animales y las células vegetales. En el contexto de la presente invención, resulta particularmente preferible que la célula sea una célula de *Escherichia coli*.

La ventaja de la presente invención es que las células de *E. coli* presentan una actividad metabólica y una frecuencia reproductiva elevadas. Además, *E. coli* es uno de los organismos que mejor han sido caracterizados a nivel molecular para propósitos biológicos y biotécnicos. Diversos procedimientos para transformar y cultivar bacterias que son conocidos en la técnica han sido adaptados especialmente para *E. coli*. Además, en el ámbito comercial hay disponibles cepas de *E. coli* que presentan diversos antecedentes genéticos.

Adicionalmente, resulta preferible que la enzima se seleccione del grupo que consiste en la glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa del tipo de Leloir, la glicosiltransferasa de un tipo diferente al de Leloir, la sialiltransferasa, la galactosiltransferasa, la fucosiltransferasa, la manosiltransferasa, la N-acetilglucosaminiltransferasa y la

N-acetilgalactosaminiltransferasa.

De acuerdo con una forma de realización, la enzima es una fucosiltransferasa.

Más aun, resulta preferible que el transportador que participa en la exportación de los azúcares sea SetA o un derivado de éste. En este caso, la ventaja es que, entre los miembros de la familia de proteínas de transporte SET que han sido caracterizados a nivel bioquímico, SetA presenta la especificidad más amplia por los sustratos. De esta manera, con SetA puede ser posible exportar y producir una variedad más amplia de oligosacáridos.

También resulta preferible que la célula haya sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína que facilite o promueva la importación de los eductos que son necesarios para sintetizar los oligosacáridos.

En este caso, resulta ventajoso incrementar la concentración de los eductos en las células. Bajo circunstancias normales, la importación de eductos como la fucosa o la lactosa está limitada por la disponibilidad de las proteínas importadoras correspondientes. Sin embargo, en el caso de una célula que ha sido modificada para sintetizar oligosacáridos a gran escala, la importación de los eductos basada en los niveles endógenos de las proteínas importadoras puede ser insuficiente para proveer un suministro constante para la reacción de síntesis. Este problema puede solucionarse sobreexpresando las proteínas importadoras en cuestión.

Las proteínas importadoras relevantes para la presente invención son primariamente los importadores de monosacáridos o de disacáridos, tales como los importadores de lactosa, por ejemplo, la β -galactósido permeasa de *E. coli* (LacY), o los importadores de fucosa, por ejemplo, la fucosa permeasa de *E. coli* (FucP), así como los importadores de nucleótidos y de otros eductos.

Resulta especialmente preferible que la célula haya sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína seleccionada del grupo que consiste en un transportador de lactosa, un transportador de fucosa, un transportador de ácido siálico, un transportador de galactosa, un transportador de manosa, un transportador de N-acetilglucosamina, un transportador de N-acetilgalactosamina, un transportador ABC, un transportador de un azúcar activado con un nucleótido y un transportador de una nucleobase, de un nucleósido o de un nucleótido.

En este contexto, un azúcar activado con un nucleótido puede ser, sin limitaciones, la GDP-fucosa, el CMP-ácido siálico, la UDP-galactosa, la UDP-glucosa, la GDP-manosa, la UDP-glucosamina o la UDP-galactosamina.

Además, el término nucleobase abarca la guanina, la citosina, la adenina, la timina y el uracilo. Los nucleósidos abarcan la guanosina, la citidina, la adenosina, la timidina y la uridina, mientras que los nucleótidos pueden ser monofosfatos, difosfatos o trifosfatos de guanosina, de citidina, de adenosina, de timidina o de uridina.

Adicionalmente, resulta preferible que la célula también haya sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína seleccionada del grupo que consiste en la nucleotidiltransferasa, la guanililtransferasa, la uridililtransferasa, Fkp, la L-fucosa quinasa, la fucosa-1-fosfato guanililtransferasa, la CMP-ácido siálico sintetasa, la galactosa quinasa, la galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, la glucosa quinasa, la glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, la manosa quinasa, la manosa-1-fosfato guanililtransferasa, la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa reductasa, la glucosamina quinasa, la glucosaminafosfato acetiltransferasa, la N-acetil-glucosaminafosfato uridililtransferasa, la UDP-N-acetilglucosamina 4-epimerasa y la UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa.

En este contexto, el término nucleotidil transferasa generalmente hace referencia a una enzima que puede transferir nucleótidos a fosfoazúcares, que pueden ser azúcares naturales o no naturales.

En este caso, tal como se describe en Parkot et al., 2008, que se incorpora en la presente a modo de referencia, la ventaja es que pueden incrementarse las reservas intracelulares de azúcares activados con nucleótidos, tales como la GDP-fucosa, con lo que puede incrementarse la eficiencia de la síntesis de los oligosacáridos. Más aun, generalmente resulta preferible inactivar al menos parcialmente la vía catabólica de los monosacáridos, los disacáridos o los oligosacáridos que son necesarios para la reacción de síntesis en

cuestión.

De esta manera, la ventaja se basa en el hecho de que puede incrementarse la eficiencia general de la síntesis. Esto se debe a que se consume una menor cantidad de los eductos que están destinados a la síntesis de los oligosacáridos a través del metabolismo endógeno de la célula.

En la forma de realización que se describirá más adelante, por ejemplo, se emplean células que presentan deficiencias a nivel de la degradación de la lactosa. Esto puede efectuarse inactivando la enzima β -galactosidasa, que está codificada por el gen lacZ. Con esta modificación genética, se impide la escisión intracelular de la lactosa en monosacáridos que pueden ser metabolizados rápidamente, tales como la glucosa y la galactosa. De esta manera, la lactosa está presente en una mayor concentración, como una molécula aceptora que puede participar en las reacciones de glucosilación/fucosilación.

En una forma de realización alternativa, las células que se emplean para sintetizar los oligosacáridos presentan deficiencias a nivel de la degradación de la L-fucosa, que pueden estar combinadas o no con la deficiencia a nivel de lacZ que se describió con anterioridad. Esto puede efectuarse inactivando el gen fucA, que codifica una enzima catabólica fundamental en la vía de la degradación de la fucosa, la fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA).

Evidentemente, es posible emplear otros procedimientos para inactivar al menos parcialmente las vías catabólicas,

que abarcan los inhibidores enzimáticos y la transfección estable con construcciones de ARNi.

Dentro del alcance de la presente invención, generalmente resulta preferible que los oligosacáridos comprendan al menos tres subunidades y/o que presenten un peso molecular de al menos aproximadamente 480 g/mol.

Los HMO más importantes tienen un peso molecular superior a este umbral.

La presente invención también se relaciona con un método para producir oligosacáridos que comprende los siguientes pasos:

- a) proveer una célula de acuerdo con la invención,
- b) cultivar la célula en un medio, bajo condiciones apropiadas para producir los oligosacáridos, y
- c) extraer los oligosacáridos del medio de cultivo.

Dentro del alcance de la presente invención, las condiciones apropiadas son condiciones que están relacionadas con parámetros físicos o químicos, que incluyen, sin limitaciones, la temperatura, el pH, la presión, la presión osmótica y la concentración de productos o de eductos.

En una forma de realización particular, las condiciones apropiadas pueden incluir una temperatura en el rango de $30 \pm 20^{\circ}\text{C}$ y un pH en el rango de 7 ± 3 .

La ventaja del método que se describió con anterioridad es que los oligosacáridos pueden extraerse directamente del medio de cultivo, mientras que en los métodos conocidos precedentes es necesario lisar las células y luego extraer los

oligosacáridos del lisado resultante.

En este contexto, resulta preferible que el paso b) se lleve a cabo usando un biorreactor de flujo continuo.

Cuando se emplea un biorreactor de flujo continuo, se obtiene la ventaja de que puede incrementarse fácilmente la cantidad de oligosacáridos producidos. Esto se debe a que la síntesis ocurre en un nivel continuamente elevado.

También resulta preferible que el medio en el paso b) comprenda una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en los suplementos básicos para soportar el crecimiento y la propagación de las células, los agentes de selección, los efectores de la actividad de los genes y los eductos necesarios para sintetizar los oligosacáridos.

Los suplementos típicos para soportar el crecimiento y la propagación de las células son bien conocidos a partir de los antecedentes técnicos y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russel, 2001. Estos suplementos básicos sirven para satisfacer la demanda general de nutrientes de las células, y por ejemplo, abarcan las proteínas, los hidratos de carbono, los lípidos y los minerales.

A partir de los antecedentes técnicos, tales como Sambrook y Russel, 2001, también se conocen los agentes de selección, que pueden ser antibióticos. Estos agentes pueden usarse para proteger los cultivos de células modificadas genéticamente de la contaminación persistente con organismos competidores, que pueden ser hongos o bacterias. Adicionalmente, por ejemplo, en las poblaciones de bacterias, los

agentes de selección pueden emplearse para estabilizar la información genética que está presente en los plásmidos.

Los efectores de la actividad de los genes pueden usarse para inducir o reprimir selectivamente la actividad de determinados genes o conjuntos de genes en una célula. Estos efectores pueden ser compuestos químicos simples, tales como el isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG), o compuestos más complejos, tales como las hormonas. Los efectores de la actividad de los genes también son conocidos a partir de los antecedentes técnicos, por ejemplo, Sambrook y Russel, 2001.

Aun más, resulta preferible que los eductos se seleccionen del grupo que consiste en la arabinosa, la treosa, la eritrosa, la ribosa, la ribulosa, la xilosa, la glucosa, la D-2-desoxi-2-amino-glucosa, la N-acetilglucosamina, la glucosamina, la fructosa, la manosa, la galactosa, la N-acetilgalactosamina, la galactosamina, la sorbosa, la fucosa, el ácido N-acetilneuramínico, los glucósidos, los azúcares no naturales, las nucleobases, los nucleósidos, los nucleótidos y cualquier dímero o polímero posible de éstos.

En general, resulta preferible que los oligosacáridos comprendan al menos tres subunidades y/o presenten un peso molecular de al menos aproximadamente 480 g/mol.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, el oligosacárido que se produce con el método que se describió con anterioridad es la fucosil-lactosa. En este caso, la ventaja es que la fucosil-lactosa es uno de los HMO más prominentes. Pueden deducirse otras ventajas a partir de

la descripción de las formas de realización y los dibujos adjuntos.

Ha de resultar evidente que las características que se describieron con anterioridad y las características que se describirán más adelante pueden combinarse de cualquier manera posible, sin apartarse del alcance de la presente invención.

En la descripción detallada más adelante y en las figuras, que se describen a continuación, se detallan diversas formas de realización de la invención.

La figura 1 es una representación esquemática de la síntesis y el transporte de los oligosacáridos en el interior de una célula bacteriana gram negativa modificada de acuerdo con la invención.

En la figura 2 se ilustran los resultados de las mediciones de la 3-fucosil-lactosa en masas húmedas y sobrenadantes celulares provenientes de cultivos de bacterias, con una comparación entre diversos genotipos.

En la figura 3 se ilustra una comparación de la cantidad de 3-fucosil-lactosa sintetizada en cultivos de bacterias con diversos genotipos.

Ejemplo 1. Síntesis y transporte de oligosacáridos en forma de aceite en el interior de una célula bacteriana gram negativa

En la figura 1 se representa una sección de una célula bacteriana gram negativa 10. La célula bacteriana gram negativa 10 de acuerdo con la invención comprende una membrana

externa 11, una membrana plasmática 12, un espacio periplásmico 13, que está localizado entre la membrana externa 11 y la membrana plasmática 12, y un citosol 14, que es el espacio rodeado por la membrana plasmática 12. La membrana externa comprende porinas, a través de las cuales pueden pasar los compuestos solubles en agua desde el medio 16 hasta el espacio periplásmico 13, y viceversa.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la membrana plasmática comprende FucP, que sirve como transportador para el primer educto 17, LacY, que sirve como transportador para el segundo educto 18, y SetA, que sirve para exportar el producto.

En el citosol 14 también están presentes los siguientes componentes: Fkp, que sirve como nucleotidiltransferasa 20, y FutAco, que sirve como glicosiltransferasa 21.

De acuerdo con esta forma de realización, cuando se introduce fucosa como primer educto 22 y lactosa como segundo educto 23 en el medio 16, éstas ingresan en el espacio periplásmico 13 a través de la porina 15. Después, el primer educto 22 es transportado hacia el citosol 14 por el transportador del primer educto 17. En el citosol, el primer educto 22 es modificado por la nucleotidiltransferasa 20 para obtener un primer educto modificado con un nucleótido 24, la GDP-fucosa.

El segundo educto 23 es importado en el citosol 14 por el importador del segundo educto 15.

Posteriormente, la glicosiltransferasa 21 cataliza una

reacción entre el primer educto modificado con un nucleótido, la GDP-fucosa, y el segundo educto, la lactosa, con lo que se obtiene el oligosacárido 25, la 3-fucosil-lactosa, y GDP (que no se ilustra).

Después, el oligosacárido 25 es exportado por el exportador del producto 19 (SetA) desde el citosol 14 hasta el espacio periplásmico 13, a partir del cual puede llegar al espacio periplásmico 13 e ingresar en el medio 16 a través de las porinas 15.

Ejemplo 2. Materiales y métodos

2.1. Construcción de los plásmidos de expresión y desarrollo de las cepas de *E. coli*

Se usó *E. coli* JM109(DE3) (Promega; www.promega.com) como cepa huésped inicial para desarrollar la cepa de producción de *E. coli*. Los oligonucleótidos cebadores que se emplearon en los procedimientos de clonación se detallan en la tabla 1. A continuación se describe la construcción de los plásmidos pACIC-lacY y pACIC-lacY-setA. Los genes lacY (que corresponde al acceso GenBank N° ACB02461; www.ncbi.nlm.nih.gov) y setA (que corresponde al acceso GenBank N° YP 025293) fueron amplificados a partir de ADN genómico de *E. coli* TOP10 (Invitrogen; www.invitrogen.com), usando los cebadores directo con lacY NcoI e inverso con lacY EcoRI y directo con setA NdeI e inverso con setA XhoI. Los productos de la PCR fueron sometidos a una digestión con las enzimas de restricción mencionadas y fueron unidos al vector de expresión pACICDuet-1 (Novagen;

www.merckbiosciences.co.uk), que había sido digerido de manera apropiada.

Los plásmidos resultantes se verificaron por medio de una digestión con enzimas de restricción, con una electroforesis en gel de agarosa y con una secuenciación con los cebadores pACICduetUP1, DuetDOWN-1, DuetUP2 y T7-terminador, para comprobar la inserción correcta de los genes (datos no presentados). Los plásmidos empleados, pCOLA-*tkp-fucP* y pET-*futAco*, son plásmidos que han sido construidos con anterioridad (Parkot et al., 2008). Para obtener las cepas JM00, JM01 y JM02, se introdujeron diversas combinaciones de plásmidos en *E. coli* JM109(DE3) por electroporación (Dower et al., 1988). Los plásmidos y las cepas de bacterias se detallan en la tabla 2.

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

Para prevenir la degradación de la fucosa provista desde el exterior, se suprimió el gen *fucA*, que codifica la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa, que es una enzima fundamental en el catabolismo de la fucosa, del cromosoma de *E. coli* JM109(DE3). Los oligonucleótidos cebadores que se emplearon en los procedimientos de mutagénesis se detallan en la tabla 1. Para construir la mutante con la supresión en *fucA*, se empleó la metodología de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000) y los cebadores *fucA-knock-f* y *fucA-knock-r*. La supresión correcta de *fucA* se confirmó por medio de una PCR donde se usaron los cebadores *fucA-control-f* y *fucA-control-r*, que rodean la localización de la inserción en el cromosoma. El

fenotipo negativo para fucosa se verificó sembrando las bacterias en agar mínimo M9 (Sambrook y Russell, 2001), con la adición de fucosa como única fuente de carbono (datos no presentados).

Tabla 1. Cebadores usados en el estudio

Nombre	Secuencia (5'→3')*	Sitio de restricción agregado
<i>fucA</i> -knock-f	AATTACTCTTCAATTCGTAA CCCATAGGTTTTGAATTTCT CCAGCACTACGGCAATCTCT TCATCGCTCAGCAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTCGAAGTTC	
<i>fucA</i> -knock-r	GGTGGGTAATTAAACGGCTA ATTCAATAGTGTGAAAGGAA CAACATTATTGCCCTGTTTT GAATCAGAGAGAGGGCTGAC ATGGGAATTAGCCATGGTCC	
<i>fucA</i> -control-f	CATTCTGTTAGCCATCATCC TTCTCC	
<i>fucA</i> -control-r	GAAGAAGATGGTGGGTAATT AAACGGC	
Directo con <i>setA</i> NdeI	AAGGGAAAA <u>CATATGATCT</u> GGATAATGACGATGGCTCGC CGTATGAACGGTG	NdeI
Inverso con <i>setA</i> XhoI	AAGGGAAAA <u>CTCGAGCCAC</u> GTCATCAAACGTCTTTAACC	XhoI

TTTGCGG

Directo con lacY	NcoI	AAGGAAATATACCATGGGCT	NcoI
		ACTATTTAAAAAACACAAAC	
		TTTTGGATGTTTCGG	
Inverso con lacY	EcoRI	AAGGAAAACCGAATTCGATT	EcoRI
EcoRI		GCTTAAGCGACTTCATTCAC	
		CTGACGACGCAGCAGGG	
pACICduetUP1		GGATCTCGACGCTCTCCCT	
DuetDO4VN-1		GATTATGCGGCCGTGTACAA	
DuetUP2		TTGTACACGGCCGCATAATC	
T7-terminador		TATGCTAGTTATTGCTCAG	

*Los sitios para las endonucleasas de restricción se representan subrayados.

Tabla 2. Cepas de bacterias y plásmidos empleados en el estudio.

Nombre	Características	rele-	Referencias
	vantes		
Cepas de <i>E. coli</i>			
TOP10	F- <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i>), ϕ 801 <i>lacZAM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (StrR)</i> <i>endAI nupG</i>		Invitrogen

JM109(DE3) *endA1, recA1, gyrA96, Promega*
thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺),
relA1, supE44, λ-,
Δ(lac proAB), [F',
traD36, proAB, la-
cI°ZΔM15], 1DE3

JM109(DE3) *fucA* Una mutante de Este estudio
 JM109(DE3) con una
 supresión en *fucA*

JM00 Una cepa control Este estudio
 negativa JM109(DE3) con
 los vectores vacíos
pCOLADuet-1, pETDuet-1
 y *pACICDuet-1*

JM01 JM109(DE3) con *pCOLA-* Este estudio
fkp-fucP, pET-futAco y
pACIC-lacY

JM02 JM109(DE3) con *pCOLA-* Este estudio
fkp-fucP, pET-futAco y
pACIC-lacY-setA

JM03 JM109(DE3) con *pCOLA-* Este estudio
fkp-fucP y *pA-CYC-lacY-*
setA

JMA00 Una cepa control Este estudio
 negativa JM109(DE3)
ΔfucA con los vectores
 vacíos *pCOLADuet-1,*

pETDuet-1 y pACICDuet-1

JMA01	JM109(DE3) $\Delta fucA$ con Este estudio pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACIC- <i>lacY</i>
JMA02	JM109(DE3) $\Delta fucA$ con Este estudio pCOLA- <i>tkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> y pACIC- <i>lacY</i> - <i>setA</i>
JMA03	JM109(DE3) $\Delta fucA$ con Este estudio pCOLA- <i>fkp-fucP</i> y pACIC- <i>lacY-setA</i>
Plásmidos	
pCOLADuet-1	Vector de expresión, Novagen KmR
pETDuet-1	Vector de expresión, Novagen ApR
pACICDuet-1	Vector de expresión, Novagen CmR
pCOLA- <i>fkp-fucP</i>	Un vector con los genes Parkot et <i>fkp</i> y <i>fucP</i> , KmR al., 2008
pET- <i>futAco</i>	Un vector con un gen de Parkot et fucosiltransferasa de al., 2008 <i>H. pylori</i> sometido a una optimización de codones, ApR

pACIC-lacY Un vector con un gen Este estudio
lacY, CmR

pACIC-lacY-setA Un vector con los genes Este estudio
lacY y setA, CmR

ApR, resistencia a la ampicilina; KmR, resistencia a la kanamicina; CmR, resistencia al cloranfenicol.

2.3. Condiciones del cultivo y preparación de los extractos celulares

Las cepas de *E. coli* se inocularon en una dilución de 1:100, a partir de cultivos que se habían desarrollado durante la noche en 100 ml de un medio mineral (Samain et al., 1999) que contenía 7,0 g/l de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 7,0 g/l de K_2HPO_4 , 1,0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de ácido cítrico, 2,0 g/l de KOH, 0,0045 g/l de tiamina·HCl y 7,5 ml/l de una solución de minerales traza. La solución madre de minerales traza contenía triacetato de nitrilo 70 mM (pH 6,5), 7,5 g/l de citrato férrico, 1,3 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,21 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,13 g/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l de H_3BO_3 , 1,2 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,15 g/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Al medio se le agregó 0,1% de glucosa y 1% de glicerol como fuentes de carbono y 100 pg/ml de ampicilina, 50 pg/ml de kanamicina y/o 20 pg/ml de cloranfenicol, antes de realizar una incubación en un agitador rotativo a 37°C, de manera tal de proveer una buena aireación.

Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD_{600 nm}) de aproximadamente 1,0, se agregó el inductor isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) en una concentración de 0,5 mM y se incubaron los cultivos durante la noche a

28°C, con agitación constante. Después de aproximadamente 16 horas, se agregó L-fucosa 40 mM y lactosa 20 mM. Luego se incubaron los cultivos de manera continua a 28°C, con agitación constante.

En diversos puntos de tiempo, se tomaron muestras de 20 ml de los cultivos y se cosecharon las células por centrifugación. Los sobrenadantes de los cultivos fueron separados y fueron sometidos de inmediato a un análisis de cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño (HPAEC), o bien fueron almacenados a -20°C. Los precipitados celulares se lavaron con PBS (Sambrook y Russell, 2001), se suspendieron nuevamente en el quíntuple del volumen de agua destilada y se lisaron calentándolos a ebullición durante 10 minutos. Para obtener las fracciones intracelulares, se separaron los residuos celulares por centrifugación, y el lisado celular transparente se almacenó a -20°C o se sometió de inmediato a un análisis de HPAEC.

2.4. SDS-PAGE

La expresión de las proteínas heterólogas se verificó por SDS-PAGE (Sambrook y Russell, 2001; datos no presentados). Se prepararon extractos de proteínas en un amortiguador de carga para SDS en gel 1x y se colorearon los geles de poliacrilamida con azul brillante de Coomassie.

2.5. Detección de los oligosacáridos por medio de una cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño con una detección amperométrica con pulsos (HPAEC-PAD)

Las muestras fueron sometidas a un análisis de cromato-

grafía de intercambio aniónico de alto desempeño (HPAEC), con un detector amperométrico con pulsos Decade II (PAD; Antec Leyden; www.antec-leyden.nl) y una columna CarboPac PA20 (Dionex; www.dionex.com) conectada con un sistema de HPLC (Shimadzu; www.shimadzu.eu). La sensibilidad del detector se fijó en 50 pA, con un potencial de pulsación de 0,05 V.

Los monosacáridos, los disacáridos y los oligosacáridos fueron eluidos con hidróxido de sodio 10 mM, con una velocidad de flujo de 0,4 ml/minuto. Después realizar una elución isocrática con NaOH 10 mM durante 30 minutos, se lavó la columna con NaOH 200 mM durante 20 minutos, hasta alcanzar tiempos de retención constantes, y luego se realizó una regeneración con NaOH 10 mM durante 20 minutos. En todas las muestras analizadas, se usaron 20 µl de diluciones 1:2 en dH₂O para llevar a cabo el análisis de HPAEC. Con el análisis de HPAEC-PAD, se obtuvieron tiempos de retención de aproximadamente 3,5 minutos para la referencia de L-fucosa, de aproximadamente 15 minutos para la referencia de lactosa y de aproximadamente 11-12 minutos para la referencia de 3-fucosil-lactosa en la columna (datos no presentados). Las sustancias de referencia glicerol y glucosa, que habían sido agregadas al medio de cultivo como fuentes de carbono, presentaron tiempos de retención de aproximadamente 1,5 minutos y 7-8 minutos, respectivamente.

Ejemplo 3. Producción de 3-fucosil-lactosa y secreción dependiente de SetA en el medio de cultivo en una E. coli recombinante

El objetivo de este experimento fue investigar la exportación mediada por SetA de la 3-fucosil-lactosa intracelular. Se usaron las cepas de *E. coli* JM01 y JM02 (véase la tabla 2) en experimentos de fermentación. Las cepas JM01 y JM02, en las cuales se expresan las enzimas Fkp y FutAco (1,3-fucosiltransferasa) y las proteínas transportadoras FucP y LacY, solamente difieren por la expresión del transportador SetA. En JM01 no se produce SetA en exceso, mientras que en JM02 se produce SetA en exceso.

En la figura 2 se ilustran las cantidades de 3-fucosil-lactosa en masas húmedas y sobrenadantes celulares provenientes de cultivos de *E. coli* JM01 y JM02, donde dichas cantidades se determinaron con análisis de HPAEC-PAD.

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

En la figura, se representan las fracciones extracelulares de 3-fucosil-lactosa que se midieron en *E. coli* JM01 (donde no se sobreexpresa SetA) en las columnas I, mientras que las fracciones intracelulares se representan en las columnas II. En el caso de *E. coli* JM02 (donde se sobreexpresa SetA), se representan las fracciones extracelulares de 3-fucosil-lactosa en las columnas III y las fracciones intracelulares en las columnas IV. Todos los valores representan las medias obtenidas en experimentos por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar respectivas.

Sobre la base de estas mediciones, puede establecerse que en la cepa JM01, donde no se sobreexpresa SetA, se acumula 3-fucosil-lactosa en la fracción del citosol.

En contraste, la concentración intracelular de 3-fucosil-lactosa en la cepa JM002, donde se sobreexpresa SetA, es inferior al nivel de detección.

Adicionalmente, los sobrenadantes de los cultivos de JM01 y de JM02 presentan un contenido determinado de 3-fucosil-lactosa. Sin embargo, el contenido de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante del cultivo de JM02 es mucho mayor que el contenido de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante del cultivo de JM01. Si bien la concentración de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante de JM01 fue de aproximadamente 21 mg/l después de 32 horas, la concentración de 3-fucosil-lactosa en el caso de JM02 fue superior a 51 mg/l.

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

En la figura 3, la cantidad total de 3-fucosil-lactosa en los cultivos de *E. coli* JM01 se representa en las columnas I, y la cantidad total de 3-fucosil-lactosa en los cultivos de *E. coli* JM02 se representa en las columnas II. Una vez más, se proveen los valores medios obtenidos en experimentos por duplicado.

Después de 32 horas de incubación, la cepa JM02 produce un total de 51,68 mg/l de 3-fucosil-lactosa, aproximadamente 57% más que la cepa JM01 (32,99 mg/l).

Ejemplo 4. Discusión

Sobre la base de los resultados experimentales del análisis de HPAEC-PAD, puede establecerse que hay diferencias a nivel de la síntesis y el transporte de la 3-fucosil-lactosa entre las cepas JM01, donde no se sobreexpresa SetA, y JM02, donde se sobreexpresa SetA.

En primer lugar, no es posible detectar la 3-fucosil-lactosa en la masa celular húmeda del cultivo de JM02, mientras que puede observarse una concentración elevada de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante.

Esto refleja claramente que la sobreexpresión de SetA en *E. coli* da como resultado una exportación muy eficiente de 3-fucosil-lactosa desde la célula.

De esta manera, los inventores demostraron que SetA, en contraste con lo que podría haberse esperado sobre la base de los antecedentes técnicos, puede exportar oligosacáridos más grandes de manera eficiente. En este caso, los oligosacáridos comprenden tres subunidades y presentan una masa molecular de 488 g/mol.

En contraste, fue posible detectar una cantidad considerable de 3-fucosil-lactosa en la masa celular húmeda del cultivo de JM01, mientras que en el sobrenadante se observó una cantidad comparativamente muy pequeña.

Esto refleja que, en ausencia de la sobreexpresión de SetA, la 3-fucosil-lactosa se acumula en grandes cantidades en el citosol de las células bacterianas. Sobre la base del conocimiento técnico actual, la detección de la 3-fucosil-

lactosa en el sobrenadante, también bajo estas circunstancias, puede atribuirse a una lisis incrementada de las células bacterianas, que puede ser el resultado de las concentraciones elevadas de 3-fucosil-lactosa en su interior.

Cuando se comparan las cantidades totales de 3-fucosil-lactosa en los cultivos de JM01 y de JM02, resulta evidente que la sobreexpresión de SetA no solamente da como resultado una concentración incrementada de 3-fucosil-lactosa en el sobrenadante, sino que también provoca un incremento en la cantidad de 3-fucosil-lactosa sintetizada (véase la figura 3).

Este incremento en la eficiencia general de la síntesis puede atribuirse a una mayor viabilidad de las células donde se sobreexpresa SetA, que puede deberse a la anulación de la citotoxicidad provocada por el producto. Como alternativa o adicionalmente, el incremento en la eficiencia general de la síntesis puede atribuirse a la anulación de los efectos de inhibición de las enzimas que participan en la síntesis que podrían ser provocados por el producto, merced a la exportación del producto mediada por el transportador SetA sobreexpresado.

Por lo tanto, los inventores demostraron que la sobreexpresión del transportador SetA es un abordaje eficiente para incrementar el rendimiento de la síntesis de los oligosacáridos, que puede ponerse en práctica con métodos biotécnicos donde se emplean células en cultivos. Además, debido a que puede evitarse en gran medida la inhibición de las enzimas que participan en la síntesis que puede ser provocada por el

producto y la citotoxicidad que puede ser provocada por los productos de la síntesis, puede facilitarse y controlarse más apropiadamente la producción.

LISTA DE REFERENCIAS

Alaimo, C., Catrein, L, Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F., y M. Aebi, (2006) Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO* 125(5): 967-976.

Albermann, C., W. Piepersberg y U. F. Wehmeier, (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr. Res.* 334: 97-103.

Andersson, B., O. Porras, L. A. Hanson, T. Lagergard y C. Svanborg-Eden, (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* 153: 232-237.

Bode, L., (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.* 136: 2127-2130.

Boehm, G., y B. Stahl, (2007) Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 137: 8475-8495.

Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, B. Facinelli, L. Ferrante, R. Capretti y G. Orazio, (2006) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrhea pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. *Pediatr. Res.* 59: 377-382.

Coyne, M. J., B. Reinap, M. M. Lee y L. E. Comstock, (2005)

Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307: 1778-1781.

Crane, J. K., S. S. Azar, A. Stam y D. S. Newburg, (1994) Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J. Nutr.* 124: 2358-2364.

Cravioto, A., A. Tello, H. Villafan, J. Ruiz, S. del Vedovo y J. R. Neeser, (1991) Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect. Dis.* 163: 1247-1255.

Datsenko, K. A., y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-5.

Dower, W. J., J. F. Miller y C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.

Dumon, C., C. Bosso, J. P. Utille, A. Heyraud y E. Samain, (2006) Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem.* 7: 359-365.

Dumon, C, B. Priem, S. L. Martin, A. Heyraud, C. Bosso y E. Samain, (2001) In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj.* 118: 465-474.

Dumon, C, E. Samain y B. Priem, (2004) Assessment of the two

Helicobacter pylori alpha-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 20:412-419.

Gnoth, M. J., S. Rudloff, C. Kunz y R. K. Kinne, (2001) Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J. Biol. Chem.* 276: 34363-34370.

Grant, W. D., I. W. Sutherland y J. F. Wilkimson, (1970) Control of colanic acid synthesis. *J. Bacteriol.* 103: 89-96.

Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata, H. Nagano, J. Ohnishi y A. Ozaki, (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 213-217.

Kretzschmar, G., y W. Stahl, (1998) Large scale synthesis of linker-modified sialyl-Lewis(X), Lewis(X) and N-acetyllactosamine. *Tetrahedron* 54: 6341-6358.

Kunz, C., y S. Rudloff, (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int. Dairy* 116: 1341-1346.

Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein y S. Strobel, (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 699-722.

Liu, J. Y., P. F. Miller, M. Gosink y E. R. Olson, (1999a) The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31:1845-1851.

Liu, J. Y., P. F. Miller, J. Willard y E. R. Olson, (1999b)

Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *Journal of Biological Chemistry* 214: 22977-22984.

Newburg, D. S., (2001) Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 3-10.

Newburg, D. S., y S. H. Neubauer, (1995) Carbohydrates in milk, en *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen (editor), San Diego, CA: Academic Press, pp. 273-349.

Parkot, J., E. Hufner y S. jennewein (2008) Synthesis of fucosylated compounds. *Solicitud de patente europea EP081722b7*.

Ruiz-Palacios, G. M., L. E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia y D. S. Newburg, (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2 Gal beta 1, 4 GlcNac), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J. Biol. Chem.* 278: 14112-14120.

Samain, E., V. Chazalet y R. A. Geremia, (1999) Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J. Biotechnol.* 72: 33-47.

Sambrook, J., y D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Jennewein Biotechnologie GmbH
- <120> Síntesis de HMO
- <130> 2827P100WO

```

<160> 12
<170> Patentin version 3.3
<210> 1
<211> 100
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 1
aattactott caattcgtaa cccataggtt ttgaatttct ccagcaactac ggcaatctct 60
tcacgcgtca gcagtgtagg ctggagctgc ttcgaagttc 100
<210> 2
<211> 100
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 2
ggtgggtaat taaacggcta attcaatagt gtgaaaggaa caacattatt gccctgtttt 60
gaatcagaga gagggctgac atgggaatta gccatgggtcc 100
<210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 3
cattctgtta gccatcatcc ttctcc 26
<210> 4
<211> 27
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 4
gaagaagatg gtgggtaatt aaacggc 27
<210> 5
<211> 53
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 5
aagggaaaaa catatgatct ggataatgac gatggctcgc cgtatgaacg gtg 53
<210> 6
<211> 47
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 6
aagggaaaaa ctcgagccac gtcacaaac gtctttaacc tttgcgg 47
<210> 7
<211> 54
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 7
aaggaaatat accatgggct actattttaa aaacacaaac ttttggtatg tcgg 54
<210> 8
<211> 57
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 8

```

aaggaaatcc gaattcgatt gcttaagcga cttcattcac ctgacgacgc agcaggg 57
<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 9
ggatctcgac gctctccct 19
<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 10
gattatgcgg ccgtgtacaa 20
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 11
ttgtacacgg ccgcataatc 20
<210> 12
<211> 19
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 12
tatgctagtt attgctcag 19

REIVINDICACIONES

1. Una célula que puede ser cultivada de manera estable en un medio, que está modificada para producir oligosacáridos, donde la célula está transformada de manera tal que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima que participa en la síntesis de los oligosacáridos, **caracterizada** porque la célula también está transformada de manera tal que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la familia de los transportadores que participan en la exportación de los azúcares, o un homólogo funcional o un derivado de ésta.

2. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque la célula se selecciona del grupo que consiste en las células bacterianas, las células fúngicas, las células animales y las células vegetales.

3. Una célula de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque la célula es una célula de *Escherichia coli*.

4. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la enzima se selecciona del grupo que consiste en la glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa del tipo de Leloir, la glicosiltransferasa de un tipo diferente al de Leloir, la sialiltransferasa, la galactosiltransferasa, la fucosiltransferasa, la manosiltransferasa, la N-acetilglucosaminiltransferasa y la N-acetilgalactosaminiltransferasa.

5. Una célula de acuerdo con la reivindicación 4,

caracterizada porque la enzima es una fucosiltransferasa.

6. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el transportador que participa en la exportación de los azúcares es SetA o un derivado de éste.

7. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque también ha sido transformada de manera tal que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que facilita o promueve la importación de los eductos que son necesarios para sintetizar los oligosacáridos.

8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** porque ha sido transformada de manera tal que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en el transportador de la lactosa, el transportador de la fucosa, el transportador del ácido siálico, el transportador de la galactosa, el transportador de la manosa, el transportador de la N-acetilglucosamina, el transportador de la N-acetilgalactosamina, el transportador ABC, un transportador de un azúcar activado con un nucleótido y un transportador de una nucleobase, de un nucleósido o de un nucleótido.

9. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque también ha sido transformada de manera tal que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en la nucleotidiltransferasa, la

guanililtransferasa, la uridililtransferasa, Fkp, la L-fucosa quinasa, la fucosa-1-fosfato guanililtransferasa, la CMP-ácido siálico sintetasa, la galactosa quinasa, la galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, la glucosa quinasa, la glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, la manosa quinasa, la manosa-1-fosfato guanililtransferasa, la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa reductasa, la glucosamina quinasa, la glucosamina-fosfato acetiltransferasa, la N-acetil-glucosamina-fosfato uridililtransferasa, la UDP-N-acetilglucosamina 4-epimerasa y la UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa.

10. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada** porque comprende una vía catabólica de un monosacárido, un disacárido o un oligosacárido seleccionado que ha sido inactivada al menos parcialmente, donde el monosacárido, el disacárido o el oligosacárido son necesarios para sintetizar los oligosacáridos mencionados.

11. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** porque los oligosacáridos comprenden al menos tres subunidades y/o presentan un peso molecular de al menos aproximadamente 480 g/mol.

12. Un método para producir oligosacáridos que comprende los siguientes pasos:

- a) proveer una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,
- b) cultivar la célula en un medio, bajo condiciones apropiadas para producir los oligosacáridos, y

c) extraer los oligosacáridos del medio de cultivo.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado el paso b) se lleva a cabo usando un biorreactor de flujo continuo.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque el medio en el paso b) comprende una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en los suplementos básicos para soportar el crecimiento y la propagación de las células, los agentes de selección, los eductos necesarios para sintetizar los oligosacáridos y los efectores de la actividad de los genes.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque los eductos se seleccionan del grupo que consiste en la arabinosa, la treosa, la eritrosa, la ribosa, la ribulosa, la xilosa, la glucosa, la D-2-desoxi-2-amino-glucosa, la N-acetilglucosamina, la glucosamina, la fructosa, la manosa, la galactosa, la N-acetilgalactosamina, la galactosamina, la sorbosa, la fucosa, el ácido N-acetilneuramínico, los glucósidos, los azúcares no naturales, las nucleobases, los nucleósidos, los nucleótidos y cualquier dímero o polímero posible de éstos.

16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizado porque los oligosacáridos comprenden al menos tres subunidades y/o presentan un peso molecular de al menos aproximadamente 480 g/mol.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque el oligosacárido es la fucosil-lactosa.

SÍNTESIS DE HMO

RESUMEN

Célula que puede ser cultivada de manera estable en un medio, que ha sido modificada para producir oligosacáridos, donde la célula ha sido transformada de manera tal que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una enzima que participa en la síntesis de los oligosacáridos. Además, la célula ha sido transformada para que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de la familia de los transportadores que participan en la exportación de los azúcares, o un homólogo funcional o un derivado de ésta. Método para producir oligosacáridos donde se emplea la célula mencionada.

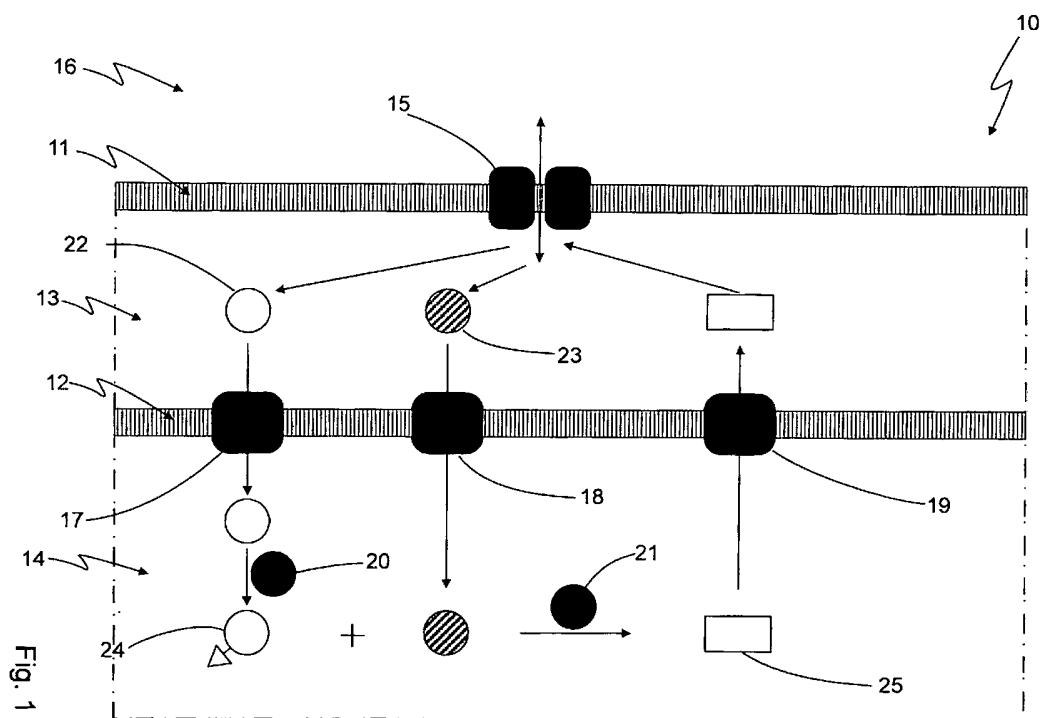


Fig. 1

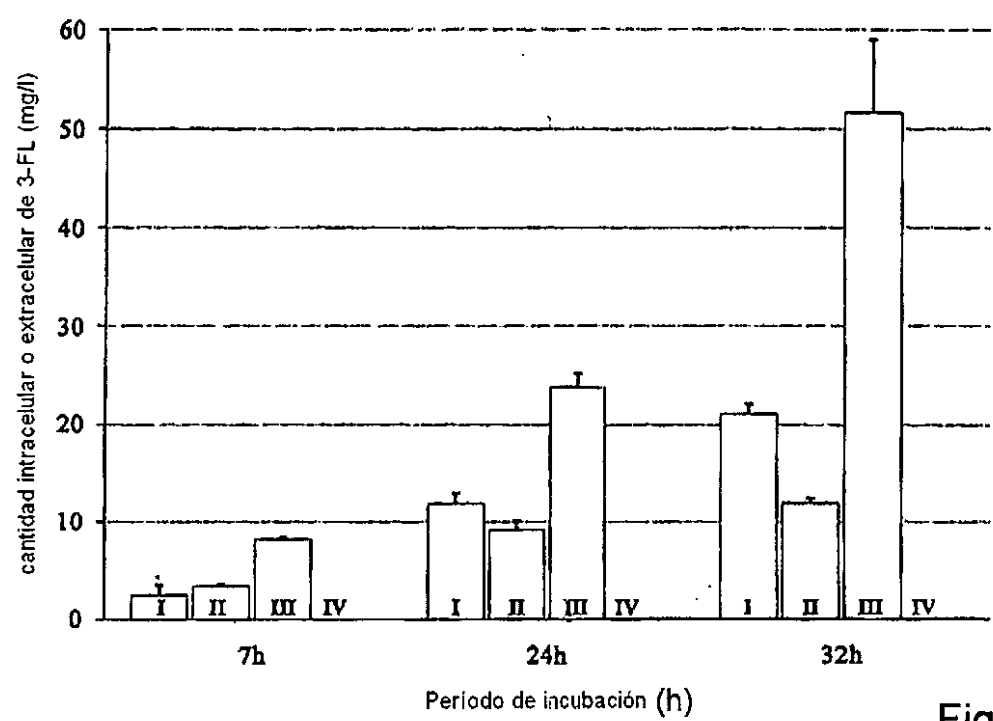


Fig. 2

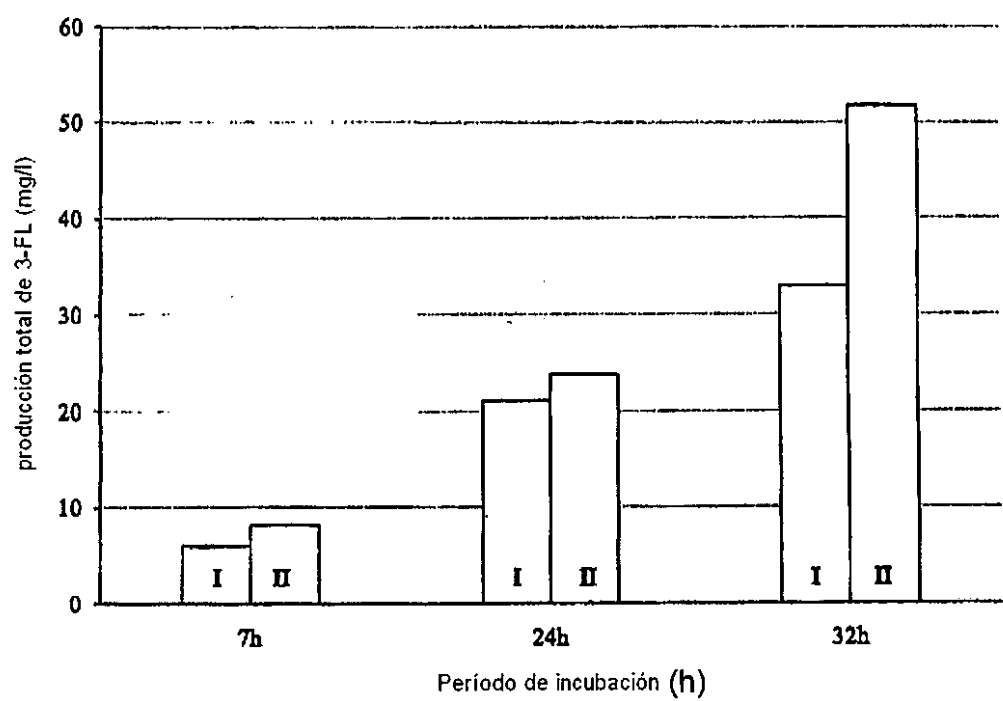


Fig. 3

2827P100WOST.25
SEQUENCE LISTING

<110> Jennewein Biotechnologie GmbH

<120> HMO synthesis

<130> 2827P100WO

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

aattactctt caattcgtaa cccatagggt ttgaatttct ccagcactac ggcaatctct 60

tcatcgctca gcagtgtagg ctggagctgc ttcgaagttc 100

<210> 2

<211> 100

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

ggtgggtaat taaacggcta attcaatagt gtgaaaggaa caacattatt gccctgtttt 60

gaatcagaga gagggtgac atgggaatta gccatggtcc 100

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

cattctgtta gccatcatcc ttctcc 26

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

gaagaagatg gtgggtaatt aaacggc 27

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

aagggaaaaa catatgatct ggataatgac gatggctcgc cgtatgaacg gtg 53

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

aagggaaaaa ctcgagccac gtcacaaac gtctttaacc tttgcgg 47

<210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 7
aaggaaatat accatgggct actatttaaa aaacacaaac ttttggatgt tcgg 54

<210> 8
<211> 57
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 8
aaggaaaacc gaattcgatt gcttaagcga cttcattcac ctgacgacgc agcaggg 57

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 9
ggatctcgac gctctccct 19

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 10
gattatgcgg ccgtgtacaa 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 11
ttgtacacgg ccgcataatc 20

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 12
tatgctagtt attgctcag 19

53

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

PCT

A

ver formulario PCT/ISA/220

INFORME ESCRITO
DEL ORGANISMO DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(regla PCT N° 43bis.1)

Fecha de envío (día/mes/año)

ver formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Referencia del Solicitante o Agente

ver formulario PCT/ISA/220

PROCEDER

Ver abajo, punto 2

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/004112

Fecha de Presentación Internacional

(día/mes/año)

08.06.2009

Fecha de Prioridad

(día/mes/año)

Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPK
INV. C12N15/63 C12N1/00

Solicitante

JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

- ☒ Campo N° I Fundamento del informe
- ☐ Campo N° II Prioridad
- ☐ Campo N° III No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
- ☐ Campo N° IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinados a apoyar esta resolución.
- ☐ Campo N° VI Documentos específicos expuestos
- ☐ Campo N° VII Falencias específicas de la solicitud internacional
- ☐ Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional

2. PROCEDER

Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 66.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán reconocidos.

Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.

Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.

3. Para otros detalles, ver las instrucciones del formulario PCT/ISA/220.

Nombre y Dirección Postal del ISA/
European Patent Office
D-80298 München
Tel.: +49 89 2399 - 0
Fax : +49 89 2399 - 4465

Fecha de confección
de este informe
ver formulario
PCT/ISA/210

Funcionario autorizado

Valcárcel, Rafael

Teléfono N° Tel.: +49 89 2399 - 2368

Formulario PCT/ISA/237 (carátula) (abril 2005)

INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/EP 2009/004112

Campo Nº I	Fundamento del Informe
1.	Con respecto al idioma, el informe se basa sobre ☒ La solicitud internacional en el idioma en que fue presentada ☐ una traducción del idioma original al siguiente idioma , el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2.	☐ Este informe ha sido confeccionado teniendo en cuenta la rectificación de un error obvio autorizada por o notificada a este Organismo bajo la regla 91 (regla 43bis.1(a)).
3.	Con respecto a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y requerida para la invención reivindicada, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base: a. Tipo de material ☒ listado de secuencias ☐ tablas del listado de secuencias b. Forma del material ☒ en papel ☒ en forma electrónica c. Momento de la presentación ☒ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada ☒ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma electrónica ☐ suministrado posteriormente ante el organismo a los efectos de la búsqueda
4.	☐ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
5.	Observaciones adicionales

59

INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/EP 2009/004112

Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43*bis*.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; menciones y explicaciones destinadas a apoyar esta resolución

1. Resolución
- | | | | |
|--------------------------|----|-------------------|-------------|
| Novedad | Sí | Reivindicaciones: | <u>3-17</u> |
| | No | Reivindicaciones: | <u>1-2</u> |
| Actividad inventiva | Sí | Reivindicaciones: | |
| | No | Reivindicaciones: | <u>1-17</u> |
| Aplicabilidad industrial | Sí | Reivindicaciones: | <u>1-17</u> |
| | No | Reivindicaciones: | |
2. Menciones y explicaciones:
- ver hoja adjunta

- 1 La numeración de los documentos corresponde al orden de mención en el informe de búsqueda internacional.

Carencia de claridad

- 2 **La reivindicación 1 no es clara**, contraviniendo los requisitos del artículo PCT 6 (ver secciones 3 a más abajo.)
- 3 La palabra **"ajustada"** en la expresión **"que es ajustada para la producción de oligosacáridos"** no es clara. No existe un significado reconocido en el estado de la técnica para la palabra "ajustada". En caso de emplear cualquier definición específica, esta debe incluirse en la(s) reivindicación(es).
- 4 La expresión **"una enzima involucrada en la producción de oligosacáridos"** se presta a interpretaciones y, por lo tanto, es considerada poco clara. Tal expresión es tan extremadamente vaga que se considera que cualquier enzima involucrada en la síntesis de glucosa, uno de los componentes de muchos polisacáridos, cae dentro de una enzima involucrada en la síntesis de oligosacáridos.
- 5 La expresión **"familia de transportadores de efluentes azucarados"** no es clara. Se advierte que tal expresión es empleada en D2, D3 o D4 (ver resúmenes). No obstante, D2 da a conocer que SotA es un miembro de la familia de transportadores de efluentes azucarados, mientras que SotB pertenece a la familia de efluentes multidroga (ver resumen). En tanto que SotB es capaz de realizar el vertido de azúcares, no está claro si es considerado también como un miembro de la familia de transportadores de efluentes azucarados o no. Por lo tanto, la expresión "familia de transportadores de efluentes azucarados" no es clara.
- 6 La carencia de claridad es extrema para las expresiones **"homólogo funcional"** y **"derivado del mismo"**. Es absolutamente poco claro que tipo de compuesto (proteína o cualquier otro compuesto) cae en el ámbito de tales términos. ¿Existe algún tipo de transportador o bomba que caiga dentro de estas definiciones?
- 7 La reivindicación 7 es poco clara porque la expresión **"una proteína que facilita o promueve la importación de eductos requeridos para la síntesis de oligosacáridos"** se presta a interpretaciones y, por lo tanto, es considerada poco clara. En este contexto, "un educto" puede incluir cualquier molécula que pueda ser transformada en; por ejemplo, glucosa, la que es requerida para la síntesis de oligosacáridos.
- 8 **La reivindicación 10 es poco clara** porque se refiere a **"una vía catabólica para mono-, di- o polisacáridos seleccionados, que está, al menos parcialmente, inactivada"**. Existen dos cuestiones poco claras: en primer lugar, el término "parcialmente" es relativo y poco claro en sí mismo; y en segundo lugar, tal definición vaga vuelve poco claro cual de los miles de mutantes están incluidos, porque pueden afectar (hasta en una mínima manera) una vía catabólica para mono-, di- o polisacáridos seleccionados. Se hace notar que uno de los oligosacáridos es la glucosa.
- 9 **La reivindicación 14 es poco clara** porque se refiere a **"suplementos básicos"**, a **"eductos requeridos para la síntesis de oligosacáridos"** y a **"causantes de actividad genética"**, y cualquiera de estas tres expresiones se presta a interpretaciones y, por ello, son poco claras.

Revelación insuficiente – Carencia de apoyo

Revelación insuficiente – Carencia de apoyo

- 10 La presente solicitud no cumple los requisitos de los artículos PCT 5 y 6 porque la descripción no da a conocer la invención de una manera suficientemente clara y completa para que la invención pueda ser llevada a cabo por una persona especialista en el estado de la técnica (contraviniendo el artículo PCT 5) y porque las reivindicaciones 1-17 no están completamente apoyadas por la descripción (contraviniendo el artículo PCT 6).
- 11 Las reivindicaciones se refieren a cualquier célula (eucariota o procariota) que es ajustada para la producción de cualquier tipo de oligosacáridos y transformada para comprender al menos una secuencia codificando cualquier enzima involucrada en la síntesis de oligosacáridos y también transformada para comprender al menos un ácido nucleico que codifica cualquier proteína de la familia de transportadores de efluentes azucarados, homólogos funcionales o derivado de la misma. A la cabeza de la extrema carencia de claridad de alguna de estas expresiones (ver secciones 2 - 6 arriba), el organismo de búsqueda internacional considera que la combinación de **cualquier** enzima involucrada en la síntesis de oligosacáridos y **cualquier** proteína de la familia de transportadores de efluentes azucarados es extremadamente poco probable que resulte en algún efecto positivo y en muchos casos puede tener efectos negativos. Solo la expresión de una combinación específica de ciertos transportadores y enzimas pueden producir el efecto deseado. Se considera una carga excesiva para el especialista encontrar la "combinación correcta" entre la inmensa variedad de posibilidades existentes.
- 12 En primer lugar, se considera que la familia de transportadores de efluentes azucarados es capaz de transportar los oligosacáridos producidos a los fines de obtener un cierto efecto. Si el transportador no es capaz de transportar los oligosacáridos, no se obtiene un efecto positivo.
- 13 En segundo lugar, incluso si una secuencia que codifica una enzima involucrada en la síntesis de un oligosacárido en particular es transformada en una célula, solo si tal enzima es una etapa limitante en la síntesis de tal oligosacárido, tal transformación resulta en un crecimiento del oligosacárido.
- 14 La presente solicitud da a conocer un ejemplo particular (ejemplo 3) en el que, mediante una transformación de *E. coli* con *setA*, *FucP*, *LacY* y *FutAco* bajo condiciones particular de cultivo, resulta una producción incrementada de 3-fucosilactosa. Se considera una carga excesiva para el especialista encontrar cualquier otra condición en cualquier tipo de células (incluyendo células eucariotas) bajo las cuales una transformación con cualquier otra enzima involucrada en la síntesis de oligosacáridos y cualquier miembro de la familia de transportadores de efluentes azucarados o derivado de la misma se pueda encontrar en el medio en una cantidad aumentada de oligosacáridos. Existen tantas posibilidades que encontrar cualquier otra realización es considerado una carga excesiva para el especialista. Más aún, la intención de extender la enseñanza en *E. coli* exhibida particularmente en el ejemplo 3 a cualquier tipo de células parece irrazonable.
- 15 En otras palabras, el ejemplo 3 de la presente solicitud resulta en una secreción aumentada de 3-fucosilactosa, pero tal ejemplo exitoso no se habría obtenido si *SetA* no fuera limitante, si *SetA* tuviera efectos tóxicos o si las 5 secuencias de nucleótidos particulares transformadas fueran transformadas en una célula eucariota.

Carencia de novedad

- 16 La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1), porque el **objeto de las reivindicaciones 1 y 2 no es novedoso a la vista de D3** en el sentido del artículo PCT 33(2).

D3 da a conocer la sobreexpresión en células animales de dos genes (ver resumen).

- lactatodehidrogenasa, una enzima que, bajo ciertas circunstancias, está involucrada en la síntesis de glucosa (ver, por ejemplo, el final de la página 1621 de D2), que, a su vez, está involucrada en la síntesis de oligosacáridos;
- y transportadores de carboxilato en membrana (MCT, considerados como que caen en la definición vaga de homólogos funcionales o derivados de los mismos en una familia de transportadores de efluentes azucarados porque los MCT transportan al menos piruvato y lactato a través de la membrana celular).

Carencia de actividad inventiva

- 17 La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1), porque el **objeto de las reivindicaciones 1-17 no involucra una actividad inventiva** en el sentido del artículo PCT 33(3).
- 18 Cada uno de D1 y D2 puede ser considerado el estado de la técnica más cercano, porque se refieren a objetos destinados al mismo propósito: modificar células para producir un oligosacárido de interés mediante la transformación de las células con una secuencia de nucleótidos que codifican para una enzima involucrada en la síntesis de tal oligosacárido (ver resumen de D1 o reivindicación 1 de D2). La diferencia entre D1 y D2 y la reivindicación 1 de la presente solicitud es que en la reivindicación 1 las células son transformadas además para comprender al menos una secuencia que codifica para una proteína de la familia de transportadores de efluentes azucarados, un homólogo funcional o un derivado del mismo.
- 19 El problema técnico habría sido la provisión de una célula alternativa para producir un oligosacárido de interés (o el correspondiente método para producir tal oligosacárido usando tal célula). La solución expuesta en la reivindicación 1 no es considerada inventiva por las siguientes razones.
- 20 La provisión de una combinación de elementos novedosa no es automáticamente inventiva si no se asocia un efecto inesperado con tal combinación. Solo se pueden considerar inventivas realizaciones que ofrecen una expectativa razonable de proveer un efecto inesperado. Observando al amplio ámbito de las reivindicaciones que comprenden la transformación de cualquier célula (incluyendo las eucariotas) con una secuencia que codifica cualquier enzima involucrada en la síntesis de oligosacáridos y cualquier secuencia que codifica una proteína de la familia de transportadores de efluentes azucarados, las reivindicaciones no pueden ser consideradas inventivas en su ámbito completo. Es extremadamente poco probable que la combinación al azar de los elementos mencionados arriba resulte para nada en cualquier efecto. Por ejemplo, la sobreexpresión SetA de *E. coli* y una glicosiltransferasa en una célula eucariótica no es asociada en la mayoría de los casos con ningún efecto, o al menos con un efecto tóxico. No existen evidencias en la solicitud tal cual fue presentada de que la selección al azar de estos dos elementos son suficientes para producir algún efecto.
- 21 La presente solicitud da a conocer un ejemplo particular (ejemplo 3) en el cual, transformando *E. coli* con SetA, FusP, LacY, Fkp y FutAco bajo condiciones particulares de cultivo resulte en un incremento productivo de 3-fucosilactosa. Tal ejemplo exitoso no se habría obtenido si SetA no fuera limitante, si SetA tuviera efectos tóxicos o si las 5 secuencias de nucleótidos particulares transformadas (incluyendo SetA) fueran transformadas en una célula eucariota. No existen evidencias de que la transformación con solo SetA y la fucosiltransferasa tenga algún efecto.

- 22 Además, incluso el uso de un transportador de efluentes es considerado no inventivo. El primer lugar, a los fines de obtener los oligosacáridos de interés en el medio es deseable, en vista del conocimiento estándar en la especialidad o ver D2, que dan a conocer que, a los fines de obtener los oligosacáridos de la leche de mamíferos no humanos, las enzimas apropiadas se deben expresar en las células secretoras (ver reivindicación 1). En segundo lugar, D4 da a conocer el miembro de la familia de transportadores de efluentes azucarados SotA reduce la concentración intracelular de IPTG, lactosa y arabinosa y que SotB reduce la concentración de IPTG, lactosa y melibiosa (ver resumen). D4 da a conocer que las bombas de efluentes azucarados probablemente funcionen removiendo azúcares tóxicos del citoplasma (ver pp. 1345, columna izquierda, primer párrafo). D4 da a conocer también que la presencia de tres miembros SET en E. coli puede indicar que esta estrategia de desintoxicación es ampliamente utilizada por las bacterias (ver pp. 1345, columna izquierda, primer párrafo). Por lo tanto, D4 podría motivar al especialista a utilizar el transportador de efluente azucarado para secretar del medio los oligosacáridos de interés.
- 23 Se observa que la presente solicitud declara que fue sorprendente encontrar que la sobreexpresión de proteínas exportadoras de SET lleva a una muy eficiente exportación de oligosacáridos (ver pp. 7, cuarto párrafo). No obstante, D7 da a conocer que todos los oligosacáridos chequeados se perdieron con el efluente a través de la porosidad (ver resumen) y, por lo tanto, la especificidad de los transportadores para oligosacáridos no parece ser muy elevada.

Posibles pasos luego de recibir el informe de búsqueda internacional (ISR) y el informe escrito del Organismo de Búsqueda Internacional (WO-ISA).

Información general	Para todas las solicitudes internacionales presentadas el o después del 01/01/2004, el ISA competente establecerá un ISR. El mismo será acompañado por el WO-ISA. A diferencia del anterior informe escrito del IPEA (Regla PCT 66.2), el WO-ISA no debe ser contestado, pero debe ser tomado en consideración para posteriores pasos del procedimiento. Este documento explica acerca de las posibilidades.
Enmendar reivindicaciones según Art. PCT 19	Dentro de los dos meses después de la fecha de envío del ISR y el WO-ISA, el solicitante puede presentar reivindicaciones enmendadas según el Art. PCT 19 directamente en la Oficina Internacional del WIPO. La reforma del PCT de 2004 no cambió este procedimiento. Para más información rogamos ver la regla PCT 46, además del formulario PCT/ISA/220 y las correspondientes notas al formulario PCT/ISA/220.
Presentar una demanda para examen preliminar internacional	En principio, el WO-ISA puede ser considerado el informe escrito del IPEA. Esto puede, en muchos casos, hacer innecesario presentar una demanda de examen preliminar internacional. Si el solicitante, a pesar de todo, desea presentar una demanda, esto debe llevarse a cabo antes de la expiración de 3 meses a partir de la fecha de envío al ISR/WO-ISA o de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según la que expire más tarde (Regla PCT 54bis). Las enmiendas según el art. PCT 34 pueden ser presentadas ante el IPEA como lo anterior, normalmente al mismo tiempo que se presenta la demanda (Regla PCT 66.1(b)). Si se presenta una demanda de examen preliminar internacional y no se recibieron enmiendas/comentarios, el WO-ISA será transformado por el IPEA en el IPRP (Informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad), que refleja únicamente el contenido del WO-ISA. La demanda puede ser retirada (Art. PCT 37).
Presentar comentarios informales	Luego de recibir el WO-ISA, el solicitante puede presentar comentarios acerca del WO-ISA directamente en la Oficina Internacional del WIPO. Estos serán comunicados a las Oficinas designadas junto con el IPRP (Informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad) a los 30 meses a partir de la fecha de prioridad. Rogamos referirse al siguiente campo.
Final de la fase internacional	Al final de la fase internacional, la Oficina Internacional del WIPO transformará el WO-ISA o, si se presentó una demanda, el informe escrito del IPEA en el IPRP, el que será transmitido junto con los posibles comentarios informales a las Oficinas designadas. El IPRP reemplazará al anterior IPER (informe de examen preliminar internacional).
Reglas PCT relevantes y más información	Regla PCT 43, regla PCT 43bis, regla PCT 44, regla PCT 44bis, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Por favor, tome en consideración que la obras mencionadas de bibliografía no correspondiente a patentes tales como documentos científicos o técnicos pueden estar sujetas a una protección de derecho de autor y/o a alguna otra protección de trabajos escritos basadas apropiadamente en leyes aplicables. Los textos protegidos de esta manera no pueden ser copiados o usados en otras publicaciones electrónicas o impresas o distribuidas sin una autorización expresa del titular del derecho de autor.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2009/004112

International filing date (day/month/year)
08.06.2009

Priority date (day/month/year)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12N15/63 C12N1/00

Applicant
JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Valcárcel, Rafael
Telephone No. +49 89 2399-2368



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/004112

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

59

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/004112

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3-17</u>
	No: Claims	<u>1-2</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

- 1 The document numbering corresponds to the order of citation in the International search report.

-
Lack of clarity

- 2 **Claim 1 is unclear** contravening the requirements of Article 6 PCT (see sections 3 to 6 below).
- 3 The word "**adjusted**" in the feature "**which is is adjusted for the production of oligosaccharides**" is unclear. There is no recognized meaning in the art for the word "adjusted". In case any specific definition should apply, it should be included in the claim(s).
- 4 The feature "**an enzyme involved in oligosaccharide synthesis**" is open to interpretation and therefore, it is considered unclear. Said expression is so extremely vague that any enzyme involved in the synthesis of glucose, one of the components of many oligosaccharides is considered to fall under an enzyme involved in oligosaccharide synthesis.
- 5 The expression "**sugar efflux transporter family**" is unclear. It is noted that said expression is used in D2, D3 or D4 (see abstracts). However, D2 discloses that SotA is a member of the sugar efflux transport family while SotB belongs to the multidrug efflux family (see abstract). Since SotB is also able to perform the efflux of sugars, it is unclear if it would be considered also as a sugar efflux transport family member or not. Thus, the expression "sugar efflux transporter family" is unclear.
- 6 The lack of clarity is extreme for the expressions "**functional homolog**" and "**derivative thereof**". It is absolutely unclear which kind compound (protein or any other compound) falls under the scope of said terms. Is it any porin or any kind of transporter or pump falling under these definitions?
- 7 **Claim 7 is unclear** since the expression "**a protein facilitating or promoting the import of educts required for oligosaccharide synthesis**" is open to interpretation and therefore unclear. In this context "an educt" could include any molecule which can be transformed in e.g. glucose, which is required for oligosaccharide synthesis.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/EP2009/004112

- 8 **Claim 10 is unclear** since it refers to **"a catabolic pathway for selected mono-, di- or oligosaccharides, which is at least partially inactivated"**. There are two unclear issues: first the term "partially" is a relative and thus in itself unclear; and second, said vague definition renders unclear which of the thousands of known mutants are included since they may affect (even in a minimal way) a catabolic pathway for selected mono-, di- or oligosaccharides. It is here noted that one oligosaccharide is glucose.
- 9 **Claim 14 is unclear** since it refers to **"basic supplements"**, to **"educts required for the synthesis of oligosaccharides"** and to **"effectors of gene activity"**, each of these three expressions is open to interpretation and therefore unclear.

Insufficient disclosure - Lack of support

- 10 The present application does not meet the requirements of Articles 5 and 6 PCT, since the description does not disclose the invention in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art (contravening Article 5 PCT) and since claims 1-17 are not fully supported by the description (contravening Article 6 PCT) .
- 11 The claims refer to any cell (eukaryote or prokaryote) which is adjusted for the production of any kind of oligosaccharide and which is transformed to comprise at least a sequence encoding any enzyme involved in oligosaccharide synthesis and also transformed to comprise at least one nucleic acid encoding any protein of the sugar efflux transporter family or functional homologues or derivatives thereof. On top of the extreme lack of clarity for some of these expressions (see sections 2-6 above), the International search authority considers that the combination of **any** enzyme involved in oligosaccharide synthesis and **any** protein of the sugar efflux transporter family is extremely unlikely to result in any positive effect and in most cases may have detrimental effects. Only the expression of a specific combination of certain transporters and enzymes could produce the desired effect. It is considered an undue burden for the skilled person to find the "right combination" among the immense variety of existing possibilities.
- 12 First, it is considered that the sugar efflux transporter family has to be able to transport the oligosaccharide that is produced in order to have a certain effect. If the transporter is not able to transport the oligosaccharide, then it will not have a positive effect.

- 13 Second, even if a sequence encoding an enzyme involved in the synthesis of a particular oligosaccharide is transformed into a cell only if said enzyme is a limiting step in the synthesis of said oligosaccharide, said transformation would result in an increase of the oligosaccharide.
- 14 The present application discloses a particular example (example 3) wherein by transforming *E. coli* with *setA*, *FucP*, *LacY*, *Fkp* and *FutAco* under particular culture conditions it results in an increased production of 3-fucosyllactose. It is considered an undue burden for the skilled person to find any other conditions in any kind of cells (including eukaryotic cells) under which under transformation with any other enzyme involved in oligosaccharide synthesis and any sugar efflux transporter family member or derivative thereof an enhanced amount of oligosaccharide can be found in the medium. There are so many possibilities that to find any other working embodiment is considered an undue burden for the skilled person. Even further, to intend to extend the teaching shown for the particular example 3 in *E. coli* to any kind of cell seems unreasonable.
- 15 In other words, example 3 of the present application results in improved secretion of 3-fucosyllactose but said successful example would not have been obtained if *SetA* were not limiting, or if *SetA* had toxic effects, or if the 5 particular nucleotide sequences transformed were transformed in an eukaryotic cell.

Lack of novelty

- 16 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because **the subject-matter of claims 1 and 2 is not new in view of D3** in the sense of Article 33(2) PCT.

D3 discloses the overexpression in animal cells of two genes (see abstract):

- lactate dehydrogenase, which is an enzyme which under certain circumstances is involved in the synthesis of glucose (see e.g. end of page 1621 of D2), which in turn is involved in the synthesis of oligosaccharides;
- and membrane monocarboxylate transporters (MCT; which is considered to fall under the vague definition of functional homologues or derivative thereof of a sugar efflux transporter family since MCTs transport at least pyruvate and lactate across the cell membrane).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/EP2009/004112

Lack of inventive step

- 17 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because **the subject-matter of claims 1-17 does not involve an inventive step** in the sense of Article 33(3) PCT.
- 18 Each of D1 or D2 could be considered the closest prior art, since they refer to subject-matter for the same purpose, to modify cells to produce an oligosaccharide of interest by transforming the cells with a nucleotide sequence encoding for an enzyme involved in the synthesis of said oligosaccharide (see abstract of D1 or claim 1 of D2). The difference between D1 or D2 and claim 1 of the present application, is that in claim 1 the cells are further transformed to comprise at least one sequence coding for a protein of the sugar efflux transporter family, a functional homologue or derivative thereof.
- 19 The technical problem would have been the provision of an alternative cell to produce an oligosaccharide of interest (or the corresponding methods to produce said oligosaccharide by using said cell). The solution of claim 1 is not considered inventive for the following reasons.
- 20 The provision of a novel combination of elements is not automatically inventive if no unexpected effect is associated with said combination. Only embodiments which can be reasonably expected to provide an unexpected effect could be considered inventive. In view of the broad scope of the claims which comprises transformation of any cell (even eukaryote) with a sequence encoding any enzyme involved in oligosaccharide synthesis and any sequence encoding a protein of the sugar efflux transporter family, the claims can not be considered inventive over their entire scope. It is extremely unlikely that the random combination of the above mentioned elements results in any effect at all. For example, the overexpression of E. coli SetA and a glycosyltransferase in an eukaryotic cell will be associated in most cases with no effect, or at most with a toxic effect. There is no evidence in the application as filed, that the random selection of these two elements are sufficient to provide any effect.
- 21 The present application discloses a particular example (example 3) wherein by transforming E. coli with setA, FucP, LacY, Fkp and FutAco under particular culture conditions it results in an increased production of 3-fucosyllactose. Said successful example would not have been obtained if SetA were not limiting, or if SetA had toxic effects, or if the 5 particular

nucleotide sequences transformed (including SetA) were transformed in an eukaryotic cell. There is no evidence that transformation with only SetA and the fucosyltransferase would have any effect.

- 22 Furthermore, even the use of an efflux transporter is considered not inventive. First, in order to obtain the oligosaccharide of interest in the medium secretion is desirable in view of standard knowledge in the art of or see D2, which discloses that in order to obtain the human oligosaccharides in the milk of a non-human mammal, the appropriate enzymes should be expressed in the secretory cells (see claim 1). Second, D4 discloses that the sugar efflux transport family member sotA reduces the intracellular concentration of IPTG, lactose and arabinose and that SotB reduces the concentration of IPTG, lactose and melibiose (see abstract). D4 discloses that sugar efflux pumps probably function by removing toxic sugars from the cytoplasm (see page 1345, left column, first paragraph). D4 further discloses that the presence of three SET members in *E. coli* could indicate that this strategy of detoxification is widely used by bacteria (see page 1345, left column, first paragraph). Thus, D4 would motivate the skilled person to use a sugar efflux transporter to secrete the oligosaccharide of interest to the medium.
- 23 It is noted that the present application states that it was surprising to find that overexpression of SET exporter proteins leads to a very efficient export of oligosaccharides (see page 7, fourth paragraph). However, D7 discloses that all oligosaccharides tested were lost by efflux through the porin (see abstract), and thus, the specificity of transporters for oligosaccharides does not seem to be very high.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA, as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente <i>2827P100WO GL sm</i>	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Referencia Internacional <i>PCT/EP 2009/004112</i>	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) <i>08/06/2009</i>	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año)
Solicitante <i>JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH</i>		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 6 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. **Fundamentos del Informe**

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada

☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))

c. ☒ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo Nº I

2. ☐ **Determinadas reivindicaciones** no eran investigables (ver campo II).

3. ☐ **La invención carece de unidad** (ver campo III).

4. Con respecto al **título**,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las **ilustraciones**

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las ilustraciones: figura Nº -/-.

☒ sugerida por el solicitante.

☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.

☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/004112

Campo I: secuencias de nucleótidos o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional ha sido llevada a cabo basada sobre:
- a. Tipo de material
- ☒ un listado de secuencias
- ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias
- b. Formato del material
- ☒ en papel
- ☒ en forma electrónica
- c. Momento de la presentación/suministro
- ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
- ☒ presentada junto con la solicitud internacional en forma electrónica
- ☐ suministrada subsiguientemente a este Organismo a los fines de la búsqueda
2. ☐ Adicionalmente, en el caso de haberse presentado o suministrado una o más versión o copias del listado de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con el mismo, se suministra(n), apropiadamente, la(s) declaración(iones) requerida(s) de que la información exhibida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica o no supera a la de la solicitud tal como fue presentada.
3. Comentarios adicionales

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. C12N15/63 C12N1/00		
Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) C12N		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) EPO-Internal, BIOS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación Nº
X	DUMON CLAIRE ET AL.: "In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-hexaose by heterologous expression of Helicobacter pylori alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered Escherichia coli" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, CHAPMAN & HALL, GB, Nº 6, 1 de enero de 2001 (2001-01-01) pp. 465-474, XP002380631 ISSN: 0282-0080	1-17
Y	todo el documento	1-17
X	WO 99/11773 A1 (ABBOTT LAB [US]) 11 de marzo de 1999 (1999-03-11)	1-17
Y	todo el documento	1-17
-----//---/-----		
☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C		☒ Ver familia de patentes en el anexo
Categorías particulares indicadas en publicaciones "A" publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante "B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional "L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada) "O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones "P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada		"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa "X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva "Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista "&" publicación que es miembro de la misma familia
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 24 de febrero de 2010		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 04/03/2010
Nombre y Dirección Postal del ISA/ Oficina de Patentes Europea NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040. Fax Nº (+31-70) 340-3016		Funcionario Apoderado Valcárcel, Rafael

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2009/004112

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
X	ISHIHARA HIAMITSU ET AL.: "Overexpression of monocarboxilate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 104, N° 11, diciembre de 1999 (1999-12), pp. 1621-1629, XP009130052 ISSN: 0021-9738 todo el documento	1-2
Y	CONDEMINE GUY: "Characterization of SotA and SotB, two Erwinia chrysanthemi proteins wich modifies isopropil-beta-D-thiogalactopyranoside and lactose induction of the Escherichia coli lac promoterr" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US vol. 182, N° 5, 1 DE MARZO DE 2000 (2000-03-01), pp. 1340-1345, XP002332193 ISSN: 0021-9193 todo el documento	1-17
Y	LIU JI YEU ET AL.: "Functional and biochemical characterization of Escherichia coli sugar efflux transporters" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, N° 330, 13 de agosto de 1999 (1999-08-13), pp. 22977-22984, XP009129796 ISSN: 0021-9258 todo el documento	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL.: "The identification of a new family of sugar efflux pumps in Escherichia coli" MOLECULAR MICROBIOLOGY, US, vol. 31, N° 6, marzo de 1999 (1999-03), pp. 1845-1851, XP009129795 ISSN: 0950-382X todo el documento	1-17
A	VACHON V ET AL.: "TRANSMEMBRANE PERMEABILITY CHANNELS ACROSS THE OUTER MEMBRANE OF HAEMOPHILUS-INFLUENZAE TYPE B" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Vol. 162, n° 3, 1 de junio de 1985 (1985-06-01), pp. 918-924, XP009130006 ISSN: 0021-9193 todo el documento	1-17
	----- -----//-----	

65

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/EP 2009/004112

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación Nº
X	PAULSEN I T ET AL.: "Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB,, vol. 301, Nº 1, 4 de agosto d 2000 (2000-08-04), pp. 75-100, XP004472323 ISSN: 0022-2836 todo el documento -----	1-17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Detalle de publicaciones que pertenecen a la misma familia de patentes

Referencia Internacional
PCT/EP 2009/004112

Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda		Fecha de la publicación	Miembros de la familia de patentes		Fecha de la publicación
WO	9911773 A1	11-03-1999	AU	9220398 A	22-03-1999
			BG	104236 A	29-12-2000
			BR	9811733 A	05-09-2000
			CA	2302777 A1	11-03-1999
			CN	1273602 A	15-11-2000
			CO	4930313 A1	27-06-2000
			EP	1007651 A1	14-06-2000
			HU	0004709 A2	28-04-2001
			JP	2001520001 T	30-10-2001
			NO	20001105 A	05-05-2000
			PL	339132 A1	04-12-2000
			SK	3042000 A3	12-09-2000
			TR	200000500 T2	21-12-2000
			ZA	9807504 A	15-03-1999

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2827P100WO GL sm	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/004112	International filing date (day/month/year) 08/06/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
Applicant JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
 - a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).
 - c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)
3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)
4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority
6. With regard to the drawings,
 - a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 - b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/004112

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/63 C12N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUMON CLAIRE ET AL: "In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of Helicobacter pylori alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered Escherichia coli" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, CHAPMAN & HALL, GB, no. 6, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 465-474, XP002380631 ISSN: 0282-0080	1-17
Y	the whole document	1-17
X	WO 99/11773 A1 (ABBOTT LAB [US]) 11 March 1999 (1999-03-11)	1-17
Y	the whole document	1-17
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2010

Date of mailing of the international search report

04/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISHIHARA HISAMITSU ET AL: "Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 104, no. 11, December 1999 (1999-12), pages 1621-1629, XP009130052 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-2
Y	CONDEMINE GUY: "Characterization of SotA and SotB, two Erwinia chrysanthemi proteins which modify isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside and lactose induction of the Escherichia coli lac promoter" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 182, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1340-1345, XP002332193 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "Functional and biochemical characterization of Escherichia coli sugar efflux transporters" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, L vol. 274, no. 33, 13 August 1999 (1999-08-13), pages 22977-22984, XP009129796 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "The identification of a new family of sugar efflux pumps in Escherichia coli" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 6, March 1999 (1999-03), pages 1845-1851, XP009129795 ISSN: 0950-382X the whole document	1-17
A	VACHON V ET AL: "TRANSMEMBRANE PERMEABILITY CHANNELS ACROSS THE OUTER MEMBRANE OF HAEMOPHILUS-INFLUENZAE TYPE B" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 162, no. 3, 1 June 1985 (1985-06-01), pages 918-924, XP009130006 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAULSEN I T ET AL: "Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 301, no. 1, 4 August 2000 (2000-08-04), pages 75-100, XP004472323 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/004112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911773	A1	11-03-1999	
		AU 9220398 A	22-03-1999
		BG 104236 A	29-12-2000
		BR 9811733 A	05-09-2000
		CA 2302777 A1	11-03-1999
		CN 1273602 A	15-11-2000
		CO 4930313 A1	27-06-2000
		EP 1007651 A1	14-06-2000
		HU 0004709 A2	28-04-2001
		JP 2001520001 T	30-10-2001
		NO 20001105 A	05-05-2000
		PL 339132 A1	04-12-2000
		SK 3042000 A3	12-09-2000
		TR 200000500 T2	21-12-2000
		ZA 9807504 A	15-03-1999

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2827P100WO GL sm	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/004112	International filing date (day/month/year) 08/06/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
Applicant JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. 1.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/004112

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/63 C12N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUMON CLAIRE ET AL: "In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of Helicobacter pylori alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered Escherichia coli" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, CHAPMAN & HALL, GB, no. 6, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 465-474, XP002380631 ISSN: 0282-0080	1-17
Y	the whole document	1-17
X	WO 99/11773 A1 (ABBOTT LAB [US]) 11 March 1999 (1999-03-11)	1-17
Y	the whole document	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2010

Date of mailing of the international search report

04/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISHIHARA HISAMITSU ET AL: "Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 104, no. 11, December 1999 (1999-12), pages 1621-1629, XP009130052 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-2
Y	CONDEMINE GUY: "Characterization of SotA and SotB, two Erwinia chrysanthemi proteins which modify isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside and lactose induction of the Escherichia coli lac promoter" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 182, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1340-1345, XP002332193 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "Functional and biochemical characterization of Escherichia coli sugar efflux transporters" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 33, 13 August 1999 (1999-08-13), pages 22977-22984, XP009129796 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-17
Y	LIU JIA YEU ET AL: "The identification of a new family of sugar efflux pumps in Escherichia coli" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 6, March 1999 (1999-03), pages 1845-1851, XP009129795 ISSN: 0950-382X the whole document	1-17
A	VACHON V ET AL: "TRANSMEMBRANE PERMEABILITY CHANNELS ACROSS THE OUTER MEMBRANE OF HAEMOPHILUS-INFLUENZAE TYPE B" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 162, no. 3, 1 June 1985 (1985-06-01), pages 918-924, XP009130006 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-17
	-/--	

71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAULSEN I T ET AL: "Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 301, no. 1, 4 August 2000 (2000-08-04), pages 75-100, XP004472323 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/004112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911773	A1	11-03-1999	
		AU 9220398 A	22-03-1999
		BG 104236 A	29-12-2000
		BR 9811733 A	05-09-2000
		CA 2302777 A1	11-03-1999
		CN 1273602 A	15-11-2000
		CO 4930313 A1	27-06-2000
		EP 1007651 A1	14-06-2000
		HU 0004709 A2	28-04-2001
		JP 2001520001 T	30-10-2001
		NO 20001105 A	05-05-2000
		PL 339132 A1	04-12-2000
		SK 3042000 A3	12-09-2000
		TR 200000500 T2	21-12-2000
		ZA 9807504 A	15-03-1999



No. 11-168961- -00000-0000

Fecha: 2011-12-07 15:54:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 71

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐