

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046260**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.21**

**(21)** Номер заявки  
**202292179**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2021.01.22**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/70** (2006.01)  
**C12P 19/00** (2006.01)  
**C07H 3/06** (2006.01)

---

**(54) ПОЛУЧЕНИЕ ОГМ**

---

**(31)** **РА 2020 00087**

**(32)** **2020.01.23**

**(33)** **DK**

**(43)** **2022.10.07**

**(86)** **РСТ/EP2021/051468**

**(87)** **WO 2021/148611 2021.07.29**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ГЛЮКОМ А/С (DK)**

**(72)** Изобретатель:  
**Пападакис Манос, Кампманн Катрине  
Бых (DK)**

**(74)** Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

**(56)** WALTERSON ALYSSA M. ET AL.: "Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae", FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, vol. 027, no. 39, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 968-984, XP055797339, DOI: 10.1093/femsre/fuv027, Retrieved from the Internet: URL: [https://watermark.silverchair.com/fuv027.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAaQEWggKdBgkqhkiG9w0BwagggKOMIICigIBADCCAoMGCSqGSib3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQME-iwqthDWpraND4KAgEQgIICVB0mh9tf26GpjvlykSgB7oocFtmpF9cku6Ta8wGKY3opP6uTVX\\_RY9xAPKQBZ-sGDnm-xmkryJaRX4GbV0R7qmH9gLSnC>](https://watermark.silverchair.com/fuv027.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAaQEWggKdBgkqhkiG9w0BwagggKOMIICigIBADCCAoMGCSqGSib3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQME-iwqthDWpraND4KAgEQgIICVB0mh9tf26GpjvlykSgB7oocFtmpF9cku6Ta8wGKY3opP6uTVX_RY9xAPKQBZ-sGDnm-xmkryJaRX4GbV0R7qmH9gLSnC>) p.975 col.1 par.3, p.976 col.1 par.2

CLAUDIA YANEZ-ÑECO ET AL.: "Galactooligosaccharide Production from Pantoea anthophila Strains Isolated from "Tejuino", a Mexican Traditional Fermented Beverage", CATALYSTS, vol. 7, no. 8, 22 August 2017 (2017-08-22), page 242, XP055745441, DOI: 10.3390/catal7080242, p.7 par.2  
EP-A1-3461890  
EP-A1-3569713  
WO-A1-2019123324

---

**(57)** Изобретение относится к генетически модифицированной клетке, способной продуцировать олигосахарид, предпочтительно, ОГМ, включающий рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок суперсемейства MFS; и к способам с применением указанной клетки для получения олигосахарида, предпочтительно ОГМ.

---

**B1**

**046260**

**046260 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области рекомбинантного получения биологических молекул в клетках-хозяевах. Более конкретно, оно относится к способу рекомбинантного получения олигосахаридов грудного молока (ОГМ) с применением генетически модифицированных клеток, экспрессирующих белок суперсемейство основных посредников (MFS).

### Уровень техники

Олигосахариды грудного молока (ОГМ) составляют третий по величине твердый компонент грудного молока и обладают высокой устойчивостью к ферментативному гидролизу. Как следствие, значительная часть ОГМ остается в значительной степени непереваренной и неабсорбированной, что делает возможным их проникновение в толстую кишку. В толстой кишке ОГМ могут служить субстратами для формирования кишечной экосистемы путем избирательной стимуляции роста специфических сахаролитических бактерий. Эта избирательность считается полезной как для младенцев, так и для взрослых, поскольку считается, что штаммы видов *Bifidobacterium* положительно влияют на здоровье кишечника. (Chichiowski M. et al. (2012) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 5:251-258; Elison E. et al. (2016) *Brit J. Nutr.* 116: 1356-1368).

Помимо своих пребиотических свойств ОГМ связаны с дополнительными положительными эффектами, что расширяет область их применения. (Kunz C. et al. (2014) *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, 1st Edition, p 5-20, Eds. Moreno J. and Luz Sanz M., John Wiley & Sons, Ltd).

Очевидная польза ОГМ для здоровья позволила разрешить их применение в пищевых продуктах, таких как детские смеси и пищевые продукты, а также в потребительских товарах для здоровья. Биотехнологическое производство ОГМ представляет собой ценный экономичный и масштабный способ производства ОГМ. Оно основано на генетически модифицированных бактериях, сконструированных таким образом, чтобы экспрессировать гликозилтрансферазы, необходимые для синтеза желаемых олигосахаридов, и в нем применяют врожденный пул нуклеотидных сахаров бактерий в качестве предшественников ОГМ. Недавние разработки в биотехнологическом производстве ОГМ позволили преодолеть некоторые присущие бактериальным экспрессионным системам ограничения. Например, бактериальные клетки, продуцирующие ОГМ, могут быть генетически модифицированы для увеличения ограниченного внутриклеточного пула нуклеотидных сахаров в бактериях (WO 2012112777), для повышения активности ферментов, участвующих в продукции ОГМ (WO 2016040531), или для облегчения секреции синтезированных ОГМ во внеклеточную среду (WO 2010142305, WO 2017042382). Кроме того, экспрессию представляющих интерес генов в рекомбинантных клетках можно регулировать с помощью конкретных промоторов или других регуляторов экспрессии генов, таких как, например, те, что недавно были описаны в WO 2019123324.

Подход, описанный в WO 2010142305 и WO 2017042382, имеет то преимущество, что он позволяет снизить метаболическую нагрузку, воздействующую на продуцирующую клетку, за счет высоких уровней экспрессии рекомбинантных генов, т.е. с применением способов WO 2012112777, WO 2016040531 или WO 2019123324. Этот подход привлекает все большее внимание к рекомбинантным клеткам, продуцирующим ОГМ, например, недавно были описаны процедуры ферментации, а также несколько новых генов переносчиков сахара, кодирующих белки, которые могут способствовать выведению рекомбинантно продуцируемой 2'-фукозиллактозы (2'-FL), самого распространенного ОГМ грудного молока (WO 2018077892, US 201900323053, US 201900323052). Однако в настоящее время не существует алгоритма, который мог бы точно определить правильный белок-транспортёр для оттока различных структур ОГМ, полученных рекомбинантно, среди многочисленных бактериальных белков с предсказанной функцией транспортёра в нескольких базах данных белков, например, в UniProt, поскольку структуры/факторы, определяющие субстратную специфичность переносчиков сахаров, до сих пор недостаточно изучены и остаются крайне непредсказуемыми.

### Раскрытие изобретения

Эффективные белки-транспортёры оттока сахаров для различных рекомбинантно полученных ОГМ и разработка рекомбинантных клеток, экспрессирующих указанные белки, выгодны для крупномасштабного промышленного производства ОГМ.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, способным продуцировать олигосахарид грудного молока (ОГМ), при этом клетки экспрессируют гетерологичный ген, кодирующий предполагаемый транспортный белок MFS (major facilitator superfamily, суперсемейство основных посредников), происходящий из бактерии *Pantoea vagans*. Более конкретно, изобретение относится к генетически модифицированной клетке, оптимизированной для продукции олигосахаридов, в особенности, ОГМ, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (фиг. 4). Аминокислотная последовательность, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 1, представляет собой аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, имеющей номер доступа в GenBank IDWP\_048785139.1 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP\\_048785139.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048785139.1)). Белок-транспортёр MFS, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, идентифицируют в настоящем документе как "белок Vag", или

"транспортер Vag", или "Vag", взаимозаменяемо; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Vag, идентифицируют в настоящем документе как "кодирующая vag нуклеиновая кислота/ДНК", или "ген vag", или "vag".

Настоящее изобретение показывает, что применение рекомбинантных клеток, продуцирующих ОГМ, которые экспрессируют белок Vag, приводит к весьма отчетливым улучшениям процесса производства ОГМ как с точки зрения ферментации, так и очистки ОГМ. Описанные в настоящем документе рекомбинантные клетки и способы получения ОГМ обеспечивают как более высокие выходы всех произведенных ОГМ, более низкое образование побочных продуктов или отношение побочного продукта к продукту, более низкое образование биомассы за ферментацию, так и облегченное извлечение ОГМ во время последующей обработки ферментационный бульон.

Неожиданно было обнаружено, что экспрессия последовательности ДНК, кодирующей Vag, в различных ОГМ-продуцирующих клетках связана с накоплением одних ОГМ во внеклеточной среде и накоплением других ОГМ внутри продуцирующих клеток, а также с увеличением общей продукции ОГМ. Неожиданно оказалось, что увеличение выхода образующихся ОГМ характерно для ОГМ, состоящих либо из трех, либо из четырех звеньев моносахаридов, т.е. 2'-фукозиллактозы (2TL), 3-фукозиллактозы (3FL), 3-сиалиллактозы (3'SL), 6'-сиалиллактозы (6'SL), лакто-N-триозы 2, (LNT-2), лакто-N-неотетраозы (LNnT) и лакто-N-тетраозы (LNT), но не для более крупных олигосахаридных структур, таких как пентасахариды и гексахариды, которые накапливаются внутри продуцирующих клеток. Неожиданно также обнаружено, что общая продукция ОГМ лакто-N-неотетраозы (LNnT) и лакто-N-тетраозы (LNT) соответствующими ОГМ-продуцирующими клетками, экспрессирующими Vag, также увеличивается, в то время как образование побочных продуктов, например, пара-лакто-N-неогексаозы (pLNnH) и пара-лакто-N-гексаозы II (pLNH-II) в этих клетках, соответственно, часто снижены, и указанные побочные олигосахариды обычно накапливаются внутри клеток в системе продукции ОГМ. Далее, весьма неожиданно, оказалось, что экспрессия белка Vag в клетках, продуцирующих ОГМ, приводит к снижению образования биомассы во время ферментации с высокой плотностью клеток и к более здоровым клеточным культурам, что, например, отражается в уменьшении количества мертвых клеток в конце ферментации, что делает производственный процесс более эффективным, поскольку на единицу биомассы производится больше продукта.

Соответственно, первый аспект изобретения относится к генетически модифицированной клетке, способной продуцировать один или несколько ОГМ, где указанная клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или его функциональный гомолог с аминокислотной последовательностью, идентичной, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно идентичной, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно идентичной, по меньшей мере, на 90% последовательности SEQ ID NO: 1.

Второй аспект изобретения относится к конструкции нуклеиновой кислоты, включающей последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты, кодирующую(кодирующие) белок-транспортер MFS, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, имеет по меньшей мере 70% идентичности с последовательностью с SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере, 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99%, а также к генетически модифицированной клетке, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая представляет собой *Escherichia coli*.

В одном аспекте конструкция нуклеиновой кислоты включает последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты, кодирующую(кодирующие) белок-транспортер MFS, в которой последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID NO: 2.

Третий аспект изобретения относится к способу получения одного или нескольких олигосахаридов, включающему следующие стадии:

(i) получение генетически модифицированной клетки, способной продуцировать ОГМ, в котором указанная клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или его функциональный гомолог с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 80%, предпочтительно идентичной по меньшей мере на 85%, более предпочтительно идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 1;

(ii) культивирование клеток в соответствии с (i) в подходящей среде культивирования клеток для экспрессии указанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты;

(iii) сбор одного или нескольких ОГМ, полученных на стадии (ii).

Изобретение также относится к применению генетически модифицированной клетки или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок суперсемейства основных посредников (MFS), причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 для производства одного или нескольких олигосахаридов грудного молока (ОГМ).

Как упоминалось выше, при культивировании генетически модифицированных клеток, способных продуцировать один или несколько ОГМ и содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-транспортер Vag, неожиданно было обнаружено, что соответствующие один или несколько ОГМ проду-

цируются с высокими выходами, тогда как образование побочных продуктов и биомассы снижается. Это облегчает извлечение этих ОГМ в последующих процессах, так как общая процедура извлечения и очистки включает меньше стадий, процедура в целом упрощается, общее время очистки сокращается, и, следовательно, извлечение продукта становится менее трудоемко и экономически более эффективно.

Эти эффекты повышенного выхода продукта и облегчения извлечения продукта делают настоящее изобретение превосходящим раскрытия предшествующего уровня техники.

Другие аспекты и полезные признаки настоящего изобретения подробно описаны и проиллюстрированы приведенными ниже неограничивающими рабочими примерами.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 показывает (А) процент (%) относительных концентраций LNT в общих образцах для семи штаммов, которые экспрессируют гены GlcNaT и Gal4T и гетерологичный ген транспортера, uberC0001\_9420, bad, fred, magc, vag, пес или yabM, соответственно. Штамм MP3672 экспрессирует гены гликозилтрансферазы и не экспрессирует гены транспортера; (В) процент (%) относительных концентраций LNT в супернатанте клеток, экспрессирующих vag или yabM.

На фиг. 2 показано процентное содержание (%) относительных концентраций LNT и побочных продуктов для штаммов MP3020, MP4065 и MP4064 в общем образце, образцах супернатантах и образцах осадка. Хотя все три штамма демонстрируют оптимальную экспрессию необходимых генов гликозилтрансфераз, именно MP4065 и MP4064 экспрессируют ген гетерологичного переносчика vag под контролем элемента Plac или PglpF, соответственно.

Фиг. 3 показывает процент (%) относительных концентраций LNT и побочных продуктов для штаммов MP4473 и MP4546 в общем образце, образцах супернатанта и осадка. Хотя оба штамма демонстрируют оптимальную экспрессию необходимых генов гликозилтрансфераз, только MP4546 экспрессирует ген гетерологичного переносчика vag под контролем элемента PglpF.

На фиг. 4 представлена последовательность SEQ ID NO: 1.

#### **Осуществление изобретения**

Далее воплощения изобретения будут описаны более подробно. Каждая конкретная вариация признаков может быть применена к другим воплощениям изобретения, если специально не указано иное.

Как правило, все применяемые в настоящем документе термины следует интерпретировать в соответствии с их обычным значением в технической области и как применимые ко всем аспектам и воплощениям изобретения, если явно не определено или не указано иное. Все ссылки на "a/an/the [клетка, последовательность, ген, транспортер, стадия и т.д.]" нужно интерпретировать открыто как относящиеся по меньшей мере к одному экземпляру указанной клетки, последовательности, гена, транспортера, стадии и т.д. если прямо не указано иное. Этапы любого раскрытого в настоящем документе способа не обязательно выполнять в точном раскрытом порядке, если это не указано явно.

Настоящее изобретение в целом относится к генетически модифицированной клетке для эффективного производства олигосахаридов и к применению указанной генетически модифицированной клетки в способе получения олигосахаридов. В особенности, настоящее изобретение относится к генетически модифицированной клетке, способной синтезировать олигосахарид, предпочтительно гетерологичный олигосахарид, в особенности олигосахарид грудного молока (ОГМ). Соответственно, клетки по изобретению модифицируют для экспрессии набора рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые необходимы для синтеза клетками одного или нескольких ОГМ (которые позволяют клетке синтезировать один или несколько ОГМ), таких как гены, кодирующие один или несколько ферментов с гликозилтрансферазной активностью, описанных ниже. Продуцирующую олигосахарид рекомбинантную клетку по изобретению дополнительно модифицируют для включения гетерологичной последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, предпочтительно, последовательности ДНК, кодирующей белок MFS (major facilitator superfamily, суперсемейство основных посредников), происходящий из бактерии *Pantoea vagans*. Более конкретно, изобретение относится к генетически модифицированной клетке, оптимизированной для продукции одного или нескольких конкретных олигосахаридов, в особенности, одного или нескольких конкретных ОГМ, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, имеющий по меньшей мере 80% сходства последовательности, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95% сходства последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (фиг. 4). Аминокислотная последовательность, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 1, представляет собой аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, имеющей номер доступа в GenBank: WP\_048785139.1 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP\\_048785139.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048785139.1)).

Соответственно, первый аспект изобретения относится к генетически модифицированной клетке, способной продуцировать один или несколько ОГМ, при этом указанная клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или его функциональный гомолог с аминокислотной последовательностью идентичной по меньшей мере на 80%, предпочтительно идентичной по меньшей мере на 85%, более предпочтительно идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 1.

Белок-транспортер MFS, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, идентифи-

цируют в настоящем документе как "белок Vag", или "транспортер Vag", или "Vag", взаимозаменяемо; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок vag, идентифицируют в настоящем документе как "кодирующую vag нуклеиновую кислоту/ДНК", или "ген vag", или "vag".

Под термином "суперсемейства основных посредников (MFS)" подразумевают большое и исключительно разнообразное семейство класса вторичных активных транспортеров, которые отвечают за транспорт ряда различных субстратов, включая сахара, лекарства, гидрофобные молекулы, пептиды, органические ионы и т.д. Специфичность белков-переносчиков сахара крайне непредсказуема, и идентификация нового белка-переносчика со специфичностью, например, в отношении олигосахаридов требует небременительных лабораторных экспериментов (более подробную информацию смотри в обзоре Reddy V.S. et al. (2012), FEBS J. 279(11): 2022-2035). Термин "переносчик MFS" в данном контексте означает белок, который облегчает транспорт олигосахаридов, предпочтительно ОГМ, через клеточную мембрану, предпочтительно транспорт ОГМ/олигосахаридов, синтезированного клеткой-хозяином, из цитозоля во внешнюю среду клетки, предпочтительно ОГМ/олигосахаридов, содержащего три или четыре звена сахара, в особенности, 2'FL, 3FL, 6'SL, DFL, LNT, LNT-2 и LNnT. Дополнительно или альтернативно переносчик MFS может также способствовать оттоку молекул, которые не считаются ОГМ или олигосахаридами согласно настоящему изобретению, таких как лактоза, глюкоза, клеточные метаболиты или токсины.

Термин "идентичность последовательности [определенного] %" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот означает, что две или более последовательности имеют общие нуклеотиды или аминокислотные остатки в данном проценте при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенных последовательностях нуклеиновых кислот или аминокислот (т.е. последовательности имеют по меньшей мере 90-процентную (%) идентичность). Процентную идентичность последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот можно определить с помощью алгоритма сравнения последовательностей BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию или путем ручного выравнивания и визуального контроля (см., например, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Это определение также применимо к комплементу тестируемой последовательности и последовательностям, которые имеют делеции и/или добавления, а также к тем, которые имеют замены. Примером алгоритма, подходящего для определения процента идентичности, сходства последовательностей и выравнивания, служит алгоритм BLAST 2.2.20, описанный в Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25, 3389 (1997). BLAST 2.2.20 применяют для определения процента идентичности последовательностей нуклеиновых кислот и белков по изобретению. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). CLUSTAL Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), EMBOSS Needle ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)), MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) or MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) представляют собой примеры алгоритмов выравнивания последовательностей.

В контексте изобретения термин "олигосахарид" означает сахаридный полимер, содержащий ряд моносахаридных звеньев. В некоторых воплощениях предпочтительными олигосахаридами представляют собой полимеры сахаридов, состоящие из трех или четырех моносахаридных звеньев, т.е. трисахариды или тетрасахариды. Предпочтительные олигосахаридами изобретения представляют собой олигосахаридами грудного молока (ОГМ).

Термин "олигосахарид грудного молока" или "ОГМ" в данном контексте означает сложный углевод, обнаруженный в грудном молоке человека (для отсылки смотри Urashima et al.: Milk Oligosaccharides. Nova Science Publisher (2011); или Chen, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 72, 113 (2015)). ОГМ имеют структуру ядра, включающую единицу лактозы на восстанавливаемом конце, которая может быть удлинена одной или несколькими единицами  $\beta$ -N-ацетиллактозаминила и/или одной или несколькими единицами  $\beta$ -лакто-N-биозила, и эта структура ядра может быть замещенной  $\alpha$ -L-фукопиранозильной и/или  $\alpha$ -N-ацетилнейраминильной (сиалильной) частью. В связи с этим неокислотные (или нейтральные) ОГМ лишены остатка сиалила, а кислые ОГМ имеют в своей структуре хотя бы один остаток сиалила. Неокислотный (или нейтральный) ОГМ может быть фукозилированным или нефукозилированным. Примеры таких нейтральных нефукозилированных ОГМ включают лакто-N-триозу 2 (LNT-2), лакто-N-тетраозу (LNT), лакто-N-неотетраозу (LNnT), лакто-N-неогексаозу (LNnH), пара-лакто-N-неогексаозу (pLNnH), пара-лакто-N-гексаозу (pLNH) и лакто-N-гексаозу (LNH). Примеры нейтральных фукозилированных ОГМ включают 2'-фукозиллактозу (2'FL), лакто-N-фукопентаозу I (LNFP-I), лакто-N-дифукогексаозу I (LNDFH-I), 3-фукозиллактозу (3FL), дифукозиллактозу (DFL), лакто-N-фукопентаозу II (LNFP-II), лакто-N-фукопентаозу III (LNFP-III), лакто-N-дифукогексаозу III (LNDFH-III), фукозил-лакто-N-гексаозу II (FLNH-II), лакто-N-фукопентаозу V (LNFP-V), лакто-N-дифукогексаозу II (LNDFH-II), фукозил-лакто-N-гексаозу I (FLNH-I), фукозил-пара-лакто-N-гексаозу I (FpLNH-I), фукозил-пара-лакто-N-неогексаозу II (F-pLNnH II) и фукозил-лакто-N-неогексаозу (FLNnH). Примеры кислотных ОГМ включают 3'-сиалиллактозу (3'SL), 6'-сиалиллактозу (6'SL), 3-фукозил-3'-сиалиллактозу (FSL), 3'-О-сиалиллакто-N-тетраозу a (LST a), фукозил-LST a (FLST a), 6'-О-сиалиллакто-N-тетраозу b (LST b), фу-

козил-LST b (FLST b), 6'-О-сиалиллакто-N-неотетраозу (LST c), фукозил-LST c (FLST c), 3'-О-сиалиллакто-N-неотетраозу (LST d), фукозил-LST d (FLST d), сиалил-лакто-N-гексаозу (SLNH), сиалил-лакто-N-неогексаозу I (SLNH-I), сиалил-лакто-N-неогексаозу II (SLNH-II) и дисиалил-лакто-N-тетраозу (DSLNT). В контексте настоящего изобретения лактозу не рассматривают как разновидность ОГМ.

В некоторых воплощениях изобретения предпочтительными могут быть три-ОГМ и тетра-ОГМ, например, трисахариды 2'FL, 3FL, 6'SL, LNT-2 и тетрасахариды DFL, LNT, LNnT.

Чтобы иметь возможность синтезировать один или несколько ОГМ, рекомбинантная клетка по изобретению включает по меньшей мере одну рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует функциональный фермент с гликозилтрансферазной активностью. Ген галактозилтрансферазы может быть интегрирован в геном (посредством хромосомной интеграции) клетки-хозяина, или, альтернативно, он может быть включен в плазмидную ДНК и экспрессироваться как переносимый плазмидой. Если для производства ОГМ необходимы две или более гликозилтрансфераз, например, LNT или LNnT, то две или более рекомбинантных нуклеиновых кислоты, кодирующих разные ферменты с гликозилтрансферазной активностью, могут быть интегрированы в геном и/или экспрессированы из плазмиды, например  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу (первая рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая первую гликозилтрансферазу) в сочетании с  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазой (вторая рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая вторую гликозилтрансферазу) для продукции LNnT, где первая и вторая рекомбинантные нуклеиновые кислоты могут быть независимо друг от друга интегрированы в хромосому или клонированы на плазмиде. В одном предпочтительном воплощении как первая, так и вторая рекомбинантные нуклеиновые кислоты интегрированы в хромосому клетки-продуцента; в другом воплощении по меньшей мере одна из первой и второй гликозилтрансфераз представляет собой переносимую плазмидой. Белок/фермент с гликозилтрансферазной активностью (гликозилтрансфераза) может быть выбран в различных воплощениях из ферментов, обладающих активностью  $\alpha$ -1,2-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,3-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,3/4-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,4-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -2,3-сиалилтрансферазы,  $\alpha$ -2,6-сиалилтрансферазы,  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы,  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы,  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазы и  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы. Например, для производства LNnT требуется, чтобы модифицированная клетка экспрессировала активный фермент  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу и активный фермент  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазу. Некоторые неограничивающие воплощения белков, обладающих гликозилтрансферазной активностью, которые могут кодироваться рекомбинантными генами, содержащимися в клетке-продуценте, могут быть выбраны из неограничивающих примеров табл. 1.

Таблица 1

Ген	ID белковой последовательности (GenBank)	Описание	Пример ОГМ
<i>lgtA_Nm</i>	WP_002248149.1	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Nm_MC58</i>	AAF42258.1	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Hd</i>	AAN05638.1	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Ng_PID2</i>	AAK70338.1	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH

<i>lgtA_Ng_NCCP1_1945</i>	<i>ACF31229.1</i>	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Past</i>	<i>AAK02595.1</i>	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Nc</i>	<i>EEZ72046.1</i>	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>lgtA_Nm_87255</i>	<i>ELK60643.1</i>	$\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансфераза	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
<i>galT_Hp/HP0826</i>	<i>NP_207619.1</i>	$\beta$ -1,4-галактозил-трансфераза	LNnT, LNFP-III, LNFP-VI, pLNH I, F-pLNH I, pLNnH
<i>galT_Nm/lgtB</i>	<i>AAF42257.1</i>	$\beta$ -1,4-галактозил-трансфераза	LNnT, LNFP-III, LNFP-VI, pLNH I, F-pLNH I, pLNnH
<i>wbgO</i>	<i>WP_000582563.1</i>	$\beta$ -1,3-галактозил-трансфераза	LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-V, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I
<i>cpsIBJ</i>	<i>AB050723.1</i>	$\beta$ -1,3-галактозил-трансфераза	LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-V, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I
<i>jhp0563</i>	<i>AEZ55696.1</i>	$\beta$ -1,3-галактозил-трансфераза	LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-V, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I
<i>galTK</i>	<i>homologous to BD182026</i>	$\beta$ -1,3-галактозил-трансфераза	LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-V, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I
<i>futC</i>	<i>WP_080473865.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT2_HpUA802</i>	<i>AAC99764.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT2_EcO126t</i>	<i>ABE98421.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT2_Hm12198</i>	<i>CBG40460.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT2_Pm9515</i>	<i>ABM71599.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT2_HpF57</i>	<i>BAJ59215.1</i>	$\alpha$ -1,2-фукозил-трансфераза	2'-FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
<i>FucT6_3_Bf</i>	<i>CAH09151.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>FucT7_3_Bf</i>	<i>CAH09495.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>FucT_3_Am</i>	<i>ACD04596.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I

<i>MAMA_R764</i>	<i>AGC02224.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>Mg791</i>	<i>AEQ33441.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>Moumou_00703</i>	<i>YP_007354660</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>fitA</i>	<i>NP_207177.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>ficT</i>	<i>AAB81031.1</i>	$\alpha$ -1,3-фукозил-трансфераза	2'-FL, 3'-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
<i>ficTIII</i>	<i>AY450598.1</i>	$\alpha$ -1,4-фукозил-трансфераза	LNDFH-I, LNDFH-II
<i>ficTa</i>	<i>AF194963.1</i>	$\alpha$ -1,3/4-фукозил-трансфераза	LNFP-II, LNDFH-I, LNDFH-II
<i>Pd2,6ST</i>	<i>BAA25316.1</i>	$\alpha$ -2,6-сиалилтрансфераза	6'-SL
<i>PspST6</i>	<i>BAF92026.1</i>	$\alpha$ -2,6-сиалилтрансфераза	6'-SL
<i>PiST6_145</i>	<i>BAF91416.1</i>	$\alpha$ -2,6-сиалилтрансфераза	6'-SL
<i>PiST6_119</i>	<i>BAI49484.1</i>	$\alpha$ -2,6-сиалилтрансфераза	6'-SL
<i>NST</i>	<i>AAC44541.1</i>	$\alpha$ -2,3-сиалилтрансфераза	3'-SL

Один из аспектов настоящего изобретения представляет собой обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, включающей гетерологичную (гетерологичные) последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты, кодирующую(кодирующие) белок, способный к транспортировке сахара, который представляет собой белок суперсемейства основных посредников (MFS), как показано в SEQ ID NO: 1, или его функциональный гомолог, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок MFS, имеет по меньшей мере 70% идентичности с последовательностью с SEQ ID NO: 2.

Под термином "гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты", "кодирующая рекомбинантный ген/нуклеиновая кислота/ДНК" или "кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты" подразумевают искусственную последовательность нуклеиновой кислоты (т.е. полученную *in vitro* с применением стандартных лабораторных способов получения последовательностей нуклеиновых кислот), которая включает набор последовательных, неперекрывающихся триплетов (кодонов), которые транскрибируются в мРНК и транслируются в полипептид, когда их помещают под контроль соответствующих контрольных последовательностей, т.е. промотора. Границы кодирующей последовательности обычно определяются сайтом связывания рибосомы, расположенным прямо перед открытой рамкой считывания на 5'-конце мРНК, стартовым кодоном трансляции (AUG, GUG или UUG) и стоп-кодоном трансляции (UAA, UGA или UAG). Кодированная последовательность может включать, но не ограничиваться ими, геномную ДНК, кДНК, синтетические и рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот. Термин "нуклеиновая кислота" включает молекулы РНК, ДНК и кДНК. Понятно, что в результате вырождения генетического кода может быть получено множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих данный белок. Термин "нуклеиновая кислота" применяют взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид". "Олигонуклеотид" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты с короткой цепью. "Праймер" представляет собой олигонуклеотид, встречающийся в природе в виде очищенного фрагмента рестрикции или полученный синтетическим путем, который способен действовать как точка инициации синтеза при помещении в условия, в которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера, комплементарного цепи нуклеиновой кислоты (т.е. в присутствии нуклеотидов и индуцирующего агента, такого как ДНК-полимераза, и при подходящей температуре и pH). Праймер предпочтительно применяют одноцепочечным для максимальной эффективности амплификации, но альтернативно он может быть двухцепочечным. Если праймер двухцепочечный, то его сначала обрабатывают, чтобы разделить его нити, прежде чем применять для приготовления продуктов для удлинения. Предпочтительно праймер представляет собой дезоксирибонуклеотид. Праймер должен быть достаточно длинным, чтобы инициировать синтез продуктов удлинения в присутствии индуцирующего агента. Точная длина праймеров будет зависеть от многих факторов, включая температуру, источник праймера и применение способа.

Рекомбинантная нуклеиновая последовательность по изобретению может представлять собой кодирующую последовательность ДНК, например, ген или некодирующая последовательность ДНК, например, регуляторную ДНК, такую как промоторная последовательность. Один аспект изобретения относится к получению рекомбинантной клетки, включающей последовательности рекомбинантной ДНК, кодирующие ферменты, необходимые для продукции одного или нескольких ОГМ, и последовательность ДНК, кодирующую переносчик *Vag*. Соответственно, в одном воплощении изобретение относится к кон-

струкции нуклеиновой кислоты, включающей кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, т.е. последовательность рекомбинантной ДНК представляющего интерес гена, например, гена гликозилтрансферазы или гена *vag*, и некодирующую последовательность ДНК, например, последовательность промоторной ДНК, например, рекомбинантную промоторную последовательность, полученную из промотора оперона *lac* или оперона *gfp*, или промоторную последовательность, полученную из другой последовательности ДНК геномного промотора, или синтетическая промоторная последовательность, где кодирующая и промоторная последовательности функционально связаны. Термин "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более сегментами нуклеиновой кислоты (например, ДНК). Как правило, это относится к функциональной связи регуляторной последовательности транскрипции с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, промоторные регуляторные последовательности транскрипции, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е. они представляют собой *cis*-действующие последовательности.

В одном воплощении конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может представлять собой часть векторной ДНК, в другом воплощении конструкция представляет собой экспрессионную кассету/картридж, интегрированную в геном клетки-хозяина. Соответственно, термин "конструкция нуклеиновой кислоты" означает искусственно сконструированный сегмент нуклеиновой кислоты, в особенности, сегмент ДНК, который предназначен для "трансплантации" в клетку-мишень, например, в клетку-мишень, например, в бактериальную клетку, для модификации экспрессии гена-хозяина или экспрессии последовательности гена/кодирующей ДНК, которая может быть включена в конструкцию. В контексте изобретения конструкция нуклеиновой кислоты включает последовательность рекомбинантной ДНК, включающую две или более последовательностей рекомбинантной ДНК: по существу, некодирующую последовательность ДНК, включающую последовательность промоторной ДНК, и кодирующую последовательность ДНК, кодирующую представляющий интерес белок, например белок *Vag*, гликозилтрансферазу или другой белок, пригодный для продукции ОГМ в клетке-хозяине. Предпочтительно конструкция включает дополнительные некодирующие последовательности ДНК, которые либо регулируют транскрипцию, либо трансляцию кодирующей ДНК конструкции, например, последовательность ДНК, облегчающую связывание рибосомы с транскриптом, лидирующую последовательность ДНК, которая стабилизирует транскрипт, или последовательность терминатора транскрипции.

Интеграция интересующего рекомбинантного гена, включенного в конструкции (т.е. в кассету экспрессии), в бактериальный геном может быть достигнута обычными способами, например, с помощью линейных картиджей, содержащих фланкирующие последовательности, гомологичные определенному участку на хромосоме, как описано для *attTn7*-сайта (Waddell C.S. and Craig N.L., *Genes Dev.* (1988) Feb; 2(2):137-49.); способами геномной интеграции последовательностей нуклеиновых кислот, в которых комбинация опосредована рекомбиназной функцией *Red* фага  $\lambda$  или рекомбиназной функцией *RecE/RecT* профага *Rac* (Murphy, *J Bacteriol.* (1998); 180(8):2063-7; Zhang et al., *Nature Genetics* (1998)20: 123-128 Muylers et al., *EMBO Rep.*(2000) 1(3):239-243); способами, основанными на рекомбинации *Red/ET* (Wenzel et al., *Chem Biol.* (2005), 12(3):349-56; Vetcher et al., *Appl Environ Microbiol.* (2005);71(4):1829-35); или с помощью положительных клонов, т.е. клонов, которые несут кассету экспрессии, могут быть отобраны, например, с помощью маркерного гена, или потери или усиления функции гена.

Одной копии кассеты экспрессии, включающей интересующий ген, может быть достаточно для обеспечения продукции желаемого ОГМ и достижения желаемых эффектов согласно изобретению. Соответственно, в некоторых предпочтительных воплощениях изобретение относится к рекомбинантной ОГМ-продуцирующей клетке, которая включает одну, две или три копии представляющего интерес гена, интегрированного в геномную ДНК клетки. В некоторых воплощениях предпочтительна единственная копия гена.

В одном предпочтительном воплощении рекомбинантная кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой гетерологичную последовательность по отношению к промотору, что означает, что эквивалентная нативная кодирующая последовательность в геноме вида происхождения транскрибируется под контролем другой промоторной последовательности (т.е. не промоторной последовательности конструкции). Тем не менее, что касается клетки-хозяина, кодирующая ДНК может быть либо гетерологичной (т.е. полученной из другого биологического вида или рода), такой как, например, последовательность ДНК, кодирующая белок *Vag*, экспрессированная в клетках-хозяевах *Escherichia coli*, или гомологичной (т.е. полученной из клетки-хозяина), такой как, например, гены оперона толстой кишки, гены *GMAV*.

Термин "регуляторный элемент", или "промотор", или "промоторная область", или "промоторный элемент" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая распознается и связывается ДНК-зависимой РНК-полимеразой во время инициации транскрипции. Промотор вместе с другими последовательностями нуклеиновых кислот, регулируемыми транскрипцию и трансляцию (также называемыми "контрольными последовательностями"), необходим для экспрессии данного гена или

группы генов (т.е. оперона). Как правило, транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала и остановки транскрипции, последовательности начала и остановки трансляции, последовательности терминатора транскрипции и последовательности энхансера или активатора. "Сайт старта транскрипции" означает первый транскрибируемый нуклеотид и обозначен как +1. Нуклеотиды ниже стартового сайта пронумерованы +2, +3, +4 и т.д., а нуклеотиды в 5' противоположном (выше) направлении пронумерованы -1, -2, -3 и т.д. Последовательность промоторной ДНК конструкции может происходить из промоторной области любого гена генома выбранного вида, предпочтительно, из промоторной области геномной ДНК *E.coli*. Соответственно, любая промоторная последовательность ДНК, которая может связываться с РНК-полимеразой и инициировать транскрипцию, подходит для осуществления изобретения. В принципе, любая промоторная последовательность ДНК может быть применена для контроля транскрипции интересующего рекомбинантного гена конструкции, разные или одинаковые промоторные последовательности могут быть применены для управления транскрипцией различных представляющих интерес генов, интегрированных в геном клетки-хозяина или в ДНК вектора экспрессии. Для обеспечения оптимальной экспрессии рекомбинантного гена (рекомбинантных генов), включенного (включенных) в конструкцию, конструкция может содержать дополнительные регуляторные последовательности, например, лидирующую последовательность ДНК, такую как последовательность ДНК, полученную из 5'-нетранслируемой области (5'UTR) гена *glp* *E.coli*, последовательность для рибосомного связывания. Примеры последних последовательностей описаны в WO 2019123324 (включена в настоящий документ в качестве отсылки) и проиллюстрированы в настоящем документе в неограничивающих рабочих примерах.

В некоторых предпочтительных воплощениях регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантного гена, включенного в конструкцию по изобретению, представляет собой промотор оперона *glpFKX*, *PglpF*, в других предпочтительных воплощениях промотор представляет собой промотор оперона *lac*, *Plac*.

В еще одном аспекте регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантного гена, включенного в конструкцию по изобретению, представляет собой *mgIBAC*; промотор транспортера галактозы/метилгалактозидазы *PmgIB* или их варианты, такие как, но не ограничиваясь ими, *PmgIB\_70UTR* последовательности SEQ ID NO: 27 или *PmgIB\_70UTR\_SD4* последовательности SEQ ID NO: 28.

В еще одном аспекте регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантного гена, включенного в конструкцию по изобретению, представляет собой *gatYZABCD*; промотор тагатазо-1,6-бисР-альдозазы *PgatY* или его варианты, такие как, но, не ограничиваясь ими, *PgatY\_U70UTR* последовательности SEQ ID NO: 29.

Предпочтительный в настоящее время регуляторный элемент, присутствующий в генетически модифицированной клетке и/или в конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из

*PgatY\_70UTR*, *PglpF*,

*PglpF\_SD1*, *PglpF\_SD10*, *PglpF\_SD2*, *PglpF\_SD3*, *PglpF\_SD4*, *PglpF\_SD5*, *PglpF\_SD6*,  
*PglpF\_SD7*, *PglpF\_SD8*, *PglpF\_SD9*, *Plac\_16UTR*, *Plac*, *PmgIB\_70UTR* и  
*PmgIB\_70UTR\_SD4*.

Особенно предпочтительные регуляторные элементы, присутствующие в генетически модифицированной клетке и/или в конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из *PglpF* и *Plac*.

Однако любой промотор, обеспечивающий транскрипцию и/или регуляцию уровня транскрипции одной или нескольких рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько белков (или одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот), которые либо необходимы, либо полезны для достижения оптимального уровня биосинтетического производства одного или нескольких ОГМ в клетке-хозяине, например, глюкозилтрансферазы, белков, участвующих в трансмембранном транспорте ОГМ или предшественника ОГМ, белков, регулирующих экспрессию генов, и т.д., и позволяющих достичь желаемых эффектов по изобретению, подходят для практического применения изобретения.

Предпочтительно конструкция по настоящему изобретению, включающая ген, связанный с биосинтетическим продуцированием ОГМ, промоторную последовательность ДНК и другие регуляторные последовательности, такие как последовательность сайта связывания рибосомы (например, последовательность Шайна-Дальгарно), экспрессируемая в клетке-хозяине, обеспечивает ОГМ на уровне не менее 0,03 г/OD (оптическая плотность) на 1 л ферментационной среды, содержащей суспензию клеток-хозяев, например, на уровне около 0,05 г/л/OD, около 0,1 г/л/OD и более. Для целей изобретения последний уровень продукции ОГМ считается "достаточным" или "оптимальным", а клетка-хозяин, способная продуцировать желаемый уровень ОГМ, считается "подходящей клеткой-хозяином", т.е. клетка может быть дополнительно модифицирована для экспрессии белка-переносчика ОГМ, например *Vag*, для достижения хотя бы одного из описанных в настоящем документе эффектов, выгодных для производства ОГМ.

Генетически модифицированная клетка и/или конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает последовательность нуклеиновой кислоты, такую как гетерологичный ген, кодирующий предполагаемый белок-переносчик MFS (суперсемейство основных посредников).

Белок Vag - это транспортный белок MFS, представляющий особый интерес в настоящем изобретении. Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 70% идентичности последовательности с геном, vag, SEQ ID NO: 2.

Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащаяся в генетически модифицированной клетке или в конструкции нуклеиновой кислоты, кодирует белок последовательности SEQ ID NO: 1 или его функциональный гомолог, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1.

Функциональный гомолог белка последовательности SEQ ID NO: 1 может быть получен путем мутагенеза. Функциональный гомолог должен иметь оставшуюся функциональность не менее 50%, такую как 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с функциональностью аминокислотной последовательности последовательности SEQ ID NO: 1. Функциональный гомолог может иметь более высокую функциональность по сравнению с функциональностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Функциональный гомолог последовательности SEQ ID NO: 1 должен быть способен усиливать продукцию ОГМ генетически модифицированной клетки по изобретению.

Генетически модифицированная клетка (клетка-хозяин или рекомбинантная клетка) может представлять собой, например, бактериальную или дрожжевую клетку. В одном предпочтительном воплощении генетически модифицированная клетка представляет собой бактериальную клетку. Что касается бактериальных клеток-хозяев, то в принципе ограничений нет; они могут представлять собой зубактерии (грамм-положительные или грамм-отрицательные) или архебактерии, если они допускают генетические манипуляции для вставки интересующего гена и их можно культивировать в производственных масштабах. Предпочтительно клетка-хозяин обладает свойством культивирования до высокой плотности клеток. Неограничивающими примерами бактериальных клеток-хозяев, подходящих для рекомбинантного промышленного производства ОГМ согласно изобретению, могут представлять собой

*Erwinia herbicola*

(*Pantoea agglomerans*), *Citrobacter freundii*, *Pantoea citrea*, *Pectobacterium carotovorum* или *Xanthomonas campestris*.

Также могут быть применены бактерии рода *Bacillus*, в том числе

*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus thermophilus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* и *Bacillus circulans*.

Аналогично, бактерии родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* могут быть модифицированы с применением способов по данному изобретению, включая, но не ограничиваясь ими,

*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

*salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*,

*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus*

*gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactococcus lactis*.

*Streptococcus thermophiles* и *Propionibacterium freudenreichii*

также представляют собой подходящие виды бактерий для описанного в настоящем документе изобретения. Также часть этого изобретения представляют собой штаммы, модифицированные, как описано в настоящем документе, из родов

*Enterococcus* (например, *Enterococcus faecium* и

*Enterococcus thermophiles*), *Bifidobacterium* (например, *Bifidobacterium longum*,

*Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium bifidum*), *Sporolactobacillus* spp., *Micromonospora*

spp., *Micrococcus* spp., *Rhodococcus* spp. и *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas*

*fluorescens* и *Pseudomonas aeruginosa*).

Бактерии, обладающие характеристиками, описанными в настоящем документе, культивируют в присутствии лактозы, и олигосахарид, такой как ОГМ, продуцируемый клеткой, выделяют либо из самой бактерии, либо из культурального супернатанта бактерии. В одном предпочтительном воплощении генетически модифицированная клетка по изобретению представляет собой клетку *Escherichia coli*.

В другом предпочтительном воплощении клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, например

*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*,

*Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* и т.д.

ОГМ, продуцируемый рекомбинантными клетками по изобретению, может быть очищен с применением подходящей процедуры, доступной в данной области техники (например, такой, как описан в WO 2015188834, WO 2017182965 или WO 2017152918). Генетически модифицированные клетки по изобретению могут быть получены с применением стандартных способов в данной области техники, например описанных в руководствах Sambrook et al., Wilson & Walker, Maniatis et al. и Ausubel et al.

Клетка-хозяин, подходящая для производства ОГМ, например *E. coli*, может включать эндогенный ген  $\beta$ -галактозидазы или экзогенный ген  $\beta$ -галактозидазы, например *E. coli*, включает эндогенный ген *lacZ* (например, номер доступа в GenBank V00296 (GL41901)). Для целей изобретения клетка, продуцирующая ОГМ, подвергается генетическим манипуляциям либо для включения любого гена  $\beta$ -галактозидазы, либо для включения инактивированной версии гена. Ген может быть инактивирован путем полной или частичной делеции соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты из бактериального генома, или последовательность гена может быть мутирована так, как она транскрибируется, или, если транскрибируется, транскрипт не транслируется, или если транслируется в белок (т.е.  $\beta$ -галактозидазу), то белок не обладает соответствующей ферментативной активностью. Таким образом, клетка, продуцирующая ОГМ, накапливает повышенный внутриклеточный пул лактозы, что полезно для продукции ОГМ.

В некоторых воплощениях зародышевая клетка включает дефицитный катаболический путь сиаловой кислоты. Под "катаболическим путем сиаловой кислоты" подразумевается последовательность реакций, обычно контролируемая и катализируемая ферментами, которая приводит к разложению сиаловой кислоты. Примерный путь катаболизма сиаловой кислоты, описанный в настоящем документе, представляет собой путь *E. coli*. В этом пути сиаловая кислота (Neu5Ac; N-ацетилнейраминавая кислота) расщепляется ферментами NanA (лиаза N-ацетилнейраминавой кислоты), NanK (N-ацетилманнозаминкиназа) и NanE (N-ацетилманнозамин-6-фосфатэпимераза), все кодируемые из оперона *nanATEK-yhcH*, и подавляется NanR (<http://ecocyc.org/ECOLI>). Недостаточный катаболический путь сиаловой кислоты воспроизводится у хозяина *E. coli* путем внесения мутации в эндогенные гены *nanA* (N-ацетилнейраминалиаза) (например, номер доступа в GenBank D00067.1 (GL216588)) и/или *nanK* (N-ацетилманнозаминкиназа) (например, номер доступа в GenBank (аминокислота) BAЕ77265.1 (GL85676015)), и/или *nanE* (N-ацетилманнозамин-6-фосфатэпимераза, GI: 947745, включена сюда посредством отсылки). Необязательно ген *nanT* (транспортер N-ацетилнейраминаата) также инактивируют или мутируют. Другие промежуточные продукты метаболизма сиаловой кислоты включают: (ManNAc-6-P) N-ацетилманнозамин-6-фосфат; (GlcNAc-6-P) N-ацетилглюкозамин-6-фосфат; (GlcN-6-P) глюкозамин-6-фосфат и (Fruс-6-P) фруктозо-6-фосфат. В некоторых предпочтительных воплощениях *nanA* мутирован. В других предпочтительных воплощениях *nanA* и *nanK* мутированы, тогда как *nanE* остается функциональным. В другом предпочтительном воплощении *nanA* и *nanE* мутированы, тогда как *nanK* не был мутирован, инактивирован или удален. Мутация представляет собой одно или несколько изменений в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт гена *nanA*, *nanK*, *nanE* и/или *nanT*. Например, мутация может представлять собой 1, 2, до 5, до 10, до 25, до 50 или до 100 изменений в последовательности нуклеиновой кислоты. Например, *nanA*, *nanK*, *nanE* и/или *nanT* гены мутируют путем нулевой мутации. Нулевые мутации, как описано в настоящем документе, включают аминокислотные замены, добавления, делеции или вставки, которые либо вызывают потерю функции фермента (т.е. снижение или отсутствие активности), либо потерю фермента (т.е. отсутствие генного продукта). Под "удаленными" подразумевают, что кодирующая область удалена полностью или частично, так что не образуется (функциональный) продукт гена. Под инактивацией подразумевается, что кодирующая последовательность была изменена таким образом, что полученный генный продукт будет функционально неактивным или будет кодировать генный продукт с активностью менее чем на 100%, например на 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% или 20% по сравнению с активностью нативного, встречающегося в природе, эндогенного генного продукта. "Немутированный" ген или белок не отличается от нативной, встречающейся в природе или эндогенной кодирующей последовательности на 1, 2, вплоть до 5, вплоть до 10, вплоть до 20, вплоть до 50, вплоть до 100, вплоть до от 200 или вплоть до 500 или более кодонов или до соответствующей закодированной аминокислотной последовательности.

Кроме того, клетка-хозяин (например, *E. coli*) также обладает способностью к синтезу сиаловой кислоты. Например, бактерия обладает способностью синтезировать сиаловую кислоту за счет экзогенной UDP-GlcNAc 2-эпимеразы (например, *neuC* из *Campylobacter jejuni* (GenBank AAK91727.1; GL15193223) или ее эквивалентов (например *neuC* из *E. coli* S88 (GenBank YP\_002392936.1; GI:218560023), синтазы Neu5Ac (например, *neuB* из *C. jejuni* (GenBank AAK91726.1; GI:15193222) или ее эквивалентов, (например, синтазы сиаловой кислоты из *Flavobacterium limnosediminis*, GenBank GL559220424), и/или синтазы CMP-Neu5Ac (например, *neuA* из *C. jejuni* (GenBank AAK91728.1; GI:15193224) или ее эквивалентов, (например, CMP-синтазы сиаловой кислоты *Vibrio brasiliensis*, GenBank GI:493937153).

Получение нейтрального ОГМ, содержащего N-ацетилглюкозамин, в сконструированных бактериях

и дрожжах известно в данной области техники (смотри, например, Gebus C et al. (2012) Carbohydrate Research 363 83-90; US 10519475).

Для производства ОГМ, содержащих N-ацетилглюкозамин, таких как лакто-N-триоза 2 (LNT-2), лакто-N-тетраоза (LNT), лакто-N-неотетраоза (LNnT), лакто-N-фукопентаоза I (LNFP-I), лакто-N-фукопентаоза II (LNFP-II), лакто-N-фукопентаоза III (LNFP-III), лакто-N-фукопентаоза V (LNFP-V), лакто-N-дифукогексаоза I (LDFH-I), лакто-N-дифукогексаоза II (LDFH-II) и лакто-N-неодифукогексаоза II (LNDFH-III), бактерия включает функциональный ген *lacY* и дисфункциональный ген *lacZ*, как описано выше, и он сконструирован так, чтобы включать экзогенный ген UDP-GlcNAc:Gal $\alpha$ / $\beta$ -R- $\beta$ -3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы или его функциональный вариант или фрагмент. Этот экзогенный ген UPD-GlcNAc:Gal $\alpha$ / $\beta$ -R- $\beta$ -3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (GlcNAcT) может быть получен из любого из ряда источников (см. табл. 1), например, из гена *lgtA*, описанного в *N. meningitidis* (номер доступа белка в GenBank AAF42258.1) или *N. gonorrhoeae* (номер доступа белка в GenBank ACF31229.1). Необязательно дополнительный ген экзогенной гликозилтрансферазы может быть коэкспрессирован в бактерии, включающей экзогенный ген UDP-GlcNAc:Gal $\alpha$ / $\beta$ -R- $\beta$ -3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы. Например, ген  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы (*Gal4T*) коэкспрессируется с геном UPD-GlcNAc:Gal $\alpha$ / $\beta$ -R- $\beta$ -3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы. Этот экзогенный ген  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы может быть получен из любого источника, например, описанного в *N. meningitidis*, ген *lgtB* (номер доступа белка в GenBank AAF42257.1) или из *H. pylori*, ген HP0826/*galT* (номер доступа белка в GenBank NP207619.1). Необязательно дополнительный ген экзогенной гликозилтрансферазы, коэкспрессируемый в бактерии, включающей экзогенный ген UDP-GlcNAc:Gal $\alpha$ / $\beta$ -R- $\beta$ -3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, представляет собой ген  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазы (*Gal3T*), например, тот, что описан из *E. coli* 055:H7, ген *wbgO* (номер доступа белка в GenBank WP000582563.1), или из *H. pylori*, ген *jhp0563* (номер доступа белка в GenBank AEZ55696.1), или из *Streptococcus agalactiae* type Ib O12 ген *cpsIBJ g* (номер доступа белка в GenBank AB050723.1). Раскрытое изобретение также охватывает функциональные варианты и фрагменты любого из ферментов, описанных выше.

Ген N-ацетилглюкозаминилтрансферазы и/или ген галактозилтрансферазы также может быть функционально связан с *Pglr* и экспрессироваться из соответствующей интегрированной в геном кассеты. В одном воплощении ген, интегрированный в геном, представляет собой ген, кодирующий галактозилтрансферазу, например, ген HP0826, кодирующий фермент *GalT* из *H. pylori* (номер доступа белка в GenBank NP207619.1); в другом воплощении ген, интегрированный в геном, представляет собой ген, кодирующий  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу, например, ген *lgtA* из *N. meningitidis* (номер доступа белка в GenBank AAF42258.1). В этих воплощениях второй ген, т.е. ген, кодирующий  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу или галактозилтрансферазу, соответственно, может экспрессироваться либо из интегрированной в геном, либо из переносимой плазмидой кассеты. Второй ген необязательно может экспрессироваться либо под контролем промотора *glr* или под контролем любого другого промотора, подходящего для системы экспрессии, например, *P<sub>lac</sub>*.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Singleton et al. (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second edition, John Wiley and Sons (New York) предоставляет специалисту общий словарь многих терминов, применяемых в этом изобретении. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть применены на практике или тестировании настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы. Большую часть номенклатуры и общих лабораторных процедур, необходимых для этого приложения, можно найти в руководствах Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (2012); Wilson K. and Walker J., Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (2010), Cambridge University Press; или в Maniatis et al., Molecular Cloning A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2012); или в Ausubel et al., Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sohns (2010). Руководства далее именуют "Sambrook et al.", "Wilson & Walker", "Maniatis et al.", "Ausubel et al.", соответственно.

Второй аспект изобретения относится к способу получения одного или нескольких ОГМ, включающему следующие этапы:

(i) обеспечение генетически модифицированной клетки, способной продуцировать ОГМ, причем указанная клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок последовательности SEQ ID NO: 1, или ее функциональный гомолог, аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно идентична по меньшей мере на 85%, более предпочтительно идентична по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 1;

(ii) культивирование клетки (i) в подходящей среде для культивирования клеток для экспрессии указанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты;

(iii) сбор ОГМ, полученного на этапе (ii).

Согласно изобретению термин "культивирование" (или "культивирование" или "культивирование",

также называемое "ферментация") относится к размножению бактериальных экспрессирующих клеток в контролируемом биореакторе в соответствии со способами, известными в промышленности.

Для получения одного или нескольких ОГМ бактерии, продуцирующие ОГМ, как описано в настоящем документе, культивируют в соответствии с процедурами, известными в данной области техники, в присутствии подходящего источника углерода, например глюкозы, глицерина, лактозы и т.д., и полученный ОГМ собирают из сред культивирования и микробной биомассы, образующейся в процессе культивирования. После этого ОГМ очищают в соответствии с процедурами, известными в данной области техники, например, такими, как описаны в WO 2015188834, WO 2017182965 или WO 2017152918, и очищенный ОГМ применяют в качестве нутрицевтиков, фармацевтических препаратов или для любых других целей, например, для исследований. Производство ОГМ обычно осуществляется путем культивирования в больших объемах. Термин "производство" и "производственный масштаб" в значении изобретения определяют ферментацию с минимальным объемом 5 л культурального бульона. Обычно процесс в "производственном масштабе" определяют способностью обрабатывать большие объемы препарата, содержащего ОГМ или представляющий интерес ОГМ, и производить такие количества представляющего интерес белка, которые соответствуют, например, в случае терапевтического соединения или композиции, требованиям для клинических испытаний, а также для предложения на рынке. Помимо большого объема способ в производственных масштабах, в отличие от простых способов в лабораторных масштабах, таких как культивирование во встряхиваемых колбах, характеризуется применением технической системы биореактора (ферментера), оснащенного устройствами для перемешивания, аэрации, подачи питательных веществ, слежения за параметрами процесса и контроля параметров процесса (рН, температура, давление растворенного кислорода, обратное давление и др.). В значительной степени поведение системы экспрессии в лабораторном масштабе, например во встряхиваемых колбах, настольных биореакторах или формате глубоких лунок, описанных в примерах настоящего раскрытия, позволяет предсказать поведение этой системы этой системы в сложной среде биореактора.

Что касается подходящей среды для культивирования, применяемой в процессе ферментации, ограничений нет. Культуральная среда может быть полуопределенной, то есть содержащей комплексные соединения среды (например, дрожжевой экстракт, соевый пептон, казаминовые кислоты и т.д.), или она может быть химически определенной, без каких-либо комплексных соединений.

Под термином "один или несколько ОГМ" подразумевают, что производственная ячейка ОГМ может быть способна производить одну структуру ОГМ (первый ОГМ) или несколько структур ОГМ (второй, третий и т.д. ОГМ). В некоторых воплощениях может быть предпочтительной клетка-хозяин, которая продуцирует один ОГМ, в других предпочтительных воплощениях может быть предпочтительной клетка-хозяин, продуцирующая несколько структур ОГМ. Клетки, продуцирующие 2'FL, 3FL, 3'SL, 6'SL или LNT-2 представляют собой неограничивающие примеры клеток-хозяев, продуцирующих ОГМ единственной структуры. Неограничивающие примеры клеток-хозяев, способных продуцировать несколько структур ОГМ, могут представлять собой клетки-продуценты DFL, FSL, LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-IV, LNFP-V, pLNnHor-II.

Термин "сбор" в контексте изобретения относится к сбору полученных ОГМ после прекращения ферментации. В различных воплощениях это может включать сбор ОГМ, включенных как в биомассу (т.е. клетки-хозяева), так и в среду культивирования, т.е. до/без отделения ферментационного бульона от биомассы. В других воплощениях полученный ОГМ можно собирать отдельно от биомассы и ферментационного бульона, т.е. после отделения/следом за отделением биомассы от среды культивирования (т.е. ферментационного бульона). Отделение клеток от среды может быть осуществлено любым из способов, хорошо известных специалисту в данной области техники, например, любым подходящим типом центрифугирования или фильтрации. Отделение клеток от среды может следовать сразу за сбором ферментационного бульона или осуществляться на более позднем этапе после хранения ферментационного бульона в соответствующих условиях. Извлечение произведенных ОГМ из оставшейся биомассы (или полная ферментация) включает их извлечение из биомассы (т.е. клеток-продуцентов). Это можно осуществить любыми подходящими способами в данной области техники, например, обработкой ультразвуком, кипячением, гомогенизацией, ферментативным лизисом с применением лизоцима или замораживанием и измельчением.

После восстановления после ферментации ОГМ доступны для дальнейшей обработки и очистки.

Очистку ОГМ, полученных ферментацией, можно проводить с применением подходящей процедуры, описанной в WO 2016095924, WO 2015188834, WO 2017152918, WO 2017182965, US 20190119314 (все включены посредством отсылки).

В некоторых воплощениях изобретения клетка-хозяин может продуцировать несколько ОГМ, где один ОГМ представляет собой ОГМ-"продукт", а некоторые/все прочие ОГМ представляют собой ОГМ-"побочный продукт". Как правило, побочные ОГМ представляют собой либо основных предшественников ОГМ, либо продукты дальнейшей модификации основных ОГМ. В некоторых воплощениях может быть желательно производить продукт ОГМ в больших количествах и побочный продукт ОГМ в малых количествах. Клетки и способы получения ОГМ, описанные в настоящем документе, обеспечивают контролируемое производство продукта ОГМ с заданным профилем ОГМ, например в одном воплощении

полученная смесь ОГМ, в которой продукт ОГМ представляет собой доминирующим ОГМ по сравнению с другими ОГМ (т.е. побочными ОГМ) смеси, т.е. ОГМ-продукт производится в большем количестве, чем другие ОГМ-побочные продукты; в других воплощениях клетка, производящая одну и ту же смесь ОГМ, может быть настроена на производство одного или нескольких побочных продуктов ОГМ в большем количестве, чем ОГМ-продукт. Например, при производстве LNnT, ОГМ-продукта, часто образуется значительное количество рLNnH, ОГМ-побочного продукта. В другом примере при производстве LNT образуется значительное количество побочного продукта рLNH-II. С генетически модифицированными клетками по настоящему изобретению уровень рLNnH в LNnT-продукте может быть значительно снижен.

Преимущественно изобретение обеспечивает как снижение отношения побочного продукта к продукту, так и увеличение общего выхода продукта (и/или ОГМ в целом). Это сниженное образование побочных продуктов по сравнению с образованием продукта, способствует повышенному образованию продукта и повышает эффективность как производства, так и процесса извлечения продукта, обеспечивая превосходную технологию производства ОГМ.

В различных предпочтительных воплощениях могут быть выбраны различные клетки-хозяева, продуцирующие один/оба 2'FL, 3FL, 3'SL, 6'SL, LNT-2, DFL, FSL, LNT, LNnT, DFL, FSL, LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-IV, LNFP-V, рLNnH, рLNH-II, в качестве ОГМ продукта или побочного продукта. В одном предпочтительном воплощении продукт представляет собой LNnT, а побочный продукт представляет собой рLNnH. В другом предпочтительном воплощении продукт представляет собой LNT, а побочный продукт представляет собой рLNH-II.

Изобретение также относится к применению генетически модифицированной клетки и/или конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению для продукции одного или нескольких олигосахаридов, предпочтительно, одного или нескольких олигосахаридов грудного молока. В одном воплощении генетически модифицированную клетку и/или конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению применяют для получения конкретного ОГМ, выбранного из группы, состоящей из 2'-FL, 3-FL, DLF, LNT, LNT-II, LNnT, рLNH-II и рLNnH.

В особенно предпочтительном воплощении генетически модифицированную клетку и/или конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению применяют для получения конкретного ОГМ, выбранного из группы, состоящей из LNT, LNT-II, LNnT и рLNH-II и рLNnH.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже неограничивающими примерами и воплощениями.

### Примеры Материалы и методы

Если не указано иное, для манипулирования с нуклеиновыми кислотами, трансформации и экспрессии нуклеиновых кислот применяют стандартные методики, векторы, элементы контрольной последовательности и другие элементы системы экспрессии, известные в области молекулярной биологии. Такие стандартные техники, векторы и элементы можно найти, например, в руководствах:

Ausubel et al. (eds.), *Current*

*Protocols in Molecular Biology* (1995) (John Wiley & Sons); Sambrook, Fritsch, & Maniatis (eds.), *Molecular Cloning* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Berger & Kimmel, *Methods in Enzymology* 152: Guide to Molecular Cloning Techniques (1987) (Academic Press); Bukhari et al. (eds.), *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes* (1977) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Miller, J.H. *Experiments in molecular genetics* (1972.) (Cold spring Harbor Laboratory Press, NY)

Описанные ниже воплощения выбраны для иллюстрации изобретения и никоим образом не ограничивают изобретение.

### Штаммы

Применяемый бактериальный штамм, MDO, был сконструирован из *Escherichia coli* K12 DHL. Генотип *E.coli* K12 DH1 представлял собой: F<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup>, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*. Штаммы, примененные в настоящих примерах, описаны в табл. 2.

Таблица 2

ID штаммов	Продукт	Соответствующий генотип	
DH1	-	<i>F<sup>-</sup>λ-endA1recA1relA1gyrA96thi-1ghnV44hsdR17(rk<sup>-</sup>mk<sup>-</sup>)</i>	
MDO	-	<i>E. coli DH1 ΔlacZ, ΔlacA, ΔnanKETA, ΔmelA, ΔwcaJ, ΔmdoH</i>	
MP3672	LNnT	<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4T (version 1)*</i>	
MP3708		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-yberC0001_9420</i>	
MP3972		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-bad</i>	
MP3979		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-fred</i>	
MP4011		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-marc</i>	
MP3994		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-vag (версия 1)**</i>	
MP3984		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-nec</i>	
MP4362		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4T Plac-yabM</i>	
MP3020		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4T (версия 2)*</i>	
MP4064		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPglpF-vag</i>	
MP4065		<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal4TPlac-vag (версия 2)**</i>	
MP4473		LNT	<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal3T</i>
MP4546			<i>MDO PglpF-GlcNAcT PglpF-Gal3T PglpF-vag</i>

\*Штаммы MP3672 и MP3020 несут одни и те же гетерологичные GlcNAcT и Gal4T, но отличаются количеством копий соответствующего гена, кодирующего GlcNAcT.

\*\*Штаммы MP3994 и MP4065 несут одни и те же гетерологичные GlcNAcT и Gal4T, но отличаются числом копий соответствующего гена, кодирующего GlcNAcT.

### Среда

Среду для бульона Луриа (LB) готовили с применением порошка бульона LB, Millers ("Fisher Scientific"), а чашки с агаром LB готовили с применением порошка агара LB, Millers ("Fisher Scientific"). При необходимости добавляли ампициллин ((100 мкг/мл) или любой подходящий антибиотик) и/или хлорамфеникол (20 мкг/мл).

Базовая минимальная среда имела следующий состав: NaOH (1 г/л), KOH (2,5 г/л), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7 г/л), NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7 г/л), лимонная кислота (0,5 г/л), раствор микроэлементов (5 мл/л). Исходный раствор микроэлементов содержал: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,82 г/л, лимонную кислоту 20 г/л, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,98 г/л, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3,925 г/л, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,2 г/л. pH базовой минимальной среды доводили до 7,0 с помощью 5 н NaOH и автоклавировали. Перед инокуляцией в базовую минимальную среду добавляли 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 мкг/мл тиамин, 0,5% заданного источника углерода (глицерин ("Carbosynth")) и при необходимости добавляли изопропил-β-D-тиогаалактозид (IPTG) (0,2 mM). Тиамин, антибиотики и IPTG стерилизовали фильтрованием. Все процентные концентрации для глицерина выражены как об./об., а для глюкозы - мас./об.

Чашки M9, содержащие 2-дезоксигалактозу, имели следующий состав: 15 г/л агара ("Fisher Scientific"), 2,26 г/л 5×M9 Minimal Salt ("Sigma-Aldrich"), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 мкг/мл тиамин, 0,2% глицерина и 0,2% 2-дезоксид-галактозы ("Carbosynth").

Индикаторные планшеты МакКонки имели следующий состав: 40 г/л агаровая основа МакКонки (BD Difco™) и источник углерода в конечной концентрации 1%.

### Культивирование

Если не указано иное, то штаммы E.coli размножали в среде Луриа-Бертани (LB), содержащей 0,2% глюкозы, при 37°C при перемешивании. Чашки с агаром инкубировали при 37°C в течение ночи.

### Химически компетентные клетки и трансформации

E. coli инокулировали из чашек LB в 5 мл LB, содержащего 0,2% глюкозы, при 37°C при встряхивании до CD<sub>600</sub> ~0,4. 2 мл культуры собирали центрифугированием в течение 25 с при 13000 g. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 600 мкл холодных растворов ТВ (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl). Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин с последующим осаждением в течение 15 с при 13000 g. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл холодного раствора ТВ. Трансформацию плазмид проводили с применением 100 мкл компетентных клеток и 1-10 нг плазмидной ДНК. Клетки и ДНК инкубировали на льду в течение 20 мин, а затем подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 45 с. После 2-минутной инкубации на льду добавляли 400 мкл SOC (20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 0,186 г/л KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> и 20 mM глюкозы) и культуру клеток инкубировали при 37°C при встряхивании в течение 1 ч перед посевом на селективные чашки.

Плазмиду трансформировали в химически компетентные клетки TOP10 в условиях, рекомендованных поставщиком ("ThermoFisher Scientific").

### ДНК методы

Плазмидную ДНК из E.coli выделяли с применением набора QIAprep Spin Miniprep ("Qiagen"). Хромосомную ДНК из E.coli выделяли с применением набора QIAmp DNA Mini Kit ("Qiagen"). Продукты ПЦР очищали с применением набора QIAquick PCR Purification Kit ("Qiagen"). Мастер-микс для ПЦР DreamTaq ("ThermoFisher"), мастер-микс для ПЦР с горячим стартом Phusion U ("ThermoFisher"), USER Enzyme ("New England Biolab") применяли в соответствии с рекомендациями поставщика. Праймеры

были поставлены компанией "Eurofins Genomics", Германия. Фрагменты ПЦР и плазмиды были секвенированы компанией "Eurofins Genomics". ПЦР колоний проводили с применением DreamTaq PCR Master Mix в термоциклере T100TM (Bio-Rad).

Таблица 3. Олигонуклеотиды, применяемые для амплификации остова плазмиды, промоторных элементов и представляющих интерес генов

Название	SEQ ID NO	Олигонуклеотидная последовательность 5' – 3'	Описание
O40	5	ATTAACCCUCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGG C	Остов. прямой
O68	6	ATGCGCAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAG	Пласт. прямой
O79	7	ATTTGCGCAUCACCAATCAAATTCACGCGGCC	Остов. обратный
O113	8	AGCTGTTUCCTCCTTAGGTACCCAGCTTTTGTCC C	Пласт. обратный
O261	9	ATGCGCAAUUGCGGCACGCCTTGCAGATTACG	PglpF. прямой
O262	10	AGCTGTTUCCTCCTTGGTTAATGTTTGTGTATGC G	PglpF. обратный
kaby745	11	AAACAGCUATGAAGAGCCTGCTGACCCGTAAC	vag. прямой
kaby746	12	AGGGTTAAUTTAAACGTTTTTCACACGCGCG	vag. обратный
kaby721	13	AAACAGCUATGAAGAGCGCGCTGACCTTTAGC	yberC0001_9420.п рямой
kaby722	14	AGGGTTAAUTTACGCCTCACGCACACGCG	yberC0001_9420.о братный
kaby733	15	AAACAGCUATGAAGAGCGCGCTGACCTTCAG	fred. прямой
kaby734	16	AGGGTTAAUTTACGCCTCACGCACACGCG	fred. обратный
kaby729	17	AAACAGCUATGAGCAGCCGTCGTCTGAGC	bad. прямой
kaby730	18	AGGGTTAAUTTACACGTTTTTAACACGGGTCATC AG	bad. обратный
kaby741	19	AAACAGCUATGCAGAGCTTACCCCGCC	nes. прямой
kaby742	20	AGGGTTAAUTTACGCCTGCTCTTTAACACGCAGC	nes. обратный
kaby737	21	AAACAGCUATGCAGCGTCTGAGCCGTCTGAG	marc. прямой
kaby738	22	AGGGTTAAUTTAAACTTCACGCACTTTCGCGC	marc. обратный
O48	23	CCCAGCGAGACCTGACCGCAGAAC	galK. прямой
O49	24	CCCAGTCCATCAGCGTGACTACC	galK. обратный
MP1217	25	AAACAGCUATGAAGGGCGCTGTGGAGCCGTCG	yabM. прямой
MP1218	26	AGGGTTAAUCGCCAGCGGAACGCTTTCACG	yabM. обратный

Таблица 4. Гетерологичные гены транспортеров MFS, протестированные на микробных хозяевах по настоящему изобретению

Ген	Происхождение генов	Номер доступа	Функция белка
<i>yberC0001_9420</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>	EEQ08298.1	Суперсемейство основных посредников MFS 1
<i>fred*</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>	WP_087817556.1	Транспортер MFS
<i>nes*</i>	<i>Rosenbergiella nectarea</i>	WP_092672081.1	Транспортер MFS
<i>marc*</i>	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060448169.1	Транспортер MFS
<i>bad*</i>	<i>Rouxiella badensis</i>	WP_017489914.1	Транспортер MFS
<i>vag*</i>	<i>Pantoea vagans</i>	WP_048785139.1	Транспортер MFS
<i>yabM</i>	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	CAU73138.1	Предполагаемый переносчик оттока сахара MFS

\*название гена дано для идентификации нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую номеру доступа в GenBank, для целей настоящего изобретения

Таблица 5. Элементы синтетической ДНК, примененные для прямой экспрессии *vag*

Название последовательности	SEQ ID NO	Последовательность (5'-3')	Описание
<i>P<sub>gfpF</sub></i>	3	GCGGCACGCCTTGCAGATTACGGTTTGCC ACACTTTTCATCCTTCTCCTGGTGACATAA TCCACATCAATCGAAAAATGTTAATAAATTT GTTGCGGAATGATCTAACAAACATGCAT CATGTACAATCAGATGGAATAAATGGCGC GATAACGCTCATTTTATGACGAGGCACAC ACATTTTAAGTTCGATATTTCTCGTTTTTGC TCGTTAACGATAAGTTTACAGCATGCCTAC AAGCATCGTGGAGGTCCGTGACTTTCACG CATAACAACAATTAACCAAGGAGGAAA CAGCT	Элемент экспрессии ДНК из 300 нуклеотидов
<i>Plac</i>	4	ATGCGCAAATTGTGAGTTAGCTCACTCATT AGGCACCCAGGCTTTACACTTATGCTTC CGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTAT GACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTA CCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTA CCTAAGGAGGAAACAGCT	Элемент экспрессии ДНК из 195 нуклеотидов
<i>vag</i>	2	ATGAAGAGCCTGCTGACCCGTAACGTCG TATTAACCCGGTGTCTCGCGTTTATGGC GGCGAGCTTCATGATCGGTGTTGCGGGTG CGTGCAGGCGCCGACCTGAGCCTGTTT	ДНК, кодирующая транспортер MFS
		TGACCCGTGAGGTGCAAGCGCGTCCGCTG TGGGTGGGCTGTCTTACCGTTAACGCG ATCGCGGGTATGTGGTTAGCATGCTGGTT GCGAAGCGTAGCGACAGCCGTGGCGATCG TCGTACCCTGATTCTGTTCTGCTGCGGAT GGCGTTTTGCAACGCGCTGCTGTTCGCGTT TACCCGTACTACTGACCCTGATTACCCT GGGTGTGCTGCTGAGCGCGCTGGCGAGCG TTAGCATGCCGAGATTTTCGCGCTGGCGC GTGAGTATGCGGACCAAGCGCGCTGAA GCGGTGATGTTTAGCAGCGTTATGCGTGC GCAGCTGAGCCTGGCGTGGGTGATTGGCC CGCCGCTGAGCTTCGCGCTGGCGCTGAA TTCGGTTTTGTGACCCTGTTCTGGTTGCT GCGGGCTGTTTCTGTTGTGCATCCTGCTG ATTAAGTTTACCCTGCCGAGCGTTCCGCGT GCGGAACCGCTGATGCGTAGCGGTGGCAT GCCGCTGAGCGGTGGCGTGACCCTGATG TGCTCTGCTGTTTATGCGAGCGTTACCA TGTTGACCTGCAACACCATGTACATCATTG ACATGCCGCTGTATATCAGCGTTACCCTGG GTCTGCCGAGAACTGGCGGGTCTGCTG ATGGGACCGCGCGGGTCTGAAAATCC GGTGTGCTGCTGGCGGGTCACTATGCGA AGCGTGTGGTAAACGTAACCTGATGCTG ATTGCGGTGGCGGGCGGCTTCTGTTCTAT GCGGGTCTGGCGATGTTTGCAGCCAGAC CGCGCTGATGGCGCTGCAACTGTCAACG CGGTGTTATTGGCATCATTGCGGGTATCG GCATGCTGTGGTTCCAGGATCTGATGCCG GGTCGTCCGGGTGCGGCGACCACCATGTT TACCAACAGCATCAGCACCGGTATGATTC TGCGGGCGTTATCCAAGGCACCCTGAGC GAGCGTTTCGGCCACATTGCGGTGATTGG CTGGCGCTGGGTCTGGCGGTGCGGGCTTT GCGATGAGCGCGCTGTGAAAACGTTTA A	

#### Конструирование плазмид

Были синтезированы плазмидные скелеты, содержащие два эндонуклеазных сайта I-SceI, разделенных двумя фрагментами ДНК, приспособленными для гомологичной рекомбинации в геном *E. coli*, и последовательностью терминатора транскрипции T1. Например, в одной плазмидной основе был синтезирован оперон *gal* (необходимый для гомологичной рекомбинации в *galK*) и последовательность терминатора транскрипции T1 (pUC57::*garl*) ("GeneScript"). Последовательности ДНК, примененные для гомологичной рекомбинации в *gal*-опероне, охватывают пары оснований 3.628.621-3.628.720 и 3.627.572-3.627.671 в последовательности *Escherichia coli* K-12 MG155, полный геном GenBank: ID: CP014225.1. Вставка путем гомологичной рекомбинации привела бы к делеции 949 пар оснований *galK* и фенотипа *galK*-. Подобным образом могут быть синтезированы скелеты на основе pUC57 ("GeneScript") или любого другого подходящего вектора, содержащего два сайта эндонуклеазы I-SceI, разделенных двумя фрагментами ДНК, приспособленными для гомологичной рекомбинации в геном *E. coli*, и последовательностью терминатора транскрипции T1. Для конструирования праймеров и амплификации специфических последовательностей ДНК хромосомной ДНК *Escherichia coli* K-12 DH1 применяли стандартные методики, хорошо известные в области молекулярной биологии. Такие стандартные приемы, векторы и элементы можно найти, например, в руководствах: Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*

(1995) (John Wiley & Sons); Sambrook, Fritsch, & Maniatis (eds.), Molecular Cloning (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Berger & Kimmel, Methods in Enzymology 152: Guide to Molecular Cloning Techniques (1987) (Academic Press); Bukhari et al. (eds.).

Хромосомную ДНК, полученную из *E. coli* DH1, применяли для амплификации фрагмента ДНК размером 300 п.н., содержащего промотор PglpF, с применением олигонуклеотидов 0261 и 0262, и фрагмента ДНК длиной 195 п.н., содержащего Plac, с применением олигонуклеотидов 068 и 0113 (табл. 3).

Фрагмент ДНК длиной 1179 п.н., содержащий кодон-оптимизированную версию гена *vag*, происходящего из *Pantoea vagans* синтезировали с помощью "GeneScript" (табл. 5). Ген *vag* амплифицировали методом ПНР с применением олигонуклеотидов KAY745 и KAY746.

Все ПЦР-фрагменты (основы плазмиды, элементы, содержащие промотор, и ген *vag*) очищали и собирали основы плазмиды, элементы промотора (PglpF или Plac) и фрагмент ДНК, содержащий *vag*. Плазмиды клонировали с помощью стандартного клонирования USER. Клонирование в любой подходящей плазмиде может быть осуществлено с помощью любых стандартных способов клонирования ДНК. Плазмиды трансформировали в клетки TOP10 и отбирали на чашках LB, содержащих 100 мкг/мл ампициллина (или любого подходящего антибиотика) и 0,2% глюкозы. Сконструированные плазмиды очищали, а последовательность промотора и 5'-конец гена *vag* подтверждали секвенированием ДНК ("MWG Eurofins Genomics"). Таким образом конструировали генетическую кассету, содержащую любой представляющий интерес промотор, связанный с геном *vag*.

Таблица 6. Примеры хелперных и донорных плазмид, применяемых для конструирования штаммов

Плаزمида	Соответствующий генотип	Маркерный ген
pACBSR	<i>Para-1-SceI-λ Red, p15A ori, cam*</i>	cam
pUC57	<i>pMB1, bla</i>	Bla
pUC57::gal	<i>pUC57::galTK' / T1-galKM'</i>	Bla

Последовательности ДНК гетерологичных генов, кодирующих представляющие интерес транспортеры или гликозилтрансферазы, были оптимизированы по кодонам и синтезированы с помощью GeneScript. Интересующие гены, кодирующие белки-транспортеры, как показано в табл. 4, амплифицировали с помощью ПЦР с применением подходящих праймеров, охватывающих стартовый кодон ATG и стоп-кодон TAA гена (табл. 3). Для конструирования донорных плазмид с любым представляющим интерес гетерологичного гена, применяли стандартное клонирование USER для объединения очищенных ПЦР-фрагментов соответствующего скелета плазмиды, промоторного элемента и представляющего интерес гена. Клонирование в соответствующей плазмиде может быть осуществлено с применением любого стандартного способа клонирования ДНК. После клонирования ДНК трансформировали в клетки TOP10 и отбирали на чашках LB, содержащих 100 мкг/мл ампициллина (или 50 мг/мл канамицина в зависимости от применяемой основы) и 0,2% глюкозы. Сконструированные плазмиды очищали, а последовательность промотора и 5'-конец интересующего гена подтверждали секвенированием ДНК (MWG Eurofins Genomics).

### Конструирование штаммов

Применяемый бактериальный штамм, MDO, был сконструирован из *Escherichia coli* K-12 DHL. Генотип *E. coli* K-12 DH1 представляет собой F', λ<sup>-</sup>, *guyA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*. В дополнение к генотипу *E. coli* K-12 DH1 MDO имеет следующие модификации: *lacZ*: делеция, размером 1,5 т.п.н., *lacA*: делеция, размером 0,5 т.п.н., *nanKETA*: делеция, размером 3,3 т.п.н., *melA*: делеция, размером 0,9 т.п.н., *wcaJ*: делеция, размером 0,5 т.п.н., *mdoH*: делеция, размером 0,5 т.п.н., и вставка промотора Plac выше гена *gmd*.

Вставку кассеты экспрессии, содержащей промотор, связанный с геном *vag* и последовательностью терминатора транскрипции T1, осуществляли с помощью Gene Gorging, по существу, как описано Herring et al. (Herring, CD., Glasner, J.D. and Blattner, F.R. (2003). 311). 153-163), а примеры хелперной и донорной плазмид, примененных для конструирования штаммов, представленных в настоящей заявке, приведены в табл. 6. Вкратце, донорную плазмиду и хелперную плазмиду ко-трансформировали в MDO и отбирали на чашках с LB, содержащих 0,2% глюкозы, ампициллин (100 мкг/мл) или канамицин (50 мг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл). Одиночную колонию инокулировали в 1 мл LB, содержащего хлорамфеникол (20 мкг/мл) и 10 мкл 20% L-арабинозы, и инкубировали при 37°C при встряхивании в течение 7-8 ч. Для интеграции в локусы *galK* клеток *E. coli* затем высевали на чашки M9-DOG и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Отдельные колонии, сформированные на чашках MM-DOG, повторно высевали штрихом на чашки с LB, содержащих 0,2% глюкозы, и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Ожидалось, что колонии, которые выглядели белыми на чашках с агаром MacConkey-галактоза и были чувствительны как к ампициллину, так и к хлорамфениколу, потеряли донорную и вспомогательную плазмиду и содержали вставку в локусах *galK*. Вставки в сайт *galK* идентифицировали с помощью ПЦР колоний с применением праймеров 048 (SEQ ID NO: 23) и 049 (SEQ ID NO: 24), а вставленную ДНК проверяли секвенированием ("Eurofins Genomics", Германия).

Встраивание генетических кассет в другие локусы хромосомной ДНК *E. coli* осуществляли аналогичным образом с применением различных маркерных генов селекции.

### Анализ в глубоких лунках (DWA)

DWA выполняли, как первоначально описано в работе Lv et al. (Bioprocess BiosystEng (2016) 39:1737-1747), и оптимизировали для целей настоящего изобретения.

Более конкретно, штаммы, раскрытые в примерах, подвергали скринингу в 24 планшетах с глубокими лунками с применением 4-дневного протокола. В течение первых 24 ч клетки выращивали до высокой плотности, а в следующие 72 ч клетки переносили в среду, которая позволяла индуцировать экспрессию генов и образование продукта. В особенности, в течение 1-го дня готовили свежие инокуляты с применением базовой минимальной среды с добавлением сульфата магния, тиамина и глюкозы. После 24-часовой инкубации приготовленных культур при 34°C при встряхивании со скоростью 700 об/мин клетки переносили на новую базальную минимальную среду (2 мл) с добавлением сульфата магния и тиамина, к которой вводили начальный болюс 20% раствора глюкозы (1 мкл) и 10% раствор лактозы (0,1 мл), затем к клеткам подавали 50% раствор сахарозы в качестве источника углерода. После инокуляции новой среды клетки встряхивали при 700 об/мин при 28°C в течение 72 ч. После денатурации и последующего центрифугирования супернатанты анализировали с помощью HPLC.

Для анализа общих образцов клеточный лизат, приготовленный кипячением, осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4700 об/мин. Концентрацию ОГМ в супернатанте определяли с помощью HPLC или HPAC.

### Выравнивание последовательности

Эвристическое парное выравнивание последовательностей, реализованное в BLAST 2.1.2 (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), выполняли для проверки гомологии последовательностей белков-транспортёров, упомянутых в настоящем изобретении. Все параметры сохраняли со значениями по умолчанию для каждого выравнивания BLAST.

### Результаты

Пример 1. Транспортёр Vag представляет собой новый переносчик ядра LNT-2 с высокой селективностью в отношении LNnT

В настоящем изобретении мы проверили способность выбранных гетерологичных переносчиков MFS экспортировать LNnT из клетки-хозяина, применяя эталонный штамм, а именно MP3672. Штамм имеет по одной PglP-управляемой копии каждой гетерологичной гликозилтрансферазы, необходимой для образования продукта.

Одна копия каждого из выбранных гетерологичных генов-транспортёров, т.е. *vag*, *yberC0001\_9420*, *marc*, *bad*, *пес*, *yabM* и *fred* (табл. 4), была индивидуально интегрирована в геном штамма MP3672 под контролем промотора P<sub>lac</sub>, который, как известно, обеспечивает умеренные уровни транскриптов. Сайт связывания рибосом промотора P<sub>lac</sub> (т.е. 16 п.н. выше сайта начала трансляции) был модифицирован (смотри табл. 5), для усиления связывания рибосом с синтезированными транскриптами и, таким образом, позитивного регулирования P<sub>lac</sub>-управляемой экспрессии на трансляционном уровне.

Следуя описанному выше подходу к конструированию штамма и тестируя эффективность штамма в DWA, мы сообщаем, что только Vag-экспрессирующие клетки, продуцирующие LNnT, демонстрируют относительно увеличение как оттока продуцируемого LNnT, так и общей продукции LNnT по сравнению с эталонным штаммом.

Как показано на фиг. 1A, P<sub>lac</sub>-управляемая экспрессия большинства генов-транспортёров (*marc*, *fred*, *bad*, *пес*, *yabM*, *yberC0001\_9420*) либо не оказывает существенного влияния, либо снижает продукцию LNnT (до 45%). Напротив, введение гена *vag* в генетический фон штамма MP3672 приводит к заметному увеличению титра LNnT (фиг. 1A).

Выравнивание аминокислотных последовательностей семи протестированных предполагаемых транспортёров MSF показало, что переносчик Vag имеет очень высокое покрытие последовательностей (от 99 до 100%) по сравнению с остальными шестью транспортёрами, протестированными в настоящем изобретении, с идентичностью последовательностей в диапазоне от 65 до 75%. Самая высокая идентичность последовательности (75%) была отмечена для последовательности Vag и последовательности транспортёра MFS, кодируемого геном *yabM* (табл. 7). Интересно, что транспортёр MFS YabM, описанный в WO 2017042382 как предполагаемый эффективный экспортёр LNT, не оказывал существенного влияния ни на конечный общий титр LNnT, ни на отток LNnT (фиг. 1A, 1B). Таким образом, вопреки его относительно высокому сходству белковой последовательности с Vag, транспортёры YabM, по видимому, неэффективны в отношении транспорта LNnT, что четко отражается в концентрациях продуктов, обнаруживаемых во внеклеточной фракции соответствующих культур клеток-хозяев (фиг. 1B). В особенности, как показал анализ супернатантов фракций бактериальных культур, внеклеточные концентрации LNnT были значительно выше для штамма MP3994 (клетки, экспрессирующие *vag*), чем для штаммов MP4362 (клетки, экспрессирующие *yabM*) и MP3672 (клетки сравнения, не экспрессирующие какой-либо гетерологичный транспортёр) (фиг. 1B).

Таблица 7. Гомология между различными гетерологичными транспортерами по настоящему изобретению

Название белка	Идентификация	Из организма	Идентичен Vag WP_048785139.1 (покрытие)
YberC0001_9420	EEQ08298.1 Суперсемейство основных посредников MFS 1	<i>Yersinia bercovieri</i>	68% (99%)
Fred	WP_087817556.1 транспортер MFS	<i>Yersinia frederiksenii</i>	69% (99%)
Bad	WP_017489914.1 транспортер MFS	<i>Rouxiiella badensis</i>	65% (99%)
Nec	WP_092672081.1 транспортер MFS	<i>Rosenbergiella nectarea</i>	66% (99%)
Marc	WP_060448169.1 транспортер MFS	<i>Serratia marcescens</i>	71% (99%)
YabM	CAU73138.1 Предполагаемый переносчик оттока сахаров MFS	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	75% (99%)

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что транспортер Vag представляет собой эффективный переносчик LNnT. Этот вывод основан как на результатах процедуры скрининга этих семи генов-транспортеров, геномно экспрессированных в одном и том же эталонном штамме, в тех же условиях культивирования и под контролем одного и того же промотора, Plac, так и на анализе последовательностей белков-транспортеров, который показал, что белки-транспортеры с относительно высокой гомологией с Vag, такие как YabM и Marc (75 и 71%), либо вообще не экспортируют LNnT, либо, если экспортируют, то с очень низкой эффективностью.

Пример 2. Конструирование *Escherichia coli* для производства LNnT с применением гена vag

Штаммы *Escherichia coli* K-12 (DH1) MDO можно изменять для экспрессии представляющих интерес гетерологичных генов. Например, штамм MP3020 представляет собой штамм-продуцент LNnT со сверхэкспрессией гена  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы и гена  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазы, выбранных из неограничивающих примеров табл. 1.

Как показал HPLC-анализ всех образцов, вставка экспрессионной кассеты, содержащей промоторный элемент PglpF или Plac, связанный с геном vag, в хромосомную ДНК штамма MP3020 в единственной копии для получения штаммов MP4064 и MP4065 соответственно (табл. 2), привела к i) более высоким общим титрам LNnT, ii) аналогичным или немного более высоким общим концентрациям LNT-2 и iii) аналогичному или значительно более низкому общему образованию rLNnH (фиг. 2). По-видимому, уровень экспрессии гена-транспортера оказывает влияние на образование побочных продуктов у штаммов-продуцентов LNnT: Plac-управляемая экспрессия (относительно умеренная) гена vag оказывала положительное влияние на общий титр LNnT, который сопровождался незначительным увеличением общих титров rLNnH, но не LNT-2. PglpF-управляемая экспрессия (относительно высокая) гена vag также приводила к более высокому титру LNnT, чем эталонный штамм, но этот штамм (MP4064) показал несколько более высокие общие титры LNT-2 и заметно снизил общее образование rLNnH (фиг. 2).

Однако значительное влияние введения гена vag в штамм-продуцент LNnT более четко проявляется при анализе образцов надосадочной жидкости. Концентрация LNnT в супернатантной фракции культур штаммов MP4064 и MP4065 была повышена более чем в 2 раза по сравнению с таковой, измеренной в среде культур MP3020 (фиг. 2). Хотя в клетках, экспрессирующих транспортер, не наблюдается значительно более высоких общих титров LNT-2, LNT-2 во фракции супернатанта, по-видимому, выше у штаммов MP4064 и MP4065, чем у штамма MP3020. Как упоминалось выше, образование rLNnH либо слегка повышено у штамма MP4065, либо заметно снижено у штамма MP4064. Интересно, что rLNnH обнаруживается только в осадке клеток обоих штаммов MP4064 и MP4065, что свидетельствует о том, что экспрессия переносчика Vag не влияет на экспорт продуцируемых rLNnH (фиг. 2).

Пример 3. Конструирование *Escherichia coli* для производства LNT с применением гена vag

Штаммы *Escherichia coli* K-12 (DH1) MDO можно изменять для экспрессии представляющих интерес гетерологичных генов. Например, штамм MP4473 представляет собой штамм-продуцент LNT со сверхэкспрессией гена  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы и гена  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазы, выбранных из табл. 1.

Как показал HPLC-анализ всех образцов, вставка экспрессионной кассеты, содержащей промоторный элемент (PglpF), связанный с геном vag, в хромосомную ДНК штамма MP4473 в единственном экземпляре для получения штамма MP4546 (табл. 2), привела к: i) увеличению общего титра LNT (общая концентрация LNT почти на 50% выше, чем у эталонного штамма), ii) примерно 6-кратному увеличению общей концентрации LNT-2 и iii) примерно в 2,5 раза более высокому общему образованию rLNnH-II (фиг. 3).

В соответствии с вышеизложенными наблюдениями анализ образцов супернатантов показал, что концентрация LNT в супернатантной фракции культур штамма MP4546 заметно повышена по сравнению с таковой, измеренной в среде культур MP4473 (фиг. 3). Гораздо более высокий общий титр LNT-2, из-

меренный в *vag*-экспрессирующих клетках, сопровождается 5-кратно более высокой концентрацией LNT-2, обнаруженной во фракции супернатантов культур MP4546. Напротив, продуцируемый рLNH-II, по-видимому, находится исключительно в клеточном осадке штамма MP4546, возможно, из-за того, что *Vag* обладает либо низкой субстратной специфичностью к рLNH-II, либо вообще не обладает ею, либо он не способен транспортировать крупные сахара, такие как гексозахариды (фиг. 3). Это "отсутствие возможностей" кажется выгодным, поскольку оно позволяет упростить последующую обработку рLNH-II, продуцируемого клетками, экспрессирующими *vag*, поскольку несколько различных ОГМ, продуцируемых в ходе одной ферментации, могут быть отделены от смеси ОГМ на самом первом этапе процедуры очистки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированная клетка, способная продуцировать один или несколько олигосахаридов грудного молока (ОГМ), где указанная клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-транспортер MFS с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его функциональный гомолог, аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере на 85% последовательности SEQ ID NO: 1.

2. Генетически модифицированная клетка по п.1, где олигосахарид выбирают из 2'-фукозиллактозы (2'FL), 3'-фукозиллактозы (3FL), дифукозиллактозы (DFL), 3'-сиаиллактозы (3'SL), 6'-сиаиллактозы (6'SL), лакто-N-триозы-2 (LNT-2), лакто-N-неотетраозы (LNnT), лакто-N-тетраозы (LNT), лакто-N-фукопентаозы I (LNFP-I), лакто-N-фукопентаозы II (LNFP-II), лакто-N-фукопентаозы III (LNFP-III), лакто-N-фукопентаозы IV (LNFP-IV) и лакто-N-фукопентаозы V (LNFP-V) и/или пара-лакто-N-неогексаозы (рLNnH).

3. Генетически модифицированная клетка по любому из предшествующих пунктов, где генетически модифицированная клетка представляет собой *Escherichia coli*.

4. Генетически модифицированная клетка по любому из предшествующих пунктов, где генетически модифицированная клетка дополнительно содержит по меньшей мере одну рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует функциональный фермент с гликозилтрансферазной активностью, выбранный из группы, состоящей из  $\alpha$ -1,2-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,3-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,3/4-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -1,4-фукозилтрансферазы,  $\alpha$ -2,3-сиаилтрансферазы,  $\alpha$ -2,6-сиаилтрансферазы,  $\beta$ -1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы,  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы,  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазы и  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы.

5. Генетически модифицированная клетка по любому из предшествующих пунктов, где клетка дополнительно включает последовательность рекомбинантной ДНК, содержащую регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

6. Генетически модифицированная клетка по п.5, где регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой промоторный элемент, выбранный из /ас-промотора или *glp*-промотора.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-транспортер MFS с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его функциональный гомолог, имеющая более чем 85% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок последовательности SEQ ID NO: 1, имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую регуляторный элемент.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.7, где регуляторный элемент регулирует экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.7, 8, где регуляторный элемент для регуляции экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой элемент экспрессии, выбранный из *lac*-промотора или *glp*-промотора.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.7 или 8, где конструкция нуклеиновой кислоты является частью векторной ДНК или кассеты/картриджа экспрессии, интегрированной в геном клетки-хозяина.

11. Способ получения одного или нескольких олигосахаридов, включающий стадии:

(i) обеспечение генетически модифицированной клетки, способной продуцировать ОГМ, по любому из пп.1-6;

(ii) культивирование клетки в соответствии с (i) в подходящей среде для культивирования клеток для экспрессии указанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты;

(iii) сбор одного или нескольких ОГМ, полученных на этапе (ii).

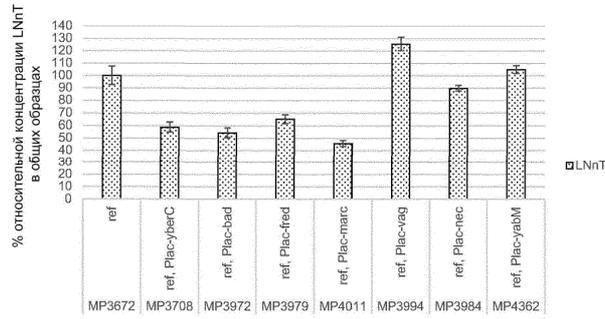
12. Способ по п.11, где полученный ОГМ собирают из среды культивирования и микробной биомассы, образующейся в процессе культивирования.

13. Применение генетически модифицированной клетки по любому из пп.1-6 или конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.7-10 для получения одного или нескольких олигосахаридов грудного

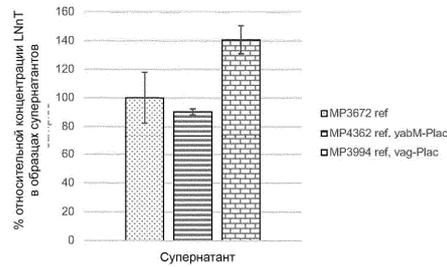
молока (ОГМ).

14. Применение по п.13, где ОГМ выбран из группы, состоящей из 2'-FL, 3-FL, DLF, LNT, LNT-II, LNnT, pLNH-II и pLNnH.

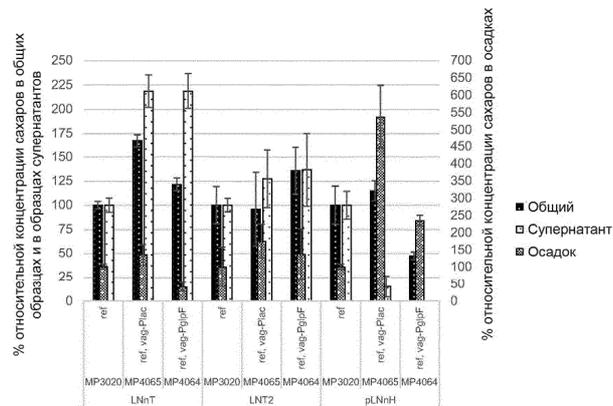
15. Применение по п.14, где ОГМ, выбран из группы, состоящей из LNT, LNT-II, LNnT, а также pLNH-II и pLNnH.



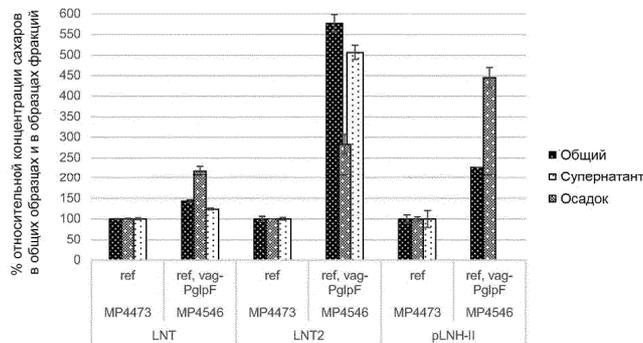
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3

SEQ ID NO: 1

MKSLLTRKRRINPVFLAFMAASFMIQVAGALQAPTLSLFLTREVQARPLWVGLFFTV  
NAIAGIVVSMVLAKRSDSRGDRRTLILFCCAMAFCNALLFAFTRHYLTLITLGVLLSAL  
ASVSMPQIFALAREYADQSAREAVMFSSVMRAQLSLAWVIGPPLSFALALNFGFVT  
LFLVAAALFLVCILLIKFTLPSVPRAEPLMRSGGMPLSGWRDRDVRLLFIASVTMWT  
CNTMYIIDMPYISVTLGLPEKLAGLLMGTAAGLEIPVMLLAGHYAKRVGKRNMLIA  
VAAGVLFYAGLAMFASQTALMALQLFNVAFIGIAGIGMLWFQDLMPGRPGAATTMF  
TNSISTGMILAGVIQGTLSERFGHIAVYWLALGLAVAAFAMSARVKNV

Фиг. 4

