



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 260 768**

51 Int. Cl.:
C12P 19/28 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96900106 .4**
86 Fecha de presentación : **02.01.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0799318**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.1997**

54 Título: **Métodos para modificar restos de hidratos de carbono.**

30 Prioridad: **30.12.1994 US 366800**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2006

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2006

73 Titular/es: **AB Enzymes GmbH**
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Maras, Marleen y**
Contreras, Roland

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 260 768 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para modificar restos de hidratos de carbono.

5 La invención se refiere a un procedimiento para convertir modelos de glucosilación en proteínas y proteínas producidas por recombinación, especialmente proteínas terapéuticas, que tienen un modelo híbrido o complejo. El procedimiento implica cultivar un hongo filamentoso o una levadura para producir una glucoproteína del tipo rica en manosa que es un sustrato aceptor para GlcNacTrI. El procedimiento también implica hacer reaccionar una glucoproteína del tipo rica en manosa con una α -1,2-manosidasa y GlcNac TrI en una levadura u hongo filamentoso para producir una
10 glucoproteína híbrida.

La glucosilación afecta a muchas propiedades de una glucoproteína, incluyendo el plegamiento apropiado de la proteína, la sensibilidad/resistencia a proteasa, el tráfico intracelular y la compartimentalización, la secreción, las asociaciones inter e intramoleculares, las afinidades intermoleculares, la selección de diana tisular y la semivida biológica. Los modelos de glucosilación también alteran de manera significativa la actividad, solubilidad, aclaramiento, agregación intermolecular y antigenicidad biológicas, especialmente de aquellas proteínas que se administran terapéuticamente *in vivo*.
15

En las patentes de los EE.UU. 5.324.663 y 5.272.066 se describen métodos de síntesis para modificar estructuras de oligosacáridos en glucoproteínas.
20

La producción recombinante de muchas proteínas puede alterar mucho su modelo de glucosilación. Las proteínas expresadas en bacterias están completamente sin glucosilar. Los modelos de glucosilación de la levadura de panadería no son equivalentes a los homólogos mamíferos y son muy antigénicos en mamíferos (Ballou, C. E., 1982. En Strathern, J. N. *et al.* (eds). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Metabolism and Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, págs. 335-360).
25

De manera similar, se observan restos de glucosilo no complejos cuando se utilizan células de insecto, tales como el popular sistema de expresión de baculovirus Sf9, para expresar proteínas de mamífero (Davidson *et al.*, *Biochemistry*, 29:2828-2838 (1990); Bahl, O. P. *et al.*, en *Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates - Structure and Function*, D. D. Roberts *et al.*, eds., Academic Press, Inc. 1993 págs. 245-270). Se sintetizan oligosacáridos híbridos y ricos en manosa (Man) en proteínas producidas en células de insecto. Las estructuras primarias de estos glucanos no son diferentes de las encontradas en ciertas proteínas de mamífero tales como ribonucleasa B, tiroglobina, activador tisular de plasminógeno (este último tiene en sus sitios de glucosilación una población mixta de estructuras complejas y ricas en manosa).
30
35

Los cultivos pequeños de células de mamífero son prácticos para el uso en experimentos de expresión génica de mamíferos en laboratorio. Sin embargo, el coste y las dificultades para expresar grandes cantidades de glucoproteínas recombinantes terapéuticas en cultivos de células de mamífero son prohibitivos. Por lo tanto, se necesita un huésped que pueda producir grandes cantidades de proteínas recombinantes y que posea, o pueda modificarse para que posea, un modelo de glucosilación que sea similar al producido por las células de mamífero.
40

Los hongos filamentosos, por ejemplo *Trichoderma*, tienen ciertas ventajas como huéspedes recombinantes. Es fácil hacer crecer grandes cantidades de estos hongos y tienen la capacidad de glucosilar y secretar de manera eficaz grandes producciones de proteínas recombinantes de mamífero hacia el medio, haciendo relativamente fácil el aislamiento. Además, el modelo de glucosilación en tales proteínas es más similar a los humanos que el de la levadura de panadería. Sin embargo, todavía hay diferencias, lo que coloca a los modelos de glucosilación fúngica de tipo natural en una desventaja estructural y funcional cuando la eficacia *in vivo* de una proteína requiere un tipo específico de glucosilación. Por ejemplo, los residuos terminales de ácido siálico son importantes en el funcionamiento de una proteína en un sistema de mamífero, ya que impiden el aclaramiento de la glucoproteína desde el torrente sanguíneo del mamífero. Se cree que el mecanismo detrás del aumento de la semivida biológica de moléculas sialiladas está en su menor reconocimiento por parte de lectinas (Drickamer, K., *J. Biol. Chem.* 263:9557-9560 (1988)). Sin embargo, las células fúngicas no pueden añadir tales unidades. Las glucoproteínas sintetizadas en células fúngicas no tienen siálico.
45
50
55

Otra desventaja presentada por la incapacidad de generar restos de glucoproteína complejos está en la presencia de residuos terminales de manosa. Las glucoproteínas que terminan en residuos de manosa son ligandos para proteínas que se unen a manosa en macrófagos y células del sistema reticuloendotelial (Ezekowitz *et al.*, *J. Cell Sci. Suppl.* 9:121-133 (1988)). Mientras esto puede ser útil en algunos casos limitados, en lo que respecta a fines de selección de diana, esto tiene una consecuencia farmacológica indeseable para la mayoría de proteínas recombinantes - por ejemplo, el rápido aclaramiento del compuesto desde la sangre. El rápido aclaramiento puede afectar de manera deletérea a la farmacocinética del agente administrado y disminuir su potencial terapéutico y aumentar su toxicidad. Por tanto, los modelos de glucosilación no complejos producidos por recombinación dificultan el uso de glucoproteínas obtenidas por recombinación para uso terapéutico humano (Sareneva, T. *et al.*, *Interferon Res.* 13:267-269 (1993)).
60
65

Estas desventajas puede bloquear la utilidad biológica o farmacológica de las proteínas mamíferas generadas utilizando sistemas de transformación final. Por tanto, en la industria de glucoproteínas se ha sentido desde hace tiempo

ES 2 260 768 T3

una necesidad de proporcionar modelos de glucosilación de tipo complejo o híbrido en glucoproteínas en huéspedes fúngicos, que pueden modificarse *in vivo* y/o *in vitro*, lo que les permite producir modelos de glucosilación similares a los encontrados en proteínas de eucariotas superiores.

5 Reconociendo la necesidad de una producción económica a gran escala de proteínas recombinantes que tienen un modelo de glucosilación mamífero, los inventores han investigado el tratamiento de residuo glucosilo en células de mamífero y fúngicas. Estos estudios han conducido al descubrimiento de que hongos filamentosos tales como *Trichoderma* pueden secretar una proteína deseada en forma de precursor inmaduro glucosilado que puede tratarse *in vitro* hasta un modelo de glucosilación mamífero de tipo híbrido. Este descubrimiento ha dado como resultado
10 el desarrollo de métodos para preparar modelos de glucosilación de proteína complejos e híbridos, similares a los encontrados en huéspedes mamíferos.

Por consiguiente, en una primera realización, se modifica secuencialmente el modelo de glucosilación de una proteína glucosilada deseada (glucoproteína) mediante la reacción con N-acetilglucosaminil-transferasa I (GlcNAc Tr I), galactosiltransferasa y sialiltransferasa, de modo que se produce una proteína que tiene un modelo de glucosilación
15 de tipo complejo o híbrido con ácido(s) siálico(s) terminal(es) similar al de las células de mamífero.

Por consiguiente, en una realización adicional, se modifica secuencialmente el modelo de glucosilación de una proteína glucosilada deseada en una levadura u hongo filamentosos con α -1,2-manosidasa, para mejorar la reacción con GlcNAc Tr I, galactosiltransferasa y sialiltransferasa, de modo que se produce un modelo de glucosilación de tipo
20 híbrido con un residuo(s) ácido(s) siálico(s) terminal(es) similar al de células de mamífero.

Por consiguiente, en una realización adicional, glucoproteínas del tipo ricas en manosa se expresan en, y preferiblemente se secretan a partir de, un huésped fúngico filamentosos que se ha transformado con GlcNAc Tr I, y se modifican mediante reacción secuencial con galactosiltransferasa y sialiltransferasa de modo que se produce un
25 modelo de glucosilación de tipo híbrido con un ácido siálico terminal, una estructura similar a la de las células de mamífero.

Por consiguiente, en una realización adicional, se modifica el patrón de glucosilación de la proteína glucosilada deseada producida en un huésped fúngico, tal como levadura u hongo filamentosos, preferiblemente *Trichoderma* o *Aspergillus*, que se ha transformado con α -1,2-manosidasa y/o GlcNAc Tr I, haciendo reaccionar manera secuencial una proteína de este tipo con GlcNAc Tr I, si fuera necesario, y con galactosiltransferasa y sialiltransferasa, de modo que se produce una proteína que tiene un modelo de glucosilación de tipo híbrido con una estructura de ácido siálico
30 terminal similar a la de células de mamífero.

Por consiguiente, en una realización adicional, se produce la forma glucosilada inmadura de una glucoproteína de tipo rica en manosa en un huésped fúngico, tal como una levadura u hongo filamentosos, preferiblemente *Trichoderma* o *Aspergillus*, que se ha transformado con un gen recombinante que codifica para α -1,2-manosidasa y/o GlcNAc Tr I, preferiblemente GlcNAc Tr I humana, y se modifica adicionalmente mediante una reacción *in vitro* con manosidasa no específica, de modo que se produce una proteína que tiene un modelo de glucosilación mono-antenal en una etapa
35 *in vitro*.

Por consiguiente, en una realización adicional, se convierte cualquiera de las proteínas anteriores que tienen un modelo de glucosilación de tipo híbrido a un modelo complejo mediante reacciones con α -1,2-; α -1,3-; y/o α -1,6-
40 manosidasa.

Figura 1. La figura 1 es un diagrama que ilustra la conversión de oligosacáridos ricos en manosa (estructuras de glucosilo) en oligosacáridos híbridos tras la reacción con estructuras ricas en manosa con α -1,2-manosidasa, GlcNAc Tr I, β -1,4 galactosiltransferasa (mostrada como GalTr), y α -2,6 sialiltransferasa (mostrada como NeuNAc T). La conversión de oligosacáridos ricos en manosa de glucoproteína fúngica (estructura glucosiladas) en estructuras híbridas se produce como resultado de esta serie ilustrada de reacciones.
50

Figura 1A. La figura 1A es un diagrama que ilustra la conversión de oligosacáridos híbridos (estructuras de glucosilo) en oligosacáridos de tipo complejo tras la reacción de estructuras híbridas con una α -manosidasa inespecífica (no específica).
55

Figura 2. La figura 2 muestra un mapa del plásmido pCAGGS. Las principales divisiones son de longitudes de 1.000 pb, las subdivisiones son de longitudes de 200 bases. La longitud es de aproximadamente 4.811 pb. Promotor híbrido de AG: β -actina/ β -globina; SVORI: origen bidireccional de SV40; RBS: sitio de unión de ribosoma del operón *lac*, poliA: señal poli A de la región temprana (flecha en sentido horario) o región tardía (flecha en sentido antihorario) de SV40; Ori: origen de Eco-pMBI o replicación del plásmido; AMP: gen de resistencia a ampicilina; CMV: potenciador de CMV-IE; lac: promotor lac; rGBf (bases de plásmido 10 - 182): región sin traducir parcial del exón 3 y 3' y sitio poli A del gen de β -globina de conejo; 3FR (bases de plásmido 183 - 541): región flanqueante en 3' del gen de β -globina de conejo.
60
65

Figura 3. La figura 3 muestra un mapa del plásmido pscgal1mf3. Las principales divisiones son de longitudes de 500 pb, las subdivisiones son de longitudes de 100 bases. La longitud es de aproximadamente 3.477 pb. AMP: gen de resistencia a ampicilina; ORI: origen de replicación de plásmido (Eco-pMBI) lac: promotor lac; RBS: sitio de unión

ES 2 260 768 T3

de ribosoma del operón *lac*, GAL1: promotor Gal1, PREMF: secuencia prepro de factor 1 de apareamiento α ; lacZ: gen de LacZ α .

Figura 4. La figura 4 muestra un mapa del plásmido pCAMFhGNTIF₁, que contiene un fragmento de gen humano que codifica para la N-acetilglucosaminiltransferasa I (hGlcNAc-Tr I). Las principales divisiones son de longitudes de 1.000 pb, las subdivisiones son de longitudes de 200 bases. La longitud es de aproximadamente 6.223 pb. AMP: gen de resistencia a ampicilina; ORI: origen replicación del plásmido (Eco-pmbi); lac: promotor lac; RBS: sitio de unión de ribosoma del operón lac; PREMF: secuencia prepro de factor 1 de apareamiento α ; rGBf (bases de plásmido 1 - 170): región sin traducir parcial del exón 3 y 3' y sitio poli A del gen de β -globina de conejo; 3FR (bases de plásmido 171 - 530): región flanqueante en 3' del gen de β -globina de conejo; SVORI: origen bidireccional de replicación de SV40; poli A: señal de poli A de la región temprana (flecha en sentido horario) o tardía (flecha en sentido antihorario) de SV40; CMV: potenciador de CMV-IE; Ac: promotor de β -actina de pollo.

Las figuras 4A, 4B, 4C y 4D muestran la construcción secuencial de pCAMFhGNTIf₁. Todas las abreviaturas son como anteriormente. La figura 4A esquematiza la inserción del fragmento hGNTI en pUC18; la figura 4B esquematiza la extracción del fragmento GAL1-PREMF de pSCGAL1MF3 y su inserción en pUC18; la figura 4C esquematiza la construcción del plásmido puc18 que contiene la secuencia hGNTI (sin su secuencia señal) tras la secuencia señal de PREMF; y la figura 4D esquematiza la construcción final de pCAMFhGNTIf₁ mediante la inserción del fragmento PREMF-hGNTI que se había tomado del vector construido en la figura 4C en pCAGGS.

Figura 5. La figura 5 muestra un autorradiograma que se obtuvo tras la exposición de una película de rayos X a glucoproteínas radiomarcadas que se habían separado en una electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se añadieron los siguientes sustratos de GlcNAc Tr I como se observa: banda 1, sin proteína de sustrato añadida; banda 2, transferrina humana añadida como control negativo; banda 3, invertasa de *S. cerevisiae* añadida como control negativo; banda 4, ovoalbúmina añadida como control positivo; banda 5, celulasas de *Trichoderma*; banda 6, proteínas secretadas a partir del mutante RUTC 30 de *T. reesei*.

Figura 6. La figura 6 muestra un autorradiograma que se obtuvo tras la exposición de una película de rayos X a estructuras de oligosacáridos radiomarcados que se habían separado en una placa de cromatografía en capa fina (CCF). Se añadió lo siguiente a la mezcla de reacción que contiene GlcNAc Tr I: banda I, sin oligosacáridos añadidos a la reacción; bandas 2 y 3, se hicieron reaccionar oligosacáridos ricos en manosa a partir de hidrazinólisis de ribonucleasa B, Oxford Glycosystems, (banda 2), y, Man₅Gn a partir de la orina de manosidosis, Sanbio, (banda 3), como controles positivos; banda 4, oligosacáridos aislados de celulasas de *Trichoderma*; banda 5, oligosacáridos aislados de proteínas secretadas a partir del mutante RUTC 30 de *T. reesei*; banda 6, estructuras de glucosilo liberadas a partir de la invertasa de *S. cerevisiae* como control negativo.

Figura 7. La figura 7 muestra un autorradiograma que se obtuvo tras la exposición de una película de rayos X a glucoproteínas radiomarcadas que se habían separado en SDS-PAGE al 12,5%. Banda 1, se muestra la incorporación de 2-desoxi-2-N-acetilamino-D-glucosa radiactiva (GlcNAc) en CBH I; banda 2, se muestra un claro desplazamiento electroforético de CBH I que fue la consecuencia de la incorporación de ácido siálico radiactivo.

Figura 8. La figura 8 muestra la resolución electroforética de oligosacáridos de ANTS preparada a partir de glucoproteínas de *T. reesei* RUTC 30. Banda 1: el producto de digestión de CBH I; banda 2: oligosacáridos de CBH I tratados con α -1,2-manosidasa de *A. saitoi*; banda 3: producto de digestión a partir de una mezcla de proteínas secretadas por *T. reesei*; banda 4: análoga a la banda 3, pero con un tratamiento con α -1,2-manosidasa; banda 5: producto de digestión de ribonucleasa B bovina; M: marcadores de peso molecular (a: maltotetraosa; b: maltopentaosa; c: maltohexaosa; d: matoheptaosa; e: maltoctaosa; f: maltononaosa).

Figura 9. La figura 9 muestra un autorradiograma de un cromatograma en capa fina como anteriormente, que separa oligosacáridos libres pretratados con α -1,2-manosidasa y tratados posteriormente con GlcNAc Tr I y UDP-(¹⁴C)GlcNAc (uridina difosfo-2-desoxi-2-N-acetilamino-D-¹⁴C-glucosa). A las mezclas de reacción de GlcNAc Tr I, se añadió lo siguiente: banda 1, no se añadieron oligosacáridos; banda 2, se añadió Man₅GlcNAc (Sanbio), un sustrato aceptor para GlcNAc Tr I, como control positivo; bandas 3 y 4, respectivamente, oligosacáridos de invertasa de *S. cerevisiae* sin pretratar o pretratados con α -1,2-manosidasa; bandas 5 y 6, respectivamente, oligosacáridos a partir de celulasas de *Trichoderma* (Fluka, Buchs, Suiza) sin pretratar o pretratados con α -1,2-manosidasa; bandas 7 y 8, respectivamente, oligosacáridos a partir del mutante RUTC 30 de *T. reesei* sin pretratar y pretratados con α -1,2-manosidasa.

Figura 10. La figura 10 muestra un autorradiograma de glucoproteínas de separación en SDS-PAGE que se hicieron reaccionar con GlcNAc Tr I y UDP-(¹⁴C)GlcNAc, con o sin "pretratamiento" con α -1,2-manosidasa de *A. saitoi*. Bandas 1 y 2, respectivamente, sin sustrato aceptor de proteína sin y con tratamiento de α -1,2-manosidasa; bandas 3 y 4, respectivamente, transferrina sin y con pretratamiento con α -1,2-manosidasa; bandas 5 y 6, respectivamente, invertasa de *S. cerevisiae* sin y con pretratamiento con α -1,2-manosidasa; bandas 7 y 8, respectivamente, ovalbúmina sin y con pretratamiento con α -1,2-manosidasa; bandas 9 y 10, respectivamente, celulasas de *Trichoderma* (Fluka, Buchs, Suiza) sin y con pretratamiento con α -1,2-manosidasa.

Figura 11. La figura 11 muestra un autorradiograma de gel SDS-PAGE al 12,5% que contiene diversas proteínas que se hicieron reaccionar con GlcNAc Tr I y UDP-(¹⁴C)GlcNAc. La banda 1 es α -amilasa de *Aspergillus oryzae*. La

banda 2 es α -amilasa de *Aspergillus niger*. La banda 3 es ovalbúmina (control positivo). La banda 4 es ausencia de proteína (control negativo). La banda 6 es celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* RUTC 30 digerida por papaína. La banda 7 es una galactosidasa aislada a partir de *Aspergillus oryzae*. Los marcadores (M) son proteínas marcadoras marcadas con [^{14}C] de “arco iris” (“rainbow”) de Amersham, Buckinghamshire, RU.

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Figura 12. La figura 12 muestra un autorradiograma de un cromatograma en capa fina que demuestra la formación de estructuras híbridas en el nivel de oligosacárido. La banda 1 muestra *GlcNAc transferida a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ de ribonucleasa B. La banda 2 muestra *Gal unido a *GlcNAc en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ comercial. La banda 3 muestra *ácido siálico transferido a *Gal unido a *GlcNAc en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ comercial. Las bandas 4, 5 y 6 son análogas a las bandas 1, 2, y 3 respectivamente, pero los sustratos aceptores son N-glucanos liberados a partir de proteínas secretadas por *Trichoderma reesei* RUTC 30.

En la siguiente descripción, se hará referencia a diversas metodologías conocidas por los expertos en las técnicas de genética molecular, microbiología y biología general. Las publicaciones y otros materiales que exponen tales metodologías a los que se hace referencia se incorporan en el presente documento mediante referencia en su totalidad como si se expusieran a continuación al completo.

Principios generales de la biología de glucoproteínas y del análisis estructural de glucoproteínas se exponen, por ejemplo en *Glycoprotein Analysis in Biomedicine*, editado por E. F. Hounsell, Humana Press, Totowa, New Jersey (1993), y en *Cell Surface and Extracellular Glycoproteins, Structure and Function*, editado por D. D. Roberts y R. P. Mecham, Academic Press, Inc., San Diego, CA. (1993).

Principios generales de la bioquímica y biología molecular de hongos filamentosos y *Trichoderma* se exponen, por ejemplo, en Finkelstein, D.B. *et al.*, eds., *Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products*, Butterworth-Heinemann, editores, Stoneham, Mass. (1992), y Bennett, J. W. *et al.*, *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press - Harcourt Brace Jovanovich, editores, San Diego, CA. (1991).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado tal como los comprende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la descripción que sigue, se utilizan mucho varios términos utilizados en tecnología de glucoproteínas. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que ha de darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

“Modelo de glucosilación” se refiere a una estructura, número o situación característicos de estructuras de oligosacárido asociadas con una macromolécula, tal como una proteína, o habitual de un tipo celular específico o de una especie.

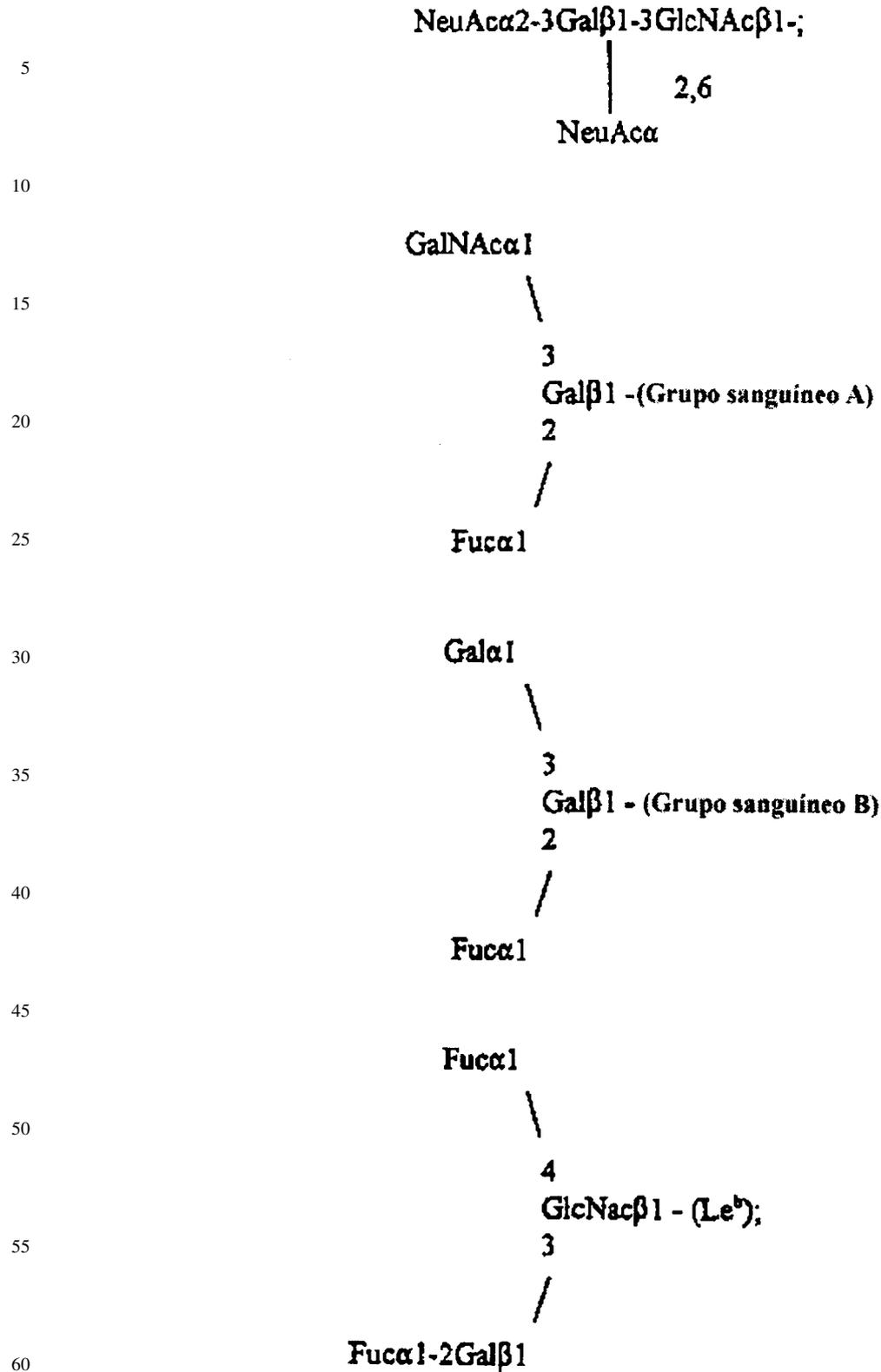
“Modelo de glucosilación de tipo natural” se refiere a una estructura, número o situación característicos naturales de estructuras de oligosacárido que se asocian con una macromolécula, tal como una proteína, o se encuentran en un tipo celular específico o de una especie.

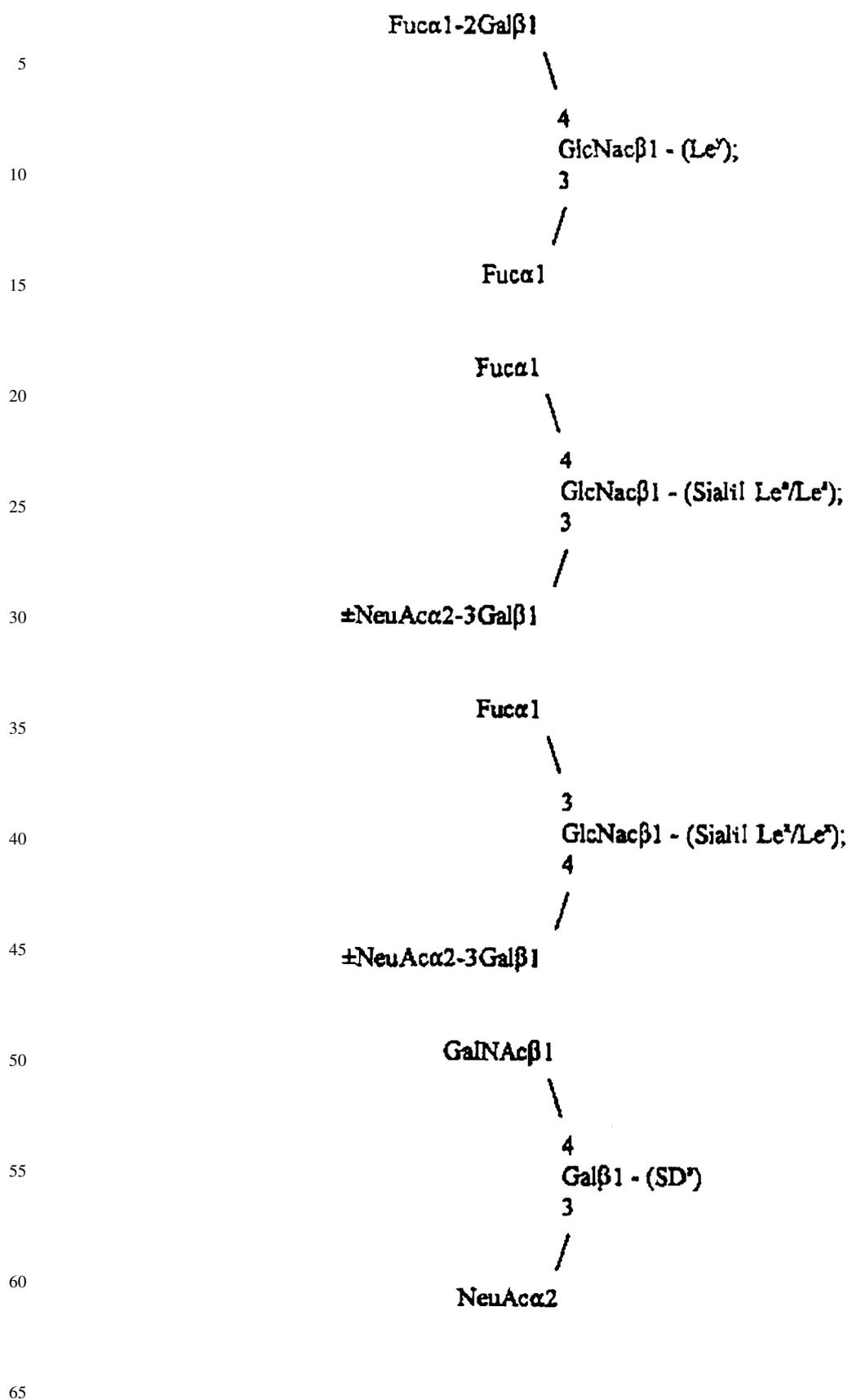
Oligosacáridos “unidos a O” son los oligosacáridos que se unen a la estructura peptídica a través de treonina o serina.

Oligosacáridos “unidos a N” son los oligosacáridos que se unen a la estructura peptídica a través de asparragina, mediante un enlace asparragina-N-acetilglucosamino. Los oligosacáridos unidos a N también se llaman “N-glucanos”. Todos los oligosacáridos unidos a N tienen un núcleo pentasacárido común de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ($\text{Manosa}_3\text{GlucosaNacetil}_2$) (la glucosa puede abreviarse como Glc y Gluc). Difieren en la presencia de, y en el número de ramificaciones (también llamadas antenas) de azúcares periféricos tales como fucosa y ácido siálico.

Los oligosacáridos unidos a N se clasifican según sus constituyentes ramificados. Si el constituyente ramificado sólo es manosa, el oligosacárido ha de ser “N-glucano rico en manosa”. Tal como se utiliza en el presente documento oligosacárido o estructura de glucosilo de “rica en manosa” o “de tipo rico en manosa” significa un oligosacárido con residuos adicionales de α -manosa unidos a la estructura externa de núcleo de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ y sin residuos de fucosa o ácido siálico en los extremos libres de las ramificaciones de oligosacárido.

Un oligosacárido o estructura de glucosilo “compleja” o “de tipo complejo” significa la estructura de un oligosacárido con, normalmente, de dos a seis ramificaciones externas con una secuencia de sialil-lactosamina unida a una estructura externa de núcleo de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Un N-glucano complejo tiene al menos una ramificación, y preferiblemente al menos dos, de residuos alternos de GlcNAc y galactosa (Gal) que terminan en oligosacáridos tales como, por ejemplo: NeuNAc-; NeuAc α 2-6GalNAc α 1-; NeuAc α 2-3Gal β 1-GalNAc α 1-; NeuAc α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc α 1-4Gal β 1- (sólo mucinas); Fuca1-2Gal β 1- (grupo sanguíneo H);





ES 2 260 768 T3

Pueden haber ésteres de sulfato en residuos de galactosa, GalNAc, y GlcNAc, y puede haber ésteres de fosfato en residuos de manosa. El NeuAc (Neu: ácido neuramínico; Ac: acetilo) puede O-acetilarse o reemplazarse por NeuGl (ácido N-glicolilneuramínico). N-glicanos complejos también pueden tener sustituciones intracatenarias de GlcNAc dividido en dos partes y fucosa de núcleo (Fuc).

Los “N-glicanos híbridos” sólo tienen residuos de manosa en la ramificación de Man α 1-6 del núcleo y una o más antenas complejas en la ramificación de Man α 1-3.

Un “sustrato aceptor” es un oligosacárido, cuya estructura específica la reconoce como sustrato una enzima, de manera que una reacción con una enzima como tal añade ciertos residuos de azúcar a dicho sustrato aceptor. Por ejemplo, el oligosacárido Man₅GlcNAc₂ es un sustrato aceptor para GlcNAc Tr I, la primera glucosiltransferasa implicada en formación de hidratos de carbono complejos.

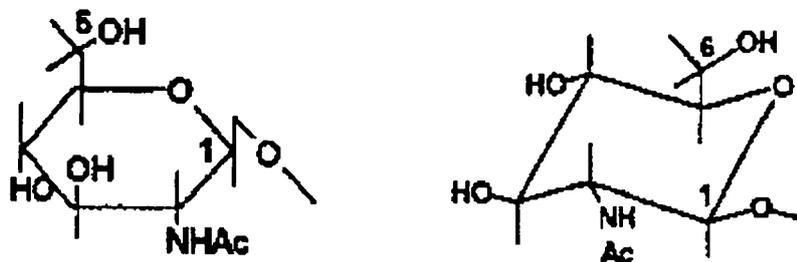
Por un modelo de glucosilación de un “precursor inmaduro” o estructura de N-glicano se entiende una estructura rica en manosa. Según la invención, pueden “madurarse” las estructuras “inmaduras” a una estructura de tipo complejo o híbrida mediante el tratamiento con enzimas que añaden las unidades apropiadas de los oligosacáridos de tipo complejo o híbridos, con o sin la eliminación de residuos de manosa según sea necesario.

Por “modificado secuencialmente” se entiende que se modifica enzimáticamente una estructura de oligosacárido (glucano) de manera ordenada, lo que supone dos o más reacciones enzimáticas de manera que al menos una reacción precede a la otra. A esto también se le denomina serie “en cascada” de reacciones enzimáticas.

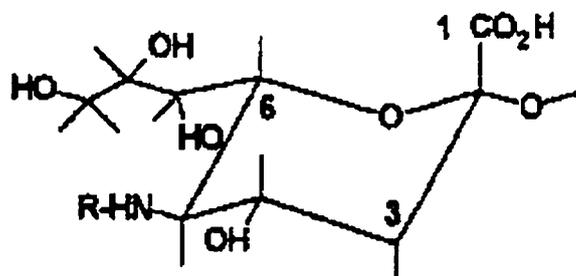
Por “hacer reaccionar una proteína con una enzima” se entiende que se proporciona la proteína en una mezcla de reacción que contiene todos los componentes requeridos para catalizar la actividad inherente a la enzima para modificar tal proteína.

La unión entre unidades de monosacárido en un glucano puede ser a cualquiera de los grupos hidroxilo, bien con una configuración anomérica β o bien α . Cuando se dibuja tal como se muestra a continuación (por ejemplo en el carbono 1 (“1” a continuación) de GlcNAc y ácido siálico), la configuración β o α se representa como una línea por encima o por debajo del plano del anillo de monosacárido, respectivamente.

La forma piranosa de β -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) es:



La estructura del ácido siálico es:



en la que R=CH₃-CO-(ácido N-acetilneuramínico)₃ o CHOH-CO-(N-ácido glicolilneuramínico); los grupos hidroxilo pueden sustituirse con diferentes sustituyentes acilo y aquellos en C8 y C9 con residuos adicionales de ácido siálico.

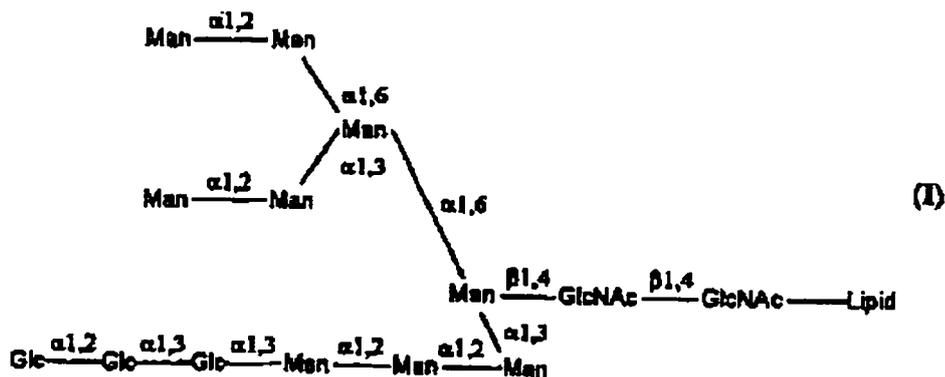
Ciertas abreviaturas se utilizan en el presente documento ya que son comunes en la técnica, tales como: “Ac” para acetilo; “glc” para glucosa; “fuc” para fucosa; “GlcNAc” para N-acetilglucosamina; “man” para manosa; “PNGasa F” para péptido-N-glicosidasa F (EC 3.2.2.18).

ES 2 260 768 T3

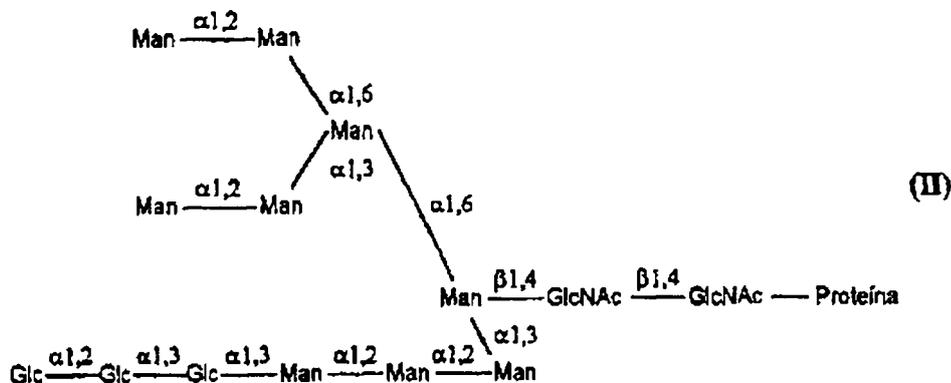
Tal como se utiliza en el presente documento, "GlcNAc Tr I" significa N-acetilglucosaminil-transferasa I.

En glucoproteínas, los sitios potenciales de N-glucosilación contienen la secuencia asparragina-X-serina (o treonina), en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Las proteínas pueden crearse para que contengan sitios artificiales de N-glucosilación, o puede utilizarse el sitio natural.

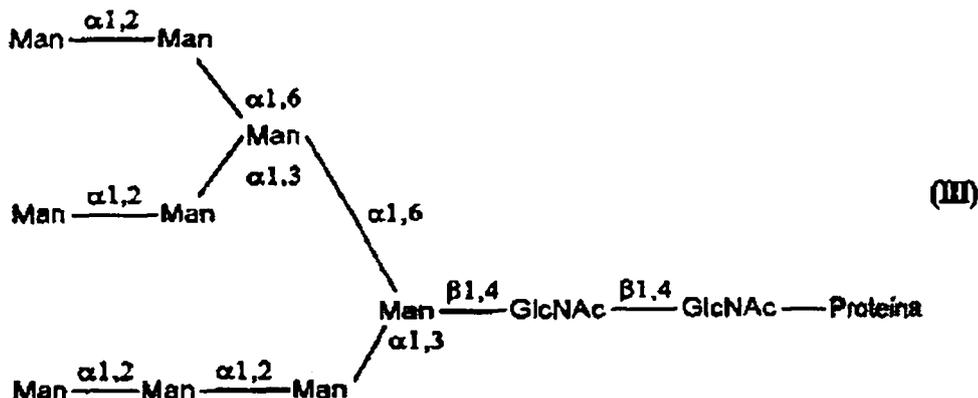
Los métodos de la invención se comprenderán mejor mediante la referencia a la ruta de glucosilación tal como se describe a continuación. Se cree que los acontecimientos tempranos de la síntesis de N-glucano que se efectúa en el retículo endoplásmico son idénticos en levaduras, plantas y eucariotas superiores y hongos. Normalmente, la ruta de N-glucosilación de proteínas en células eucariotas sigue este modelo. En primer lugar, un oligosacárido precursor unido a un lípido (I):



se transfiere desde el lípido y se le une una Asn en la proteína seleccionada como diana a través de la acción de una oligosacariltransferasa para formar (II):



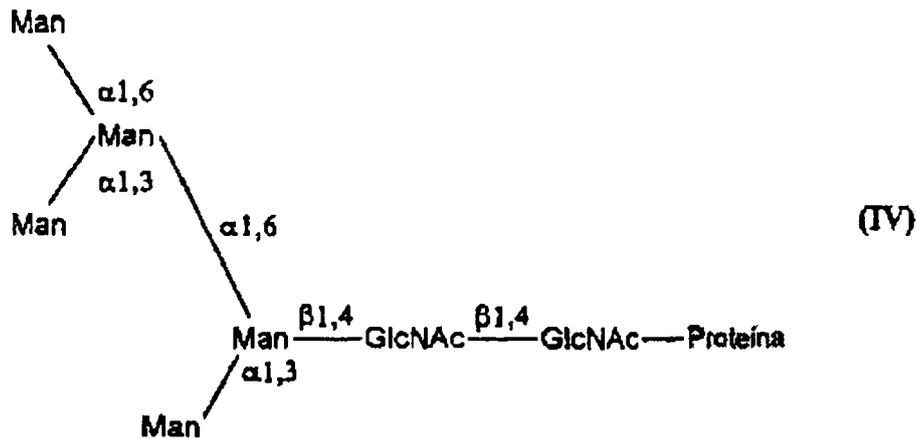
Esto también se abrevia: $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -proteína. Entonces la enzima α -1,2 glucosidasa I elimina el residuo terminal de glucosa, y la α -1,3 glucosidasa II elimina el segundo y el tercer residuos de glucosa para dejar (III):



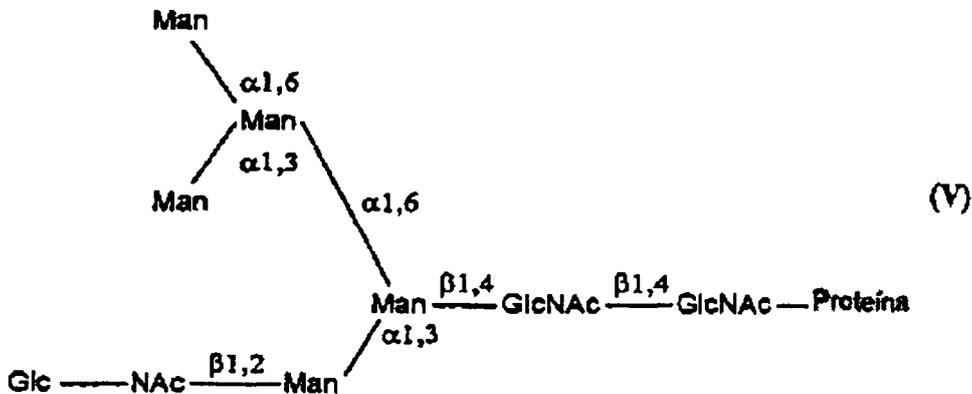
ES 2 260 768 T3

Esto es un ejemplo de una glucosilación “rica en manosa”. Esto también se abrevia: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -proteína.

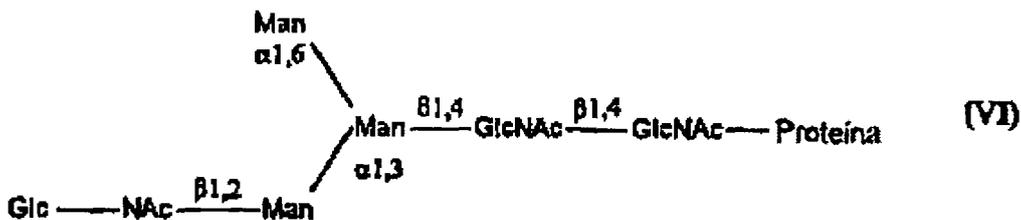
La etapa final en el retículo endoplásmico rugoso es la eliminación de un residuo de manosa. Las etapas restantes se llevan a cabo en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. Hasta este punto, la ruta de glucosilación tanto de las levaduras como de las células de mamífero es la misma. Sin embargo, las etapas en la Golgi-cis difieren entre las levaduras y los eucariotas superiores. La levadura añade manosas mediante la acción de manosiltransferasas, cuyo resultado es una glucosilación del tipo rica en manosa en el producto glucosilado. Sin embargo, los eucariotas superiores eliminan tres manosas adicionales, con α -manosidasa I; en algunos casos, este corte también tiene lugar en el RE. El resultado es el producto (IV):



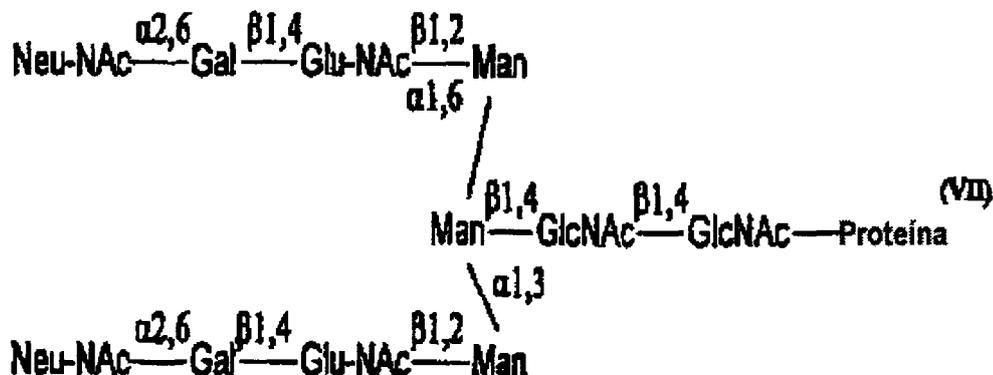
Ésta también es una estructura “rica en manosa” y se abrevia: $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína. El azúcar-nucleótido de alta energía, UDP-GlcNAc, sirve como un sustrato para GlcNAc Tr I para transferir un resto de GlcNAc a (IV) para producir (V):



Esta es una estructura de tipo híbrido y se abrevia: $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína. La α -manosidasa II reconoce este sustrato y elimina los residuos de manosa adicionales para dar como resultado la estructura de “tipo híbrido” (VI):



Esto se abrevia: GlcNacMan₃GlcNac₂-proteína. Ésta puede servir como un sustrato para cualquiera de UDP-GlcNac, UDP-Gal o CMP-ácido siálico (SA) y GlcNac-transferasa II, galactosiltransferasa o sialiltransferasa, respectivamente, para producir un modelo de glucosilación de “tipo complejo”, por ejemplo tal como se muestra a continuación (VII):



Las enzimas de modificación de la glucosilación que son útiles en los métodos de la invención incluyen transferasas y manosidasas. Los residuos de manosa que están unidos mediante un enlace α 1,2 son aquellos residuos de manosa que pueden eliminarse *in vivo* o *in vitro* mediante una α 1,2 manosidasa “específica”, tal como la de *Aspergillus saitoi*. La GlcNac Tr I es muy específica y sólo transfiere GlcNac a la manosa menos periférica unida por α 1,3 de una estructura de Man₅GlcNac₂ (un sustrato apropiado se muestra como la estructura IV, anteriormente). Tras la transferencia de GlcNac, galactosa y ácido siálico a Man₅GlcNac₂, pueden eliminarse los residuos de manosa unidos por α 1,3 y α 1,6 restantes *in vivo* o *in vitro* utilizando una manosidasa “inespecífica” tal como, por ejemplo, la manosidasa de la judía de caballo, convirtiendo así una estructura híbrida en una compleja.

Las transferasas tales como la GlcNacTr I, galactosiltransferasa y sialiltransferasa dadas como ejemplo en el presente documento, catalizan la transferencia de un monosacárido desde donante de azúcar de alta energía a un oligosacárido aceptor. La reacción generalizada es: azúcar-nucleótido + aceptor \rightarrow azúcar aceptor + nucleótido.

Para seguir la reacción *in vitro*, puede proporcionarse un azúcar-nucleótido en una forma que marcará al aceptor. Por ejemplo, la actividad específica de los azúcar-nucleótidos radiomarcados comerciales es suficientemente alta como para permitir la detección de fmoles de un sustrato aceptor en un ensayo radiomarcado.

Ni las glucosiltransferasas ni los sustratos de azúcar-nucleótido son permeables para las membranas celulares. Esto permite la alteración extracelular de la glucosilación de la superficie celular en células intactas o preparaciones de membrana sellada, utilizando el método de la invención en aquellas realizaciones en las que la reacción de GlcNac Tr I no se da dentro de la célula huésped.

La GlcNacTr I (EC 2.4.1.101) es la transferasa del Golgi medial que inicia la formación de hidratos de carbono complejos unidos a N. Esta enzima también se conoce como UDP-N-acetilglucosamina: α -3-D-manósido- β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I. Se ha clonado el gen humano que codifica para esta enzima y se ha publicado su secuencia codificante (Kumar, R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:9948-9952 (1990)). Otras fuentes de GlcNac Tr I incluyen al conejo (Sarkar, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:234-238 (1991)) y al ratón (Kumar, R. *et al.*, Glycobiology 2:383-393 (1992)).

Otras enzimas útiles en la construcción del oligosacárido híbrido, tal como se muestra en la figura 1, también están disponibles y se han clonado. Por ejemplo, una lista no limitante incluye β (1,4)galactosiltransferasa bovina (D'Agostaro, G. *et al.*, Eur. J. Biochem. 183:211-217 (1989)), β (1,4)galactosiltransferasa humana (Masri, K. A. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:657 (1988)), α (2,6)sialiltransferasa de rata (Wang, X. C. *et al.*, Glycobiology 1:25-31 (1990)), y α 1,2 manosidasas de conejo (Lal, A. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:9872-9881 (1994)) o con α 1-2 manosidasas de ratón (Herscovics, A. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:9864-9871 (1994)).

Para clonar una secuencia notificada, pueden diseñarse cebadores basándose en la secuencia notificada. Por ejemplo, pueden utilizarse cebadores tales como los de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 para amplificar la secuencia codificante para la GlcNac Tr I humana, por ejemplo, utilizando técnicas de PCR, de modo que se inserta dicha secuencia codificante en cualquier vector de elección, y preferiblemente un vector de expresión que pueda expresar tal secuencia codificante en un huésped deseado.

La enzima GlcNac Tr I no está glucosilada. Kumar, R. *et al.*, Glycobiology 2:383-393 (1992) han expresado la GlcNac Tr I de ratón. Es posible y útil expresar la GlcNac Tr I de ratón y humana intracelularmente en bacterias, pero puede formar agregados de proteína. Por esta razón, la producción intracelular en bacterias no es el método preferido

ES 2 260 768 T3

para la producción de GlcNAc Tr I. La enzima puede producirse en células de mamífero tales como células COS, puede secretarse hacia el medio, y utilizarse directamente en ese medio si se desea; debe observarse que el uso de la enzima en el medio de crecimiento utilizado es simplemente por conveniencia; el entorno del medio de crecimiento celular no es necesario *per se* para la actividad de la GlcNAc Tr I ya que la enzima producida en la bacteria era activa. También se conocen los métodos de aislamiento para la enzima a partir de hígado de conejo (Nishikawa, Y. *et al.*, J. Biol. Chem. 263:8270-8281 (1988)).

En los métodos de la invención, las reacciones de GlcNAcTr I preferiblemente se llevan a cabo a 37°C. Una unidad es la actividad enzimática que cataliza la transferencia de 1 μ mol de GlcNAc desde UDP-GlcNAc hasta Man₅GlcNAc en un minuto a 37°C y pH 6,1. Como se muestra en los ejemplos, se utilizaron 330 μ mol de sustrato aceptor y 340 μ mol de UDP-GlcNAc con 10-15 μ l de un sobrenadante de COS concentrado en diez veces (que contiene aproximadamente 30 microunidades de GlcNAc Tr I) en una mezcla de reacción con un volumen final de 30 μ l. Una unidad de actividad enzimática convierte 1 μ mol de sustrato en un minuto. Los tiempos de reacción variarán dependiendo de la concentración y la actividad específica de la enzima, pero generalmente de 5-10 horas, y como se muestra en los ejemplos, de 1-4 horas, son suficientes para los fines de los métodos de la invención. La reacción de GlcNAc Tr I puede llevarse a cabo durante más tiempo según se aumenta la escala de la reacción (Ichikawa *et al.*, Anal. Biochem. 202:215-238 (1992)).

No es necesario que las enzimas sean puras para ser útiles, tal como se muestra en los ejemplos utilizando el medio de células COS como una fuente de GlcNAc Tr I. Sin embargo, puede lograrse un aislamiento a gran escala de glucosiltransferasas utilizando adsorbentes de afinidad por nucleótidos, tal como se conoce en la técnica. Puede modificarse la glucosiltransferasa mediante la adición de una etiqueta de afinidad (tal como una etiqueta de estreptavidina o una cola de histidina) con el fin de potenciar la purificación y reducir los costes de purificación.

La β -1,4 galactosiltransferasa, EC 2.4.1.38, tal como la de la leche humana que se muestra en los ejemplos del presente documento, está comercialmente disponible de Boehringer Mannheim (Nº de catálogo 1088-696), y Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. Su purificación a partir de leche bovina la notificó Barker, R. *et al.*, J. Biol. Chem. 247:7135 (1972). En la presencia de α -lactoalbúmina, EC 2.4.1.38 se convierte en EC 2.4.1.22, lactosa sintetasa (también conocida como lactosa sintasa y UDP-D-galactosa: D-glucosa 4 β -galactosiltransferasa), y acepta glucosa como un sustrato para la transferencia de galactosa para producir lactosa (Yoon *et al.*, Glycobiology 2:161-168 (1992)). Esta enzima está comercialmente disponible de Sigma y Oxford Glycosystems. También es fácil purificar (Barker, R. *et al.*, J. Biol. Chem. 247:7135 (1972)). Puede utilizarse la galactosiltransferasa bovina de la misma manera y en las mismas condiciones de reacción que las de la humana. La β -1,4 galactosiltransferasa clonada se ha expresado en diversos sistemas (véase, Masibay, A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5733-5737 (1989), Aoki, D. *et al.*, EMBO J. 9:3171 (1990) y Krezdorn, C. *et al.*, Eur. J. Biochem. 212:113-120 (1993)).

Las condiciones de reacción enzimática de β -1,4 galactosiltransferasa, EC 2.4.1.38 se conocen en la técnica (Parchment, R. E. *et al.*, Anal. Biochem. 154:460-469 (1986); Nunez, H. y Barker, R., Biochemistry 19:489-495 (1980)). La enzima requiere un pH de 8-8,5 y manganeso 1-50 mM, preferiblemente 20 mM, para una actividad enzimática óptima. Preferiblemente, las reacciones se llevan a cabo a 37°C, con aproximadamente 65 mU de enzima y 5 μ mol de UDP-galactosa por ml. Una unidad de actividad enzimática es la actividad enzimática que cataliza la transferencia de 1 μ mol de galactosa desde UDP-galactosa hasta glucosa en la presencia de α -lactoalbúmina, en 1 minuto a 37°C y pH 8,4. Sin embargo, para una galactosiltransferasa comercialmente disponible (5,5 unidades por mg), en ausencia de α -lactoalbúmina y con GlcNAc como sustrato, puede reducirse la actividad enzimática, por ejemplo, a aproximadamente 3,5 U/mg. Los tiempos de reacción variarán dependiendo de la concentración y actividad específica de la enzima, pero generalmente de 6-10 horas para pequeña escala, y, como se muestra en los ejemplos, 8 horas, son suficientes para los fines de los métodos de la invención. Pueden ser necesarios tiempos más largos según se aumenta la escala de la reacción.

La α -2,6 sialiltransferasa, EC 2.4.99.1, tal como la del hígado de rata que se muestra en los ejemplos del presente documento, está comercialmente disponible de Boehringer Mannheim (Nº de catálogo 981-583), y Genzyme, Calbiochem y Sigma. Su purificación la notificó Weinstein, J. *et al.*, J. Biol. Chem. 257:13.835-13.844 (1982). La enzima también se conoce como CMP-acetilneuraminita: β -D-galactosil-1,4-N-acetil- β -D-glucosamina α -2,6-N-acetilneuraminiltransferasa. La K_m para el donante de azúcar CMP-NeuAc es 8,5 x 10⁻⁵ M. La secuencia del aceptor es Gal β 1, 4GlcNAcR. Se conocen los métodos de purificación para sialiltransferasas que participan en la síntesis de N-glucosilo (Weinstein, J. *et al.*, J. Biol. Chem. 262:17735-17743 (1987)). Se ha notificado la producción recombinante de sialiltransferasas en células CHO y COS de mamífero (Schachter, H. *et al.*, en "Molecular Glycobiology," Fukuda, M. *et al.*, eds., IRL Press, págs. 88-162 (1994). La clonación de la α -2,6 sialiltransferasa humana se notificó en Grundmann, U. *et al.*, Nucleic Acids Res. 18:667 (1990).

Una unidad de α -2,6 sialiltransferasa transferirá 1 μ mol de ácido N-acetilneuramínico desde el ácido CMP-N-acetilneuramínico a asialo- α ₁-glucoproteína en 1 minuto a 37°C (Weinstein, J. *et al.*, J. Biol. Chem. 257:13835-13844 (1982)). La enzima requiere un pH de 6-6,5 para una actividad óptima, y generalmente se añade 50 mM de NaCl al ensayo para estabilizar la actividad enzimática. Preferiblemente las reacciones se llevan a cabo a 37°C, con aproximadamente de 4-40 mU de enzima, 0,5-5 μ mol de CMP-NANA por ml (se utilizaron 100-800 μ g de proteína aceptora por ml en las realizaciones mostradas como ejemplo), y preferiblemente 3,6 μ mol. Los tiempos de reacción variarán dependiendo de la concentración y actividad específica de la enzima, pero generalmente de 6-10 horas para síntesis a pequeña escala, y tiempos más largos para la aplicación a gran escala, son suficientes para los fines de los métodos de la invención.

ES 2 260 768 T3

La α -1,2 manosidasa (EC 3.2.1.24), tal como la del *Aspergillus saitoi* que se muestra en los ejemplos del presente documento, está comercialmente disponible de Oxford Glycosystems, Oxford, RU. Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que liberará un μmol de manosa a partir del manano de la levadura de panadería por minuto a pH 5,0 y 37°C. En las realizaciones mostradas como ejemplo, se utilizaron 6 μ unidades de enzima para tratar hasta 500 μg de proteína en un volumen final de 30 μl , y se utilizaron 2 μ unidades de enzima para tratar aproximadamente 5 μg de oligosacáridos de ribonucleasa B bovina (Oxford GlycoSystems, N° de cat. RP-2500) en 10 μl de volumen final. Preferiblemente el pH es de aproximadamente 5,0 para la actividad óptima de la enzima de *A. saitoi*. Preferiblemente las reacciones se llevaron a cabo a 37°C.

Los métodos para la detección de los productos de estas reacciones son bien conocidos y se muestran en los ejemplos del presente documento.

Según la invención, puede efectuarse la modificación de glucoproteínas *in vitro* mediante enzimas modificadoras de hidratos de carbono descritas anteriormente que pueden sintetizar o modificar las estructuras de glucosilación. Las glucoproteínas sintetizadas por levaduras, hongos filamentosos y células de insectos, pueden ser estructural y funcionalmente distintas a las estructuras de hidrato de carbono de tipo mamífero a la hora de tener un carácter de tipo híbrido o rico en manosa. Sin embargo, tal como se realiza en esta invención, estas estructuras de oligosacárido rico en manosa pueden convertirse enzimáticamente en una estructura compleja o híbrida, haciendo que la estructura de hidrato de carbono de la proteína producida en levadura, hongo o insecto sea más similar a, o idéntica a, la estructura de hidrato de carbono producida en mamífero.

Sorprendentemente se ha descubierto que los hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Trichoderma*, al contrario que las levaduras, sintetizan glucoproteínas en una forma que es reconocible como un sustrato aceptor para la enzima N-acetilglucosaminil transferasa I (GlcNAc Tr I), especialmente GlcNAc Tr I humana. Esta forma es una forma "inmadura" de mamífero.

Sin embargo, la GlcNAc Tr I no está presente de forma natural en estos huéspedes. Según la invención, el hallazgo anterior se explota de tal manera que el modelo de glucosilación de una glucoproteína deseada, por ejemplo, una proteína recombinante que se produjo en *Trichoderma*, que tiene una estructura que sirve como sustrato aceptor para GlcNAc Tr I, por ejemplo, la fórmula (IV) anterior, se modifica mediante una cascada de reacciones secuenciales, por ejemplo tres reacciones secuenciales con las siguientes enzimas: en primer lugar, GlcNAc Tr I; en segundo lugar, β -1,4 galactosiltransferasa; y en tercer lugar, α -2,6 sialiltransferasa. El resultado de esta cascada es la producción de una glucoproteína que tiene al menos un modelo de glucosilación híbrido, y, cuando se modifican todas las ramificaciones terminales, un modelo de glucosilación de tipo complejo. Preferiblemente, tales ramificaciones terminan con unidades de ácido siálico terminal, similar a las de las células de mamífero, aunque, según se desee pueden utilizarse otras unidades terminales, tal como las descritas anteriormente.

Tal como se describe a continuación, puede prepararse un huésped recombinante de manera que la primera reacción, la de la GlcNAc Tr I, se lleve a cabo *in vivo*, en el huésped, antes de la secreción de la proteína.

Sorprendentemente también se ha hallado que el tratamiento de glucoproteínas que se han sintetizado por levaduras y *Trichoderma*, con α -1,2-manosidasa, de manera que se cortan (eliminan) los residuos de manosa de tal glucoproteína, proporciona (en el caso de la levadura) o potencia (en el caso de *Trichoderma*), sitios de sustrato aceptor para la acción enzimática de GlcNAc Tr I. Según los métodos de la invención, puede utilizarse una manosidasa para pretratar el sustrato aceptor antes de la reacción con GlcNAc Tr I, para crear, o si no potenciar la disponibilidad de sitios seleccionados como diana para la acción de GlcNAc Tr I sobre ese sustrato.

Por tanto, en una primera realización, se utiliza la actividad de GlcNAc Tr I para convertir un sustrato aceptor de un tipo rico en manosa en un tipo híbrido. Entonces el tipo híbrido puede convertirse en un tipo híbrido diferente, o, en un tipo complejo. En una realización muy preferida, la fuente del sustrato aceptor para GlcNAc Tr I es una glucoproteína que se ha producido en un hongo filamentosos, y especialmente en *Trichoderma*, y lo más especialmente en *T. reesei*.

No es necesario extraer de la mezcla el producto de cada reacción antes de empezar la reacción posterior. Las condiciones de pH y ensayo (tales como la adición de cationes divalentes) pueden ajustarse simplemente en el mismo recipiente para cada reacción posterior de manera que se minimiza la manipulación. Adicionalmente, puede utilizarse la tecnología de estado sólido para proporcionar las enzimas sobre un soporte sólido y simplemente hacer pasar el sustrato aceptor a través de tal soporte o puede utilizarse el soporte sólido en forma discontinua.

La fuente de glucoproteínas del sustrato aceptor puede ser producto de glucoproteína nativa o recombinante de cualquier huésped que proporciona tal glucoproteína en forma utilizable. Especialmente, la glucoproteína es un producto nativo o recombinante de hongos filamentosos, por ejemplo un miembro de los géneros *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Ceratocystis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Collectotrichum*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, y *Verticillium*. Lo más especialmente, es que el huésped sea un miembro de los géneros *Aspergillus* o *Trichoderma*.

Las especies de *Trichoderma* útiles como huéspedes para la producción de aceptores sustrato de GlcNAc Tr I incluyen *T. reesei*, tal como QM6a, ALKO2442 o CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO

ES 2 260 768 T3

Box 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos, o, ATCC13631 (Colección americana de cultivos tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 10852, EE.UU., tipo); *T. viridae* (tal como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum*, tal como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tal como MUCL19358; Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain; *T. saturnisporum* CBS330.70 (tipo); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgatum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Lo más preferiblemente es que el huésped sea *T. reesei* y especialmente las cepas de *T. reesei* QM9414 (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765), y mutantes altamente productivos como VTT-D-79125, que se deriva de QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlandia). La transformación de *Trichoderma* puede llevarse a cabo por cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo la técnica que se enseña en la solicitud de patente europea EP 244.234.

Especies preferidas de *Aspergillus* que son huéspedes útiles en los métodos de la invención incluyen *A. nidulans*, *A. awamori* y *A. niger*. Se conocen los métodos para la transformación de *Aspergillus*.

Tal como se describe a continuación, cuando se pretratan *in vitro* con α 1,2 manosidasa, son huéspedes útiles levaduras tales como *Pichia spp.* (especialmente *Pichia pastoris*), *Hansenula spp.* (especialmente *Hansenula polymorpha*), *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, o *S. cerevisiae* para expresar el gen de interés. Las levaduras serían útiles como huésped para expresar la enzima GlcNAc TrI clonada ya que no está glucosilada.

En una realización, el sustrato aceptor de glucoproteína se secreta hacia el medio de crecimiento del huésped de producción y se modifica *in vitro* mediante la acción de enzimas tales como GlcNAc Tr I sin eliminarse de ese medio. Si se desea, puede concentrarse el medio antes de la modificación enzimática del producto génico de interés. Alternativamente, puede proporcionarse el sustrato aceptor de glucoproteína a la GlcNAc Tr I en forma purificada o aislada.

En una realización preferida de la invención, se transforma la secuencia codificante para GlcNAc Tr I en una célula huésped deseada de la que también se desea sintetizar la proteína de interés, especialmente, una célula huésped que no cataliza de manera natural las modificaciones enzimáticas según los métodos de la invención.

En esta realización, la primera etapa en la modificación del modelo de glucosilación, la reacción catalizada por GlcNAc Tr I se efectúa *in vivo*. Entonces la célula huésped sintetiza, y preferiblemente secreta, un sustrato aceptor de tipo híbrido. Entonces, el tipo híbrido se convierte en un tipo híbrido que contiene ácidos siálicos terminales mediante la segunda y la tercera etapa de la cascada *in vitro*, es decir, la adición de residuos de galactosa con β -1,4 galactosiltransferasa, seguido de la adición de residuos de ácido siálico con α -2,6-sialiltransferasa.

Preferiblemente, el huésped recombinante que se transforma con ambas secuencias codificantes para GlcNAc Tr I y, si se desea, con la secuencia codificante para una proteína de interés (cuyo modelo de glucosilación ha de modificarse *in vivo* mediante la acción de la GlcNAc Tr I expresada). Más preferiblemente, el huésped recombinantes es un miembro de los géneros *Aspergillus* o *Trichoderma* tal como se describió anteriormente.

El huésped recombinante también puede transformarse con ADN que comprende el gen de α -1,2-manosidasa. En las realizaciones de esta invención, puede transformarse el huésped recombinante con el gen de la α -1,2-manosidasa junto con las secuencias codificantes para GlcNAc Tr I y, si se desea, la secuencia codificante para una proteína de interés. En otras realizaciones de esta invención, se transforma el huésped recombinante con el gen de α -1,2-manosidasa solo, o, si se desea, la secuencia codificante para la proteína de interés.

Se sabe que los sistemas de vector son útiles en la transformación de huéspedes, especialmente los huéspedes de *Aspergillus* o *Trichoderma* descritos anteriormente para la producción de GlcNAc Tr I y las glucoproteínas de la invención. Puede utilizarse un vector separado para proporcionar el marcador seleccionable.

La expresión de genes en un huésped requiere el uso de regiones reguladoras funcionales en tales huéspedes. Pueden emplearse una gran variedad de secuencias reguladores de transcripción y traducción; generalmente los hongos filamentosos tales como *Trichoderma* reconocen los controles de transcripción del huésped eucariota, tales como, por ejemplo, los de otros hongos filamentosos, y especialmente, *Aspergillus*.

En una realización preferida, se construyen transformantes genéticamente estables de *Trichoderma* mediante los cuales se integra ADN que codifica para una glucoproteína deseada o una enzima que modifica hidratos de carbono como GlcNAc Tr I dentro del cromosoma huésped de *Trichoderma*. La secuencia codificante para la glucoproteína o enzima deseadas puede ser de cualquier fuente. Tal integración puede darse de novo dentro de la célula o, en una realización más preferida, puede asistirse mediante la transformación con un vector que se inserta funcionalmente él mismo dentro del cromosoma del huésped, por ejemplo, elementos de ADN que promueven la integración de secuencias de ADN en los cromosomas.

Tras la introducción del vector, se cultivan células receptoras en un medio selectivo, que selecciona para el crecimiento de células transformadas. La expresión de la(s) secuencia(s) génica(s) clonada(s) da como resultado la producción de la glucoproteína y/o la enzima modificadora de hidratos de carbono deseada, o la producción de fragmentos deseados de las mismas. Esta expresión puede tener lugar de manera continua en las células transformadas, o de manera controlada, por ejemplo, en la que la expresión es el resultado de un promotor regulado.

En una realización preferida, se secreta una enzima modificadora de hidratos de carbono o una glucoproteína deseadas hacia el medio de alrededor debido a la presencia de una secuencia señal de secreción funcional, preferiblemente una señal homóloga a la del huésped. Si un gen deseado no codifica para una secuencia señal, o si su secuencia señal no funciona bien en el huésped, entonces puede unirse operativamente la secuencia que codifica para la glucoproteína a otra secuencia señal, bien homóloga o heteróloga para el huésped, que funcione en tal huésped. La secuencia codificante deseada puede unirse a cualquier secuencia señal lo que permitirá la secreción de la glucoproteína desde el huésped seleccionado, por ejemplo, para la secreción desde *Trichoderma*, puede utilizarse la secuencia señal de las enzimas celulasas de *Trichoderma*, por ejemplo, puede utilizarse la señal de secreción de la proteína celobiohidrolasa I (CBHI), celobiohidrolasa II (CBHII), endoglucanasa I (EGI) o endoglucanasa II (EGII). También son útiles las señales de secreción de la xilanasas de *Trichoderma*. Pueden diseñarse tales secuencias señal con o sin sitios específicos de proteasa de manera que la secuencia de péptido señal puede eliminarse posteriormente.

En las realizaciones en las que se proporciona GlcNAc Tr I intracelularmente dentro de la célula huésped fúngica de manera que actúe intracelularmente sobre un sustrato, no es necesario, y no es preferible, secretar GlcNAc Tr I producida por recombinación hacia el medio, ya que es necesario que permanezca en la célula huésped para que sea activa *in vivo* en esas realizaciones.

Trichoderma es un huésped especialmente útil y práctico para la síntesis de glucoproteínas de la invención porque *Trichoderma* puede secretar proteína en grandes cantidades, por ejemplo, se han notificado medios de cultivo de concentraciones tan altas como 40 g/l; los promotores homólogos de celulasa y hemicelulasa tales como los promotores de *Trichoderma cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl1* proporcionan promotores muy convenientes para la expresión alta de genes de interés ya que son promotores fuertes. Por ejemplo, el promotor *cbh1* es un promotor de copia única que normalmente dirige la síntesis de hasta el 60% de la proteína secretada desde el huésped *Trichoderma*. Alternativamente, puede insertarse el gen de interés, o el gen de GlcNAc Tr I, en el locus CBHI. El sistema de transformación de *Trichoderma* es muy versátil y puede adaptarse para cualquier gen de interés. El cultivo de *Trichoderma* se apoya en la extensa experiencia previa en técnicas de fermentación a escala industrial, por ejemplo, véase Finkelstein, D. B. *et al.*, eds., *Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products*, Butterworth-Heinemann, editores, Stoneham, Mass. (1992).

Los métodos de la invención son útiles con cualquier proteína de interés deseada que contenga modelos de glucosilación del tipo rica en manosa. Se considera que tales modelos son “inmaduros” cuando se comparan con modelos complejos o híbridos.

Especialmente, una proteína de interés puede ser una proteína, tal como una inmunoglobulina u hormona, que ha de proporcionarse a un paciente que necesite la misma, especialmente por razones terapéuticas. Ejemplos de glucocoronas en los que la glucosilación desempeña un papel en las propiedades de tal hormona, especialmente en las propiedades terapéuticas, se incluye eritropoyetina (EPO), coriogonadotropina humana (HCG), folitropina (FSH), tirotropina (TSH) y lutropina (LH). Puede llevarse a cabo la modificación de cada subunidad peptídica según los métodos de la invención. Ejemplos de otras proteínas de interés cuya biosíntesis, transporte o función se altera mediante N-glucosilación incluyen NCAM (moléculas de adhesión neuronal), tenascina, trombospondina, fibronectina, hormonas, citocinas, (especialmente interleucina-4 e interferón gamma), factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, factores de coagulación, receptores solubles, inmunoglobulinas (anticuerpos), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular, glucoproteína gp120 del virus VIH, proteínas de la cubierta vírica, inmunoglobulina D, antitrombina III β , plasminógeno, factor de von Willebrand, fibrinógeno, globulina que se une a corticosteroides, globulina que se une a tiroxina, proteína que se une a folato, fibronectina, osteonectina ósea y plaquetaria, receptor de EGF, receptores de insulina y de factor de crecimiento similar a insulina I, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos básico, linfocitos CD2, moléculas de CMH de clase II, transportadores de glucosa, proteína eritrocitaria de banda 3, receptores β -2 adrenérgicos, receptor de transferrina, receptor de VIP (péptido intestinal vasoactivo), proteína de membrana de CMH de clase I, receptor de vasopresina de células LLC-PK1, receptor de lipoproteína de baja densidad, receptor de asialoglucoproteína, proteína CD4, receptor de tirotropina, receptor de PDGF, concanavalina A de judía de caballo, factor de veneno de cobra, lactotransferrina, factor de apareamiento de cloroplasto de la espinaca, mucina de la glándula submaxilar, lactasa-florizina hidrolasa del borde en cepillo intestinal, glucoproteína anticongelante del pez del ártico, receptor de LDL, glucoforina A, y β -HCG, y, generalmente, proteínas animales secretadas y glucoproteínas de plantas secretadas por células de sicomoro en cultivo. Especialmente, las proteínas que requieren la selección como diana de órganos o células específicas a través del reconocimiento azúcar-lectina son útiles como sustratos de proteína para la modificación de modelos de glucosilación según la invención.

El método de la invención es especialmente útil en el diseño de una proteína para uso en terapia genética; en una terapia como tal, una proteína, tal como una enzima, que es deficiente en una célula u órgano, está seleccionando como diana a tal célula u órgano proporcionando tal proteína con un modelo de glucosilación apropiado.

Según esta invención, se proporciona un método para producir altos niveles de glucoproteínas que son deseables para el uso, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas. Tales glucoproteínas pueden obtenerse directamente a partir de los huéspedes de la invención o del medio de cultivo. Además, si actividades deseadas están presentes en más de un huésped recombinante (tales como proteínas de subunidad múltiple), tales preparaciones pueden aislarse a partir de huéspedes apropiados y combinarse antes del uso en el método de la invención; alternativamente puede utilizarse un huésped para obtener todas las subunidades de la proteína deseada.

ES 2 260 768 T3

Para obtener las preparaciones de glucoproteína de esta invención, se cultivan los huéspedes recombinantes descritos anteriormente que tienen las propiedades deseadas (es decir, huéspedes que pueden expresar las glucoproteínas) en condiciones adecuadas, se secretan las glucoproteínas modificadas a partir de los huéspedes de *Trichoderma* hacia el medio de cultivo, y se recuperan las glucoproteínas a partir del medio de cultivo mediante métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, pero de manera menos deseable, pueden recuperarse las glucoproteínas a partir de las mismas células huésped.

Se recupera la glucoproteína a partir del medio de cultivo o de las mismas células huésped utilizando métodos habituales que se conocen bien en la técnica. Puede liofilizarse la glucoproteína de la invención o si no puede concentrarse y/o estabilizarse la glucoproteína para el almacenamiento. Las glucoproteínas de la invención son muy fáciles de proporcionar y utilizar. Si se secretan las glucoproteínas hacia el medio de cultivo, sólo se necesita recuperar el medio de cultivo para obtener la glucoproteína deseada, no se necesita extraer una glucoproteína a partir de los huéspedes de *Trichoderma* a no ser que se desee hacer así.

Si se desea, puede purificarse adicionalmente una glucoproteína expresada según las condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis, o similar.

Los métodos de la invención proporcionan la obtención de grupos glucosilo complejos o híbridos en glucoproteínas recombinantes para su uso como agentes farmacéuticos de una manera más segura y rentable que de la que se dispone actualmente. Los métodos de la invención proporcionan un beneficio importante porque dan como resultado la síntesis de estructuras de glucosilo uniformes y bien definidas. La producción de una única glucoforma puede ser crítica si se desea obtener perfiles farmacocinéticos terapéuticos uniformes.

Como entendería alguien con experiencia habitual en la técnica, pueden formularse las composiciones farmacéuticas de la presente invención según los métodos conocidos para preparar tales composiciones, mediante los cuales se combinan las glucoproteínas con oligosacáridos de tipo mamífero con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences de Remington* (ed. 18, Gennaro, A. R., ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990); véase especialmente la parte 4, "Testing and Analysis," págs. 435-602, y la parte 8, "Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture," págs. 1435-1712). Con el fin de formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para una administración eficaz, tales composiciones pueden contener adicionalmente una cantidad eficaz de sales, tampones, adyuvantes u otras sustancias que mejorarán la eficacia de la composición.

Pueden emplearse métodos farmacéuticos para controlar la duración de la acción. Pueden lograrse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o absorber las composiciones de esta invención, sus equivalentes, o sus derivados funcionales. Puede ejercerse la administración controlada mediante la selección de macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilenvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina) y la concentración de las macromoléculas así como los métodos de la incorporación con el fin de controlar la liberación. Otro método para controlar la liberación es incorporar las composiciones de la invención dentro de partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de acetato de etilenvinilo. Alternativamente, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas de administración coloidal de fármacos, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences de Remington*, citado anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para administración por vía oral, o por vía parenteral mediante inyección (por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), mediante infusión intravenosa u otra, mediante absorción nasofaríngea (vía intranasofaríngea), vía percutánea, vía rectal, vía ocular o vía sublingual. Las composiciones para administración por vía parenteral pueden incluir disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Pueden utilizarse vehículos, coadyuvantes o apósitos oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y potenciar la absorción. Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden comprender generalmente una disolución de liposoma que contiene la forma farmacéutica líquida. Las formas adecuadas para la suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, disoluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes que se utilizan habitualmente en la técnica, tales como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, tales composiciones también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes o de perfume.

En una realización, pueden formularse las composiciones farmacéuticas de la presente invención como una crema, una loción, una pomada, o similar, para la administración tópica a la piel. Tales composiciones pueden contener opcionalmente agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, o agentes colorantes o de perfume.

Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración la puede tolerar el receptor sin la producción de efectos secundarios graves. Se dice que un agente como tal se administra en una cantidad o concentración terapéuticamente "eficaz" si produce el (los) efecto(s) biológico(s) deseado(s).

ES 2 260 768 T3

Generalmente, la dosis que se necesita para proporcionar una cantidad o concentración eficaz de la composición puede ajustarla alguien experto en la técnica, tal como un médico, y variará dependiendo de factores tales como la vía de administración y la edad, el estado, el sexo y el grado de la enfermedad, si la hay, del receptor, y de otras variables.

5 El receptor de las proteínas modificadas según los métodos de la invención puede ser cualquier animal en el que se desee administrar tal proteína, incluyendo seres humanos, animales de zoo, animales de granja (bovinos, ovinos y similares), y mascotas (gatos, perros, pájaros, etc.).

10 La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos sólo muestran unas pocas aplicaciones concretas de la invención. El crear aplicaciones similares y realizaciones de las mismas es evidente en sí mismo para alguien experto en la técnica. Por tanto, los ejemplos no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención sino más bien sólo como una aclaración del uso de la invención.

Ejemplo 1

15

Preparación de glucoproteínas de Trichoderma reesei

Se obtuvieron las glucoproteínas a partir de la cepa mutante RUTC 30 de *T. reesei* tras el crecimiento en un medio mínimo para la inducción de celulasas (Uusitalo *et al.*, J. Biotechn. 17:35-50 (1991)). Como fuentes de carbono para el crecimiento, se añadieron lactosa o una combinación de lactosa/celulosa (concentración final del 2%). Se utilizó el método de Bradford, M. M. (Anal. Biochem. 72:248-254(1976)) para medir la concentración de las proteínas con inmunoglobulina G como patrón. Para los experimentos de glucosiltransferasa, se dializaron posteriormente las proteínas secretadas frente al tampón apropiado utilizado en el ensayo de glucosiltransferasa posterior. Fue posible un cambio rápido al nuevo tampón sin pérdida significativa de las proteínas cuando se usaron dispositivos de ultracentrifugación Microcon^{MR} (Amicon) (Blatt *et al.*, Anal. Biochem. 26:151-173 (1968)). Se obtuvo comercialmente una mezcla de celulasas a partir de una segunda cepa de *T. reesei* desconocida, de Fluka Chemie, Buchs, Suiza.

Ejemplo 2

30

Preparación de oligosacáridos

Se prepararon los oligosacáridos según un método descrito por Verostek *et al.* (Glycobiology 2:458 (Abstract 1.06) (1992)). Se liberaron oligosacáridos de las glucoproteínas (1 - 20 mg/ml) mediante PNGasa F recombinante (Tarentino *et al.*, Biochem. 24:4665-4671 (1985)) (Biolabs). Se disolvieron primero las glucoproteínas en fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5), 0,5% de SDS y 1% de β -mercaptoetanol, o en Tris- HCl 50 mM, pH 7,0. Entonces se desnaturalizaron las proteínas hirviendo durante 10 minutos. Se añadió el detergente no iónico Nonidet P-40^{MR} para evitar la inhibición de PNGasa F mediante SDS. Se incubó la mezcla de reacción con 1.000 unidades de PNGasa F a 37°C durante 18 horas. Tras el tratamiento con PNGasa F, se precipitaron las proteínas y los oligosacáridos añadiendo cuatro volúmenes de acetona a menos 20°C. Se desechó el sobrenadante que contenía un 80% de sal de acetona y SDS, y el sedimento se extrajo dos veces con metanol al 60% helado. Se eliminó el etanol de los sobrenadantes combinados tras la liofilización mediante evaporación. Se consiguió la purificación adicional de los oligosacáridos mediante pase a través de una columna Bio-Gel P2^{MR} (27 cm de altura, 0,5 cm de diámetro; obtenida de BIORAD). Se localizó la presencia de oligosacáridos en las diferentes fracciones recogidas por tinción con orcinol (Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier, Merck, pág. 91 (1980)). En una segunda serie, se hicieron pasar las fracciones combinadas que contienen oligosacáridos sobre una columna Bio-Gel P2^{MR} (Biorad) para obtener oligosacáridos que fueran suficientemente puros para utilizarlos en los ensayos de glucosiltransferasa.

Ejemplo 3

50

Amplificación de la secuencia de ADN genómico de GlcNAc Tr I

Se amplificó la región codificante del gen GlcNAc Tr I (N° de registro Genbank M55621; N° de registro EM-BL HSGLCNAC; Kumar *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9948-9952 (1990); todos incorporados en el presente documento mediante referencia) a partir de ADN genómico de carcinoma de colon utilizando PCR y se clonó posteriormente en el vector de expresión de mamíferos pCAGGS, que se describe con más detalle en la tabla 3 (figura 2 y descrito en Niwa *et al.*, Gene 108:193-200 (1991)). Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano DLD-1 como fuente de ADN genómico. Esta línea celular está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, (ATCC CCL 221) y se describe en Cancer Research 39:1020-1025 (1979)). El plásmido pCAGGS fue obsequio de J. Miyazaki, Univ. Tokio, Japón. El plásmido pCAGGS es útil para la expresión altamente eficaz de genes bajo el control del promotor híbrido β -actina/ β -globina y del potenciador CMV-IE en diversas células de mamíferos. El pCAGGS porta un promotor de β -actina de pollo modificado: la secuencia aceptora de empalme de la región de promotor de β -actina se sustituye por un fragmento de β -globina de conejo que contiene una parte en 3' del segundo intrón y una parte en 5' del tercer exón. El promotor híbrido de β -actina/ β -globina resultante se designa como el promotor "AG".

65

Se preparó ADN genómico a partir de células de colon, según el procedimiento descrito por Maniatis, T., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, Sambrook *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989. Se amplificó un fragmento de ADN genómico que representa la región codificante del gen GlcNAc Tr

ES 2 260 768 T3

I con polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) y un ciclador térmico de Pharmacia según las instrucciones del fabricante. El cebador de oligonucleótidos N-terminal consiste en la secuencia:

5'-CCAGGATGCTGAAGAAGCAGTCTGCA-3' (SEQ ID NO: 1).

5

El cebador de oligonucleótidos C-terminal consistió en la secuencia:

5'-CCAGTCGACAGGTGCTAATTCCAGCTAG-3' (SEQ ID NO: 2).

10 El protocolo de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 8 minutos a 96°C, seguido de una etapa de hibridación de 1 minuto a 65°C y finalmente un ciclo de polimerización de 4 minutos a 75°C. La amplificación se cambió luego a una desnaturalización de 1 minuto, hibridación de 1 minuto y polimerización de 4 minutos durante 24 ciclos adicionales.

15 Ejemplo 4

Subclonación de fragmentos generados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

20 Una fracción de los fragmentos de PCR tiene un único nucleótido de adenosina añadido al extremo 3' debido a la actividad transferasa terminal independiente del molde de la polimerasa de *Pyrococcus furiosus*. Se explotó esta actividad para clonar los fragmentos de ADN amplificado con la eficacia de la clonación de extremos cohesivos. Para hacer esto, se preparó el vector pUC18 (dentro de cuyo fragmento se uniría) tal como sigue. Se incubó el vector digerido con Hind-II de un μ g con 20 unidades de transferasa terminal y ddTTP 10 μ M en un volumen final de 30 μ l durante 1 hora a 37°C. Se utilizó ddTTP para garantizar la incorporación de sólo una timidina en los extremos 3'

25 del vector digerido como (Holton *et al.*, Nucleic Acids Research 19(5):1156 (1990)). Se purificaron el vector y los fragmentos de PCR utilizando el kit Gene Clean^{MR} de Pharmacia. Se ligó finalmente el fragmento (200 ng) codificante de GlcNAc Tr I amplificado en el vector pUC18 (40 ng) a 12°C durante 17 horas. La primera parte del gen (MLKKQ-SAGLVLWGAILFVAWNALLLFFWTRPAPGRPPSVS [SEQ ID NO: 3]) que codificaba para la secreción y para la retención en el compartimento de Golgi medial se sustituyó con una secuencia de nucleótido que codifica para la

30 secuencia señal "prepro" de secreción del factor de apareamiento de levadura. Se aisló esta secuencia de nucleótido a partir del plásmido pSCGAL1MF3 (catálogo de las Belgian Coordinated Collections of Microorganism (BCCM) (Colección Coordinada Belga de Microorganismos) de la colección de cultivos del Laboratorium voor Moleculaire Biologie Plasmidencollectie (LMBP) en la Universidad de Gent) tras la digestión con las enzimas de restricción Stu I y Xba I. (Los materiales enumerados tal como se obtuvieron del LMBP están disponibles para cualquiera que los solicite). La secuencia de nucleótidos del factor de apareamiento de levaduras que se utilizó es

35

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC
TCC

40

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser
Ser

45

GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
CAA

50

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala
Gln

55

ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
TTC

60

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp
Phe

65

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA
TTG

ES 2 260 768 T3

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu
Leu

5

TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG
GTA

10

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly
Val

15

TCT TTG GAT AAA AGG [Seq ID NO: 4]

Ser Leu Asp Lys Arg [Seq ID NO: 5]

20

En la figura 3 aparece un mapa de plásmido pSCGAL1MF3 y una descripción más detallada en la tabla 2.

Para obtener el plásmido pSCGAL1MF3, se abrió plásmido pSCGAL1MF2 (disponible de la colección de LMBP) con *AccI*, se rellenó con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se ligó. De esta manera, se pierden los sitios *HindIII* y *SallI* del poliligador (polilinker), se crea un sitio *NruI* en el poliligador, y el sitio *HindIII* dentro de la señal de secreción prepro del factor 1 de apareamiento α se convierte en único.

Se ligó el lado Stu I terminado en extremos romos a GlcNAc Tr I digerido con Eco 47III en el vector pUC18. Se aisló entonces la secuencia de nucleótidos codificante "prepro-GlcNAc Tr I" a partir del vector pUC18 mediante una digestión doble con Eco RI, *Hind III*. Posteriormente, se ligó un ligador (linker) de Eco RI al sitio *Hind III* terminado en extremos romos para permitir la inserción en el vector pCAGGS de mamíferos. Se realizó la clonación direccional con el vector y fragmento digeridos con Xba I, Eco RI.

En este casete de expresión, se sustituyó la primera parte del gen que codificaba para las señales de secreción y retención de Golgi, por una secuencia de nucleótidos que codificaba para la secuencia señal "prepro" de secreción del factor de apareamiento α de levadura (Burke *et al.*, J. Biol. Chem. 267:24433-24440 (1992); y Brake, A. J., en Yeast Genetic Engineering (Barr *et al.*, eds.), Butterworths Pub., Stoneham, MA (1989), págs. 269-280). El vector se denominó pCAMFhGNTIf1 (figura 4). Se representa un diagrama de su construcción en las figuras 4A, 4B, 4C y 4D y se describe con más detalle en la tabla 1. Fundamentalmente, se ligó el fragmento XbaI-StuI de pSCGAL1MF3 (anterior), que contenía la señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α al fragmento de vector *XbaI-Eco47III* de pUChGNTI. Debido a la actividad transferasa terminal independiente del molde de la polimerasa de *Pyrococcus furiosus*, una fracción de los fragmentos de PCR tiene un único nucleótido adenosina añadido al extremo 3'. Se explotó esta actividad para clonar los fragmentos de ADN amplificados con la eficacia de clonación en extremos cohesivos. Para hacer esto, se preparó el vector pUC18 aceptor como sigue: se incubó 1 μ g del vector digerido con *Hind II* con 20 unidades de transferasa terminal y ddTTP 10 μ M en un volumen final de 30 μ l durante 1 hora a 37°C (Holton y Graham, 1990). Se ligó el fragmento codificante de GlucNAc Tr I (200 ng) amplificado en el vector pUC18 (40 ng) tratado (Norlander *et al.*, Gene 26:101-106 (1983)) a 12°C durante 17 horas. Se digirió entonces este constructo intermedio con *HindIII* y *EcoRI*, se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se añadieron ligadores de *EcoRI* (5'-CGGAATTCCG-3'). Finalmente, se digirió este fragmento *EcoRI-EcoRI* con *XbaI* y *EcoRI* y se insertó el fragmento *XbaI-EcoRI* resultante en el vector pCAGGS digerido con *XbaI-EcoRI*. Este plásmido de expresión lleva una fusión de la señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α a la N-acetilglucosaminiltransferasa I que codifica para gen humano maduro (GlcNAc Tr I), codificado en la orientación sentido con respecto al promotor de β -actina de pollo que está precedido de la secuencia potenciadora CMV-IE. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del GlcNAc Tr I humano de EMBL con N° de registro M55621.

Tras la transfección transitoria del vector a células COS-7 (ATCC CRL-1651), se secretó eficazmente la enzima GlcNAc Tr I expresada en medio mínimo Dulbecco (medio Eagle modificado por Dulbecco, Dulbecco, R. *et al.*, Virol. 8:396 (1959); Smith, J. D. *et al.*, Virol. 12:185 (1960); Tissue Culture Standards Comm., *In Vitro* 6:2 y 93 e *In Vitro* 9:6). Se concentró en aproximadamente 10 veces el sobrenadante de COS y se utilizó en los ensayos de actividad GlcNAc Tr I. GlcNAc Tr I está enzimáticamente bien caracterizado y utiliza un oligosacárido Man₅GlcNAc₂ como un sustrato aceptor preferido (Nishikawa *et al.*, J. Biol. Chem. 263(17):8270-8281 (1988)). En general, se aceptan como sustratos para GlcNAc Tr I oligosacáridos con la fórmula común R1 α 1,6(Man α 1,3Man β 1,4GlcNAcR2), donde R1 es uno o más residuos de manosa unidos mediante enlaces α ; R2 puede ser β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Asn-X, β 1-4GlcNAc-Asn-X, β 1-4GlcNAc o H). Se incorporó un residuo de GlcNAc derivado de UDP-GlcNAc en el enlace β 1-2 al residuo de manosa unido en α -1,3 a Man β 1,4GlcNAcR2 (Schachter, H., Glycobiology 1(5):453-461 (1991)).

ES 2 260 768 T3

Ejemplo 5

El ensayo de GlcNAc Tr I

5 Se transfectaron el vector de mamíferos pCAGGS y las secuencias codificantes “prepro-GlcNAc Tr I” (pCAMFh GNTIf1) en células COS según el protocolo de McCutchan *et al.* (J. Nat. Cancer Inst. 41:351-357 (1968)). Se secretó GlcNAc Tr I en medio mínimo Dulbecco sin suero. Se concentró la enzima mediante ultrafiltración en microconcentradores centrífugos Centricon-30^{MR} (Amicon).

10 Se ensayó la actividad GlcNAc Tr I según un método descrito por Nishikawa *et al.* (J. Biol. Chem. 263(17):8270-8281 (1988)) tal como sigue. En un volumen total de 0,030 ml, se añadió lo siguiente: Man₅Gn 0,33 mM; ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,1 M (pH 6,1); MnCl₂ 20 mM; AMP 5 mM (como inhibidor de pirofosfatasa); GlcNAc 0,1 M (como inhibidor de β -N-acetilhexosa-aminidasa); 0,34 mmol de UDP-(¹⁴C)GlcNAc (Amersham); y 10 μ l de sobrenadante COS concentrado. La incubación fue a 37°C durante de 1 a 4 horas. Se separaron entonces 15 las proteínas de los oligosacáridos mediante precipitación mediante la adición de etanol helado al 100% hasta una concentración final del 66%.

Se separaron los oligosacáridos sobre placas de capa fina de alta resolución de sílice 60 utilizando un disolvente que contenía butanol/ácido acético/agua (20:10:10; v/v/v). Se desarrollaron las placas dos veces en el mismo disolvente (Vauhkonen *et al.*, Eur. J. Biochem. 152:43-50 (1985)). Se visualizaron los oligosacáridos radioactivos tras la 20 exposición de la placa de CCF a una película de rayos X durante varios días.

También se visualizaron los oligosacáridos mediante tinción con orcinol, tal como sigue. Se pulverizó una mezcla de 0,6% de orcinol en ácido sulfúrico al 10% y 0,1% de Fe(III)Cl₂ en la parte superior de la placa de CCF que se 25 calentó posteriormente hasta 100°C durante de 10 a 15 minutos.

En lugar de oligosacáridos, cuando se observaron, se añadieron glucoproteínas a la mezcla de reacción para GlcNAc Tr I. Se añadieron aproximadamente 10 μ g de glucoproteína (por ejemplo, ovoalbúmina) a la mezcla de reacción de 30 μ l. La incubación a 37°C fue durante un periodo de 6 a 18 horas. La incorporación de GlcNAc radioactivo dentro de las unidades de oligosacáridos sobre las proteínas, separadas sobre un gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli, U.K., Nature 227:680-685 (1970)), se visualizó mediante autorradiografía.

Ejemplo 6

35 *Tratamiento de galactosiltransferasa y sialiltransferasa*

Se realizaron modificaciones *in vitro* adicionales de glucoproteínas que llevan N-acetilglucosamina u oligosacáridos con β -1,4-galactosiltransferasa a partir de leche humana y con α -2,6-sialiltransferasa a partir de hígado de rata. Se obtuvieron ambas enzimas de Boehringer Mannheim.

40 Antes de realizar estas etapas de tratamiento, se purificó CBH I a partir de la mezcla de reacción de GlcNAc Tr I. Una descripción para la purificación de esta proteína está disponible en Shoemaker *et al.*, Bio/Technology 1:687-690 (1993). Brevemente, se pasó el medio celular COS por una columna de DEAE-sepharose que se había equilibrado en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5. Las celulasas (o CBH I solo) de *T. reesei* en una mezcla de reacción para el 45 tratamiento de GlcNAc Tr I se dializaron frente a un tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5. Luego, se separaron de las proteínas del sobrenadante de COS mediante purificación en una columna de DEAE Sepharose[®] (volumen: 0,5 ml, aproximadamente 1 cm de altura, 0,5 cm de diámetro, resina de flujo rápido, Pharmacia). Bajo estas condiciones se retuvo CBH I.

50 Un gradiente salino (cambiando la concentración de NaCl desde 0 hasta 0,1 M en 400 μ l de tampón de acetato de sodio, pH 5) eliminó una parte sustancial de las proteínas presentes en la mezcla de reacción para las glucosilaciones *in vitro*, y se retuvo CBH I en la columna. La concentración de sal se aumentó aún más hasta 0,2 M (en 800 μ l), y CBH I eluyó en NaCl 0,15 M o superior. La concentración de sal se aumentó aún más hasta 0,5 M (aplicando 800 μ l) con el fin de eluir tanto como fuera posible del CBH I de la columna. Se combinaron las fracciones que 55 contienen CBH I y se dializaron frente a un tampón Tris 50 mM, pH 8, y se concentraron en aproximadamente 10 veces, utilizando un dispositivo de ultracentrifugación Centricon (Amicon). Se añadió entonces CBH I a la mezcla de reacción para galactosiltransferasa: β -1,4-galactosiltransferasa requirió un pH de 8 - 8,5 y la presencia de manganeso para actividad específica óptima (Schanbacher *et al.*, J. Biol. Chem. 245:5057-5061 (1970); Yoon *et al.*, Glycobiology 2:161-168 (1992)). A las proteínas tratadas con GlcNAc Tr I u oligosacáridos se añadieron 0,17 μ mol de UDP (¹⁴C) 60 Gal (285 mCi/mmol) o UDP-Gal “frío”; 2 miliunidades de galactosiltransferasa; y MnCl₂ hasta una concentración final de 20 mM en un volumen final de 0,030 ml. Se realizó la galactosilación a 37°C durante aproximadamente 8 horas.

La α -2,6-sialiltransferasa requirió un pH de 6 - 6,5 para la actividad óptima (Weinstein *et al.*, J. Biol. Chem. 257:13845-13853 (1982)). A la mezcla de reacción de galactosiltransferasa se añadieron los siguientes: 0,18 μ mol de CMP(¹⁴C)NANA (281 mCi/mmol) (Amersham) hasta una concentración final de 6 mM; 2 miliunidades de α -2,6-sialiltransferasa; y NaCl (para estabilizar la sialiltransferasa, concentración final: 50 mM). Se ajustó el pH a 6 - 6,5 mediante la adición de MES 1 M. El volumen final de la mezcla de reacción fue 0,050 ml. Se incubó la mezcla de 65

ES 2 260 768 T3

reacción a 37°C durante 8 horas. Se visualizó la incorporación de residuos de azúcar radioactivos en las glucoproteínas tal como se describió anteriormente.

5 También se realizaron modificaciones *in vitro* de ribonucleasa B glucosilada, obtenida de Oxford Glycosystems. Se incubó la ribonucleasa B glucosilada con GlcNAc Tr I, tal como se describe en el ejemplo 5. El producto de oligosacárido resultante se muestra en la figura 12, banda 1. Se incubó el producto resultante con galactosiltransferasa: β -1,4-galactosiltransferasa tal como se describió anteriormente para producir *Gal unido a GlcNAc en Man₃GlcNAc₂ tal como se muestra en la figura 12, banda 2. Se incubó este producto con α -2,6-sialiltransferasa tal como se describe previamente para producir ácido siálico unido a *Gal unido a *GlcNAc en Man₃GlcNAc₂ comercial tal como se muestra en la figura 12, banda 3.

15 También se estudió la utilización de N-glucanos, liberados a partir de ribonucleasa B, como sustratos aceptores para GlcNAc Tr I, galactosiltransferasa, y α -2,6-sialiltransferasa. Se liberaron los N-glucanos tal como se describe en el ejemplo 2. Siguiendo la liberación a partir de la proteína, dos estructurasceptoras de GlcNAc están disponibles. Por lo tanto, un modelo de glucosilación más complejo se observa siguiendo la reacción secuencial con GlcNAc Tr I, galactosiltransferasa, y α -2,6-sialiltransferasa, tal como se representa en la figura 12, bandas 4 - 6. Sin embargo, se observaron las estructuras híbrida y compleja esperadas.

Ejemplo 7

20 *Mejora de las estructuras de glucoproteínas híbridas con α -1,2-manosidasa*

Se trataron las glucoproteínas (hasta 100 mg) u oligosacáridos (preparados a partir de aproximadamente 100 mg de proteína) con de 2 a 6 μ unidades de α -1,2-manosidasa de *A. saitoi* (Oxford Glycosystems) en acetato de sodio 100 mM (pH 5) durante 18 horas a 37°C. Se dializaron las glucoproteínas frente a MES 20 mM, pH 6,1, antes de tratar adicionalmente con GlcNAc Tr I. Se visualizó la incorporación de GlcNAc radioactivo en oligosacáridos sobre una película de rayos X tras la separación mediante CCF. Se visualizaron señales radioactivas que se originan a partir de residuos (¹⁴C)GlcNAc en proteínas tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 8

Ensayos de manosidasa y manosiltransferasa

35 Se ensayó la actividad manosidasa en el medio extracelular a partir de *T. reesei* y *Aspergillus saitoi*: se hizo crecer *T. reesei* RUTC 30 en medio mínimo, según Uusitalo *et al.* (1991) con lactosa al 2% como fuente de carbono. Se utilizó paralelamente el mismo medio, complementado con glucosa al 2%, con el fin de determinar si existe una influencia de fuentes de carbono diferentes sobre la expresión de las manosidasas. Se hizo crecer *Aspergillus saitoi* sobre un medio mínimo según Czapek (Onions y Pitt, apéndice: Media. En Hawksworth, D. L. y Kirsop, B. E., (Eds.), Living resources for biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, págs. 180-199, 1988) con extracto de levadura al 1% y, paralelamente con glucosa al 2% como fuentes de carbono. Tras 4 días de fermentación a 28°C, se separaron células fúngicas del medio de crecimiento mediante filtración sobre un filtro de microfibra de vidrio GF/F (Whatman).

45 Se concentró adicionalmente el medio de crecimiento (70 veces), utilizando dispositivos de ultracentrifugación centriprep y centricon (punto de corte de PM: 10 kD; Amicon). Las mezclas de reacción para ensayar las actividades de manosidasa contenían en un volumen de 20 μ l: 500 ng de oligosacáridos ricos en manosa marcados con ANTS a partir de ribonucleasa B (Oxford Glycosystems); cacodilato de sodio pH 6,1 (concentración final de 60 mM); CaCl₂ (20 mM) y 15 μ l de medio de crecimiento concentrado. La incubación de las mezclas de reacción fue durante la noche a 37°C. Se separaron luego los oligosacáridos sobre un gel de poliacrilamida, tal como se describe.

50 Se utilizaron las células fúngicas recogidas para la preparación de los extractos brutos: tras lavar con tampón de cacodilato de sodio 50 mM, se machacó el sedimento celular seco en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Se transfirieron las células rotas a tampón de cacodilato de sodio helado (50 mM, pH 6,1) que contenía MgCl₂ (15 mM) y un combinado de inhibidores de proteasa (PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), leupeptina, benzamidina, aprotinina en concentraciones prescritas por el fabricante (Boehringer Mannheim). Se dejaron las células en el tampón sobre hielo durante 30 minutos. Se utilizó centrifugación diferencial para obtener sedimentos de membrana de 15.000 g, 40.000 g y 100.000 g. Finalmente se añadió Triton X 100 (concentración final del 2%) a las enzimas solubilizadas de las membranas. Se prepararon las mezclas de reacción para ensayar las manosidasas tal como ya se ha descrito. Las mezclas de reacción para ensayar las manosiltransferasas contenían en un volumen de 20 μ l: 100 ng de Man₃GlcNAc marcado con ANTS; 10 μ g de UDP-manosa; MnCl₂ (concentración final de 20 mM) y 10 μ l de la preparación de membrana de 100.000 g. Se incubaron las mezclas de reacción durante 4 horas a 37°C.

Ejemplo 9

Glucoproteínas como sustratos aceptores para GlcNAc Tr I

65 Se utilizaron diferentes glucoproteínas en los ensayos de actividad de GlcNAc Tr I para determinar si estaban portando estructuras de glucosilo que fueran sustratos para GlcNAc Tr I. La ovoalbúmina, que se utilizó como control positivo en este experimento, tiene dos sitios de glucosilación candidatos, pero sólo un sitio está realmente glucosilado.

ES 2 260 768 T3

Una fracción de los oligosacáridos que están presentes en la ovoalbúmina es Man_5Gn_2 (Tai *et al.*, J. Biol. Chem. 252:6687-6694 (1977)). Como controles negativos, se utilizaron invertasa de *S. cerevisiae* y transferrina humana. La invertasa de *S. cerevisiae* porta oligosacáridos ricos en manosa con Man_8Gn_2 siendo la estructura más pequeña que se forma (Trimble *et al.*, J. Biol. Chem. 261:9815-9824 (1986)). La transferrina, una glucoproteína humana, tiene dos N-glucanos de tipo complejo (Marz *et al.*, Can. J. Biochem. 60:624-630 (1982)). La mayoría de los oligosacáridos de transferrina son bi-antenaes con ácido siálico como residuos de azúcar terminales.

Se estudiaron las proteínas secretadas a partir de la cepa RUTC 30 mutante de *T. reesei* y las celulasas de una cepa desconocida de *T. reesei* (fuente comercial; Fluka, Buchs, Suiza). La cepa RUTC 30 mutante de *T. reesei* tiene una capacidad incrementada para secretar proteínas (Ghosh *et al.*, en *Trichoderma reesei Cellulases: Biochemistry, Genetics, Physiology & Application* (Kubicek *et al.*, eds.), Royal Soc. of Chemistry, Cambridge, Inglaterra (1990), págs. 115-138). Los resultados (figura 5) muestran que el (^{14}C)GlcNAc radioactivo se transfirió desde UDP-(^{14}C)GlcNAc hasta los oligosacáridos en ovoalbúmina y en proteínas secretadas extracelulares a partir de ambas cepas de *T. reesei*. Estos resultados indicaron que la presencia de enzimas de corte en *T. reesei* que pudieron formar *in vivo* oligosacáridos aceptores para GlcNAc Tr I.

Adicionalmente, se estudió la utilización de otras proteínas como sustratos aceptores para GlcNAc Tr I. Se determinó la presencia de un sustrato para GlcNAc Tr I utilizando el ensayo de GlcNAc Tr I descrito anteriormente en el ejemplo 5, midiendo la incorporación de GlcNAc radiactivo en la glucoproteína mediante autorradiografía de geles de SDS-PAGE al 12,5%. Se demostró la incorporación de GlcNAc radiomarcado para α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, obtenida de Fluka, Buchs, Suiza; α -amilasa de *Aspergillus niger*, también obtenida de Fluka; y para las proteínas en una preparación de β -galactosidasa comercial de *Aspergillus oryzae*, obtenida de Sigma, St. Louis, MO, USA. Véase la figura 11. También se demostró la incorporación de GlcNAc radiomarcado para la celobiohidrolasa I digerida con papaína de *Trichoderma reesei* RUTC 30. Tras la digestión con papaína, la celobiohidrolasa I no contiene más el extremo C-terminal de la enzima que está fuertemente O-glucosilada. Van Tilbeurgh *et al.*, FEBS Lett. 204:223-227 (1986).

Ejemplo 10

30 Oligosacáridos libres como sustrato aceptor para GlcNAc Tr I

Se aislaron los oligosacáridos de glucoproteínas extracelulares de *Trichoderma* para evaluar adicionalmente y confirmar que $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ fue el N-glucano aceptor de GlcNAc. Se eliminaron enzimáticamente los oligosacáridos con N-glucanasa. Esta enzima libera todos los tipos de cadenas de azúcar unidas a N mediante escisión de la unión glucosilamina en residuos de asparagina (Tarentino *et al.*, Biochemistry 24:4665-4671 (1985)). Luego se probaron los oligosacáridos en una mezcla de reacción que contiene GlcNAc Tr I. Una mezcla comercial de oligosacáridos que oscila desde $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ hasta $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ obtenida a partir de ribonucleasa B mediante hidrazinólisis (Oxford GlycoSystems N° RP-2500) se utilizó como control positivo para este experimento (Liang *et al.*, J. Biochem. 88:51-58 (1980)). Los oligosacáridos que habían sido liberados enzimáticamente a partir de invertasa de *S. cerevisiae* se utilizaron como controles negativos. GlcNAc Tr I transfirió GlcNAc radioactivo desde el UDP-(^{14}C)GlcNAc hasta los glucanos fúngicos $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Esto se detectó tras la separación de los oligosacáridos manipulados mediante cromatografía de capa fina (CCF). La posición de los oligosacáridos fúngicos marcados, tal como se revela mediante autorradiografía (figura 6), coincidió con los del control positivo. Con la cepa RUTC 30 mutante de *T. reesei* una estructura de oligosacárido adicional que era mayor que $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ también actuó como un aceptor para GlcNAc Tr I. Esto indicó la existencia de diferencias en los modelos de glucosilación al nivel de la cepa.

Ejemplo 11

50 Ensayos de galactosiltransferasa y sialiltransferasa

Se realizaron modificaciones *in vitro* adicionales de glucoproteínas que llevan GlcNAc u oligosacáridos con la β -1,4-galactosiltransferasa comercial (Boehringer Mannheim) de leche humana (Schanbacher *et al.*, J. Biol. Chem. 245:5057-5061 (1970)) y α -2,6-sialiltransferasa comercial (Boehringer Mannheim) de hígado de rata (Weinstein *et al.*, J. Biol. Chem. 257:13845-13853 (1982)). Se demostró la galactosilación mediante la incorporación de galactosa radioactiva sobre estructuras de glucosilo sintetizadas *in vitro*, no marcadas, que llevan GlcNAc. Se demostró la finalización de la ruta sintética mediante la incorporación de ácido siálico radioactivo sobre galactosa "fría" que se añadió en una unión β -1,4 a GlcNAc. Se separaron las glucoproteínas marcadas de esta manera mediante electroforesis sobre un gel de SDS-poliacrilamida. Durante la electroforesis, las glucoproteínas sializadas se desplazaron más lentamente comparadas con las proteínas no sializadas. Esto se observó como un desplazamiento de las proteínas hacia pesos moleculares más elevados. Para demostrar claramente este efecto, se examinó una proteína de *Trichoderma*, concretamente celobiohidrolasa I (CBH I), en particular.

Tras la etapa de tratamiento de GlcNAc Tr I, se purificó CBH I a partir de la mezcla de reacción que contiene sobrenadante de COS mediante cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE Sepharose (Shoemaker *et al.*, Bio/Technology 1:687-690 (1983)). La etapa de purificación evitó cualquier interferencia posible mediante proteínas del sobrenadante de COS, que también puede ser un aceptor para sialiltransferasa.

Se obtuvo un autorradiograma con GlcNAc radioactivo que contiene CBH I frente a CBH I sializado radioactivo (figura 7). Se mostró un desplazamiento limpio en la movilidad electroforética del CBH I sializado comparado con la forma que contiene GlcNAc. Esto demostró que era posible modificar las estructuras de glucosilo que se producen de forma natural en CBH I de *Trichoderma* en estructuras híbridas con restos de ácido siálico terminales. Se confirmaron las dos etapas de modificación finales sobre los oligosacáridos libres. La incorporación de galactosa seguida de la incorporación de ácido siálico, causó siempre un desplazamiento del peso molecular de las moléculas de oligosacárido. Esto se observó como desplazamientos en la movilidad de los diferentes oligosacáridos manipulados en la CCF.

Ejemplo 12

Mejora de estructura de glucoproteína híbrida mediante la utilización de α -1,2-manosidasa

Cuando se utiliza un hongo tal como *T. reesei* para producir proteínas heterólogas terapéuticamente valiosas, una fracción sustancial de los oligosacáridos ricos en manosa no será un aceptor para GlcNAc Tr I. Por otro lado, en células de mamíferos, una α -1,2-manosidasa que está presente en el compartimento cis del aparato de Golgi corta la mayoría, si no todas, las estructuras ricas en manosa en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ y así asegura que las cadenas de hidrato de carbono se puedan convertir en el tipo complejo (Tulsiani *et al.*, J. Biol. Chem. 263:5408-5417 (1988)).

Se utilizó una α -1,2-manosidasa comercial (Oxford Glycosystems, Oxford, UK) de *A. saitoi* (Yamashita *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 96:1335-1342 (1980)) para investigar en qué medida el tratamiento de glucosilación se asemeja al de las células de mamíferos. Se determinó el efecto de la incubación previa de oligosacáridos fúngicos o glucoproteínas con α -1,2-manosidasa en la incorporación *in vitro* de GlcNAc en un ensayo de GlcNAc Tr I.

Se trataron los oligosacáridos de ribonucleasa B de bovino, de proteínas extracelulares de *T. reesei*, con α -1,2-manosidasa de *A. saitoi*. Se procesaron los N-glucanos tratados y no tratados y se visualizaron mediante marcado con fluoróforo de los sacáridos reductores (figura 8). En este método, se hizo reaccionar el extremo reductor de los sacáridos, liberados tal como se describió anteriormente, con ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (ANTS), tal como se describe por Jackson, P., "Methods in Enzymology. Guide to techniques in Glycobiology", Vol. 230, págs. 250-265, Eds. Lennartz, W. & Hart, G. (1994)). Básicamente, 10 μl de ANTS 0,15 M en disolución de ácido acético - agua (3:17 v/v) y 10 μl de cianoborohidruro de sodio 1 M disuelto en DMSO se añadieron a oligosacáridos liofilizados, liberados enzimáticamente a partir de 400 μg de glucoproteína, o a 5 μg de oligosacáridos de ribonucleasa B de bovino, obtenidos comercialmente de Oxford Glycosystems. No se necesitó la purificación previa de los oligosacáridos en una columna Biogel P2. Tras la incubación durante la noche a 37°C, se precipitaron los oligosacáridos marcados con ANTS mediante adición de 4 volúmenes de acetona helada (a menos 20°C). Se depositaron los oligosacáridos mediante centrifugación (durante 4 minutos a 10.000 x g). Se eliminó el ANTS no reaccionado en el sobrenadante que contiene acetona. Se redisolviéron los oligosacáridos en un volumen apropiado de glicerol:agua (1:4 v/v) y se almacenaron a menos 70°C. Se separaron los oligosacáridos derivatizados con ANTS sobre un gel de acrilamida al 30% y N,N'-metilen-bisacrilamida al 0,8% (en el aparato electroforético SE 250 Mighty Small II, que también se utiliza para la separación de proteínas mediante PAGE). Con el fin de obtener geles "transparentes como el cristal", se vertió la disolución del gel entre láminas de plástico que estaban adheridas a las placas molde con agua. Se permitió el apilamiento de los oligosacáridos en una corriente de 15 mA durante 30 minutos, mientras que la separación ocurrió a 30 mA durante 2,5 horas. Como patrón de referencia, se cargó una escala de glucosa, obtenida tras la digestión de almidón de trigo (descrita por Jackson, P., "Methods in Enzymology. Guide to techniques in Glycobiology", Vol. 230, págs. 250-265, Eds. Lennartz, W. & Hart, G. (1994)). Se examinaron los modelos de banda electroforéticos en un transiluminador UV y se fotografiaron a través de un filtro rojo (Cokin A. 003; Cromofilter SA, París, Francia), utilizando una película en blanco y negro convencional. Una película Polaroid de tipo 667 con una velocidad de ISO3000 y una apertura de 4,5 requirió una exposición de 8 segundos (figura 8).

Se convirtieron todos los N-glucanos de tipo oligomanosa de la ribonucleasa B, que oscilan desde $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ hasta $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Esto estuvo de acuerdo con el hecho de que se sabe que la biosíntesis de cadenas de azúcar unidas a N sobre la ribonucleasa B se detiene en una etapa intermedia del tratamiento, tal como se demuestra por el hecho de que las estructuras ricas en manosa no se habían convertido todas a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ y tenían restos de manosa de más solamente en la unión α -1,2. Se convirtieron parcialmente los oligosacáridos que se habían aislado a partir de una mezcla de proteínas secretadas a partir de *T. reesei* a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, mientras que una parte sustancial de la reserva de oligosacáridos no se convirtió. Del material de partida, una fracción de los oligosacáridos parecía ser más pequeña que $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, mientras que otra fracción era más grande que $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. En la figura 8, sólo se muestra el corte de los oligosacáridos de *T. reesei*.

Se añadieron entonces los oligosacáridos fúngicos que se habían tratado con α -1,2-manosidasa de *A. saitoi* a una mezcla de reacción para GlcNAc Tr I. Se analizaron los oligosacáridos mediante cromatografía de capa fina. El tratamiento *in vitro* con α -1,2-manosidasa favoreció la formación de sustrato aceptor para GlcNAc Tr I (figura 9) porque se incorporó mucho más GlcNAc radioactivo dentro de los oligosacáridos fúngicos. Se cortó también una pequeña fracción de los oligosacáridos de invertasa de *S. cerevisiae* a la estructura rica en manosa que acepta GlcNAc. Los glucanos de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ aislados de ovoalbúmina fueron el control positivo para este experimento. En el autorradiograma, la posición de los oligosacáridos fúngicos marcados coincidió con la del control positivo. Esto confirmó la formación de $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ en las diferentes mezclas de reacción.

ES 2 260 768 T3

Con la cepa de *Trichoderma* RUTC 30, el tratamiento con α -1,2-manosidasa también dio lugar a más de un segundo oligosacárido que acepta GlcNAc más grande. Cuando se repitió el tratamiento con manosidasa sobre glucoproteínas intactas (figura 10) los resultados fueron análogos a los obtenidos con oligosacáridos libres. Es decir, se transfirió más GlcNAc marcado a la ovoalbúmina y a las glucoproteínas de *T. reesei* cuando primero se trataron previamente con α -1,2-manosidasa. Ahora se transfirió también GlcNAc a invertasa de *S. cerevisiae*.

En resumen, el método de la invención permite la producción de oligosacáridos híbridos similares a los de los mamíferos sobre glucoproteínas secretadas a partir del hongo filamentoso *T. reesei* y de su cepa mutante *T. reesei* RUTC 30. Los experimentos *in vitro* utilizaron las siguientes glucosiltransferasas de mamíferos: GlcNAc Tr I humana producida en células COS; β -1,4-galactosiltransferasa de leche humana y α -2,6-sialiltransferasa de hígado de rata. La incubación previa con α -1,2-manosidasa de *A. saitoi* mejoró sustancialmente la incorporación de GlcNAc en las proteínas fúngicas. Esta realización obtuvo un hongo que sintetizaba oligosacáridos que se podían convertir en estructuras de tipo mamífero complejas de la forma más simple posible. Ya que las primeras etapas de la compleja ruta sintética de hidratos de carbono se llevaron a cabo *in vivo* en un hongo tal como *Trichoderma*, la finalización de la ruta de glucosilación fue posible mediante síntesis y modificación de oligosacáridos enzimáticas *in vitro*. Como resultado de la presente invención, la síntesis de oligosacáridos controlada estéricamente a gran escala será posible en el futuro (Ichikawa *et al.*, Anal. Biochem. 202:215-238 (1992)). El hecho de que un hongo pueda manipularse para construir estructuras de glucosilo bien definidas y uniformes sobre sus proteínas secretadas ofrece posibilidades para investigar la importancia biológica de la diversidad de oligosacáridos y para realizar ingeniería genética de hidratos de carbono. Para ciertas proteínas, la producción de una gluciforma individual puede producirse para obtener un perfil terapéutico uniforme (Stanley, P., Molecular and Cellular Biology 9:377-383 (1989)).

Ejemplo 13

25 *Análisis del perfil de N-glucano de glucoproteínas de T. reesei mediante marcado con fluoróforo*

Se obtuvo una imagen detallada, tanto cuantitativa como cualitativamente, cuando se derivatizaron los oligosacáridos con el fluoróforo 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonato y posteriormente se separaron electroforéticamente sobre un gel de poliacrilamida. En la figura 4, se demuestra el modelo de oligosacárido de celobiohidrolasa I de *T. reesei* RUTC 30, purificada tras la fermentación en medio mínimo (Nyyssönen *et al.*, Bio/Technology 11:591-595 (1993)). También se conoce el modelo obtenido con una mezcla de proteínas secretadas por la misma cepa de *Trichoderma*, pero en un medio de crecimiento diferente (según Uusitalo *et al.*, 1991). Sólo una fracción menor de oligosacáridos del material de partida parece ser Man₅GlucNAc₂. Más abundantes son los oligosacáridos Man₆GlucNAc₂, Man₇GlucNAc₂, Man₈GlucNAc₂ y Man₉GlucNAc₂. También se encontraron N-glucanos más grandes que Man₉GlucNAc₂.

Con CBH I puro, se aislaron oligosacáridos incluso más pequeños que Man₅GlucNAc₂. En general, las cadenas de azúcar de *Trichoderma* son claramente mucho más pequeñas que las aisladas a partir de glucoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ya que el corte con α -1,2-manosidasa es incompleto (figura 8), es muy probable que restos de manosa estén presentes en uniones diferentes a la unión α -1,2 (debido a transferencia a productos de corte mediante una o más transferasas de manosilo).

Ejemplo 14

45 *Determinación de actividades de manosidasa y manosiltransferasa de T. reesei y conclusiones*

Con el fin de investigar más en detalle el parecido entre la síntesis de glucosilo de *T. reesei* y el sistema de mamíferos, se trató de localizar la actividad manosidasa responsable del panel de oligosacáridos sobre las proteínas fúngicas secretadas. Primero, se comprobó si las manosidasas estaban presentes en el medio extracelular del hongo, que podría ser al final responsable del corte "tras la secreción" de los oligosacáridos sobre otras proteínas secretadas. Se desarrolló un ensayo para determinar esta actividad tal como sigue: se utilizaron oligosacáridos de ribonucleasa B de bovino (comercialmente disponible como un panel de referencia de Oxford Glycosystems) como sustrato para manosidasas. Se obtiene una conversión completa a Man₅GlucNAc₂ si suficiente α -1,2-manosidasa está presente. Se corta Man₅GlucNAc₂ aún más si α -1,3 y/o α -1,6-manosidasas están presentes. Tras marcar con ANTS, se añadieron los oligosacáridos de referencia de ribonucleasa B al medio extracelular concentrado en 70 veces de un cultivo de *T. reesei* de cuatro días (con células fúngicas eliminadas). Se utilizó un sobrenadante de cultivo concentrado de cuatro días de *Aspergillus saitoi* como control positivo para este ensayo: se sabe que éste microorganismo secreta diferentes manosidasas (una α -1,2 y una α -1,3(6)-manosidasa) cuando se hace crecer sobre medio mínimo que contiene manano como fuente de carbono (Keskar, S.S. *et al.*, Biotechnology Letters 15:695-690 (1993)). En la figura 7, se demuestra el resultado de una incubación durante la noche de las mezclas de reacción: la actividad α -1,2-manosidasa de *A. saitoi* es claramente detectable. Se corta la mayoría de oligosacáridos de ribonucleasa B a Man₅GlucNAc₂. Ninguna cantidad o sólo cantidades marginales de manosidasa están presentes en el medio de *T. reesei*, puesto que el panel de referencia de ribonucleasa permaneció intacto. Se menciona aquí que *T. reesei* secretó muchas más proteínas en su medio mínimo (aproximadamente 300 μ g/ml) que *A. saitoi* (apenas detectable, utilizando el ensayo de Bradford).

65 Utilizando el mismo panel de oligosacáridos marcados con ANTS de ribonucleasa B, se encontró actividad manosidasa intracelular en extractos crudos de *T. reesei*, *A. saitoi*, células de ratón L929 y de *S. cerevisiae*. Además se intentó discriminar principalmente entre manosidasas activas en el tratamiento de glucosilación en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y aquellas activas en vacuolas. Utilizando centrifugación diferencial o gradientes de sacarosa

para separar orgánulos, preparados a partir de células de *T. reesei*, no se obtuvo suficiente resolución de actividades manosidasa diferentes en orgánulos diferentes. Sin embargo, la actividad α -1,2 manosidasa estuvo presente abundantemente en fracciones que se enriquecieron para la actividad manosiltransferasa. Se hizo la determinación de la actividad manosiltransferasa tras la adaptación del ensayo, descrita por Nakajima y Ballou (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3912-3916 (1975)). Con mezclas de reacción que contienen UDP-manosa como donador de azúcar, Man₈GlucNAC marcado con ANTS como sustrato y enzimas de glucosilación solubilizadas a partir de las preparaciones de membrana mediante Tritón X 100, se demostró la actividad manosiltransferasa mediante retardo en la movilidad electroforética de los oligosacáridos sustrato (no se muestran los resultados).

Los ejemplos anteriores demuestran que es posible construir oligosacáridos híbridos similares a los de los mamíferos sobre glucoproteínas secretadas a partir del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*. Se utilizaron glucosiltransferasas de mamífero, concretamente N-acetilglucosaminiltransferasa I humana producida en células COS, β -1,4-galactosiltransferasa de leche humana, y α -2,6-sialiltransferasa de hígado de rata, para imitar *in vitro* la ruta de síntesis de glucosilación tal como ocurre en las células de mamíferos. La incubación previa con α -1,2-manosidasa de *Aspergillus saitoi* mejoró sustancialmente la incorporación de GlucNAC sobre las proteínas fúngicas. Con N-glucanos libres aislados a partir de celulasas de *Trichoderma reesei*, se demostró que no todas las cadenas de azúcar se podían convertir en el sustrato aceptor ideal para GlucNAC Tr I: Man₅GlucNAC₂. La mayoría de los oligosacáridos unidos a N se asemejan a las estructuras ricas en manosa presentes en ciertas proteínas de células de mamífero, oscilando predominantemente desde Man₅GlucNAC₂ hasta Man₉GlucNAC₂. Con CBH I puro, obtenido tras la fermentación en medio mínimo de *Trichoderma* (Nyyssonen *et al.*, 1993) una fracción sustancial de los oligosacáridos parece ser incluso más pequeña que Man₅GlucNAC₂. Utilizando otro medio de fermentación, se obtuvieron ahora también oligosacáridos más grandes que Man₉GlucNAC₂. La movilidad electroforética de CBH I producida en los diferentes medios también cambió notablemente. Tras la desglucosilación, el CBH I producido tal como se describe por Nyyssonen *et al.*, (1993) se desplazó sólo ligeramente comparado con la forma original tras la separación electroforética sobre un gel de poliacrilamida. Se necesitó la digestión exhaustiva (tiempo de incubación prolongado y muchas unidades de N-glucanasa) para liberar oligosacáridos. Con las condiciones de crecimiento que se utilizaron, se desglucosiló fácilmente CBH I, dando lugar a un desplazamiento electroforético pronunciado comparado con la proteína original (no se muestran los resultados). Los efectos que factores ambientales pueden tener sobre la glucosilación de proteínas se describen en profundidad por Goochee y Monica (Bio/Technology 8:421-427 (1990), Bio/Technology 9:1347-1355 (1991)). Sus revistas refuerzan nuestra creencia de que el medio de crecimiento puede ser la causa de las diferencias en los modelos de glucosilo encontrados en proteínas de *Trichoderma*.

A partir de los experimentos, se elucidó la localización de la(s) manosidasa(s) responsable(s) de los pequeños N-glucanos en proteínas secretadas de *Trichoderma*. La posibilidad de secreción de manosidasas que puedan actuar sobre las otras proteínas fúngicas secretadas parece ser muy poco probable. Incluso con medio de crecimiento muy concentrado y tras un tiempo de incubación prolongado, no se produjo corte alguno de los oligosacáridos sustrato.

Se supone que el tratamiento en el aparato de Golgi de *Trichoderma* se asemeja parcialmente al de células de mamíferos y parcialmente al de levadura: manosidasas que pueden cortar de nuevo los N-glucanos de *Trichoderma* a Man₅GlucNAC₂ parecen estar presentes. Por otro lado, también están presentes manosiltransferasas que pueden transferir residuos de manosa en uniones diferentes de la unión α -1,2. Se confirmó ésta última conclusión tras realizar los ensayos de manosiltransferasa, análogos al descrito por Nakajima y Ballou (1973): utilizando Man₈GlucNAC marcado con ANTS como sustrato, se consiguió demostrar la incorporación de hasta dos residuos de manosa. Por otro lado, Man₅GlucNAC no fue sustrato para manosiltransferasas. Por lo tanto, queda la pregunta de si Man₅GlucNAC₂, la estructura crucial para la síntesis de estructuras de azúcar complejas, no será un sustrato para manosiltransferasa(s) “*in vivo*” en *T. reesei*.

Todavía no se sabe cómo de similar a la de células de mamífero avanza la síntesis de glucosilación en *Trichoderma reesei*. Por lo tanto, es difícil evaluar si este microorganismo se puede manipular fácilmente para tener más, si no todos, los grupos glucosilo convertidos en estructuras similares a las de los mamíferos. Los experimentos *in vitro* son una primera etapa introductoria para la manipulación de este hongo, de modo que sinteticos oligosacáridos que se pueden convertir en estructuras complejas de la forma más simple posible. Si las primeras etapas de la ruta de síntesis de hidratos de carbono complejos se produjeran *in vivo* en un hongo, tal como *Trichoderma*, se podría realizar la finalización de la ruta de glucosilación mediante modificación de oligosacáridos enzimática *in vitro* sobre proteínas. Se cree que la síntesis de oligosacáridos a gran escala controlada estéricamente será posible en el futuro: mucha investigación está en progreso para reducir los gastos elevados asociados a estas etapas de tratamiento *in vitro* (Ichikawa *et al.*, 1992). Finalmente, se puede mencionar otro aspecto importante que concierne a esta investigación: el hecho de que un hongo pueda manipularse para sintetizar estructuras de glucosilo bien definidas y uniformes sobre sus proteínas secretadas. Para ciertas proteínas, puede desearse la producción de una glucoforma individual para obtener un perfil terapéutico uniforme.

Ejemplo 15

Transformación de T. reesei con secuencias codificantes para GlcNAc Tr I y expresión de glucoproteína modificada a partir del huésped de Trichoderma

5 Se construye un vector de ADN que contiene la secuencia codificante de GlcNAc Tr I humano (N° Registro Genbank M55621; EMBL ID N° HSGLCNAC) tal como se describió anteriormente, y de manera que el ADN que provee la secuencia codificante para la enzima de GlcNAc Tr I se una operativamente al promotor y al terminador de CBHI. Se transforma tal vector dentro de *T. reesei*, utilizando la técnica descrita en el documento EP 244.234, y se seleccionan los transformantes positivos.

15 Uno de los transformantes positivos se transforma adicionalmente con un segundo vector, que codifica para ovoalbúmina en una forma que se secretó a partir del huésped de *Trichoderma*, y se seleccionaron los transformantes que expresaban tanto GlcNAc Tr I como ovoalbúmina.

Se trata ya la ovoalbúmina que se secreta en el medio de *Trichoderma* a una primera forma híbrida mediante la acción intracelular de GlcNAc Tr I. Se trata adicionalmente esta ovoalbúmina utilizando β -1,4-galactosiltransferasa y α -2,6-sialiltransferasa, tal como se describe en el ejemplo 11.

20 Ejemplo 16

Transformación de T. reesei con secuencias codificantes para GlcNAc Tr I y expresión de glucoproteína modificada a partir del huésped de Trichoderma

25 Al igual que en el ejemplo 15, excepto que se trata la ovoalbúmina con α -manosidasa no específica tras tratamiento con β -1,4-galactosiltransferasa, o tras el tratamiento con α -2,6-sialiltransferasa.

Ejemplo 17

30 *Transformación de T. reesei con secuencias codificantes para GlcNAc Tr I y expresión de glucoproteína modificada a partir del huésped de Trichoderma*

35 Al igual que en el ejemplo 15 o el ejemplo 16, excepto que el gen de interés codifica para eritropoyetina (EPO), coriagonadotropina humana (HCG), folitropina (FSH), tirotropina (TSH), lutropina (LH), molécula de adhesión celular neural (NCAM), tenascina, trombospondina, fibronectina, hormonas, citocinas, interleucina-4, interferona gamma, factores de crecimiento, proteínas de plasma, factores de coagulación, receptores solubles, un anticuerpo, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular, glucoproteína gp120 del virus VIH, proteínas de cubierta virales, inmunoglobulina D, antitrombina III β , plasminógeno, factor von Willebrand, fibrinógeno, globulina que se une a corticosteroide, globulina que se une a tiroxina, proteína que se une a folato, fibronectina, osteonectina de hueso y plaquetas, receptor de EGF, receptores de insulina y de factor de crecimiento similar a insulina I, receptor de factor de crecimiento de fibroblastos básico, linfocitos CD2, moléculas de CMH de clase II, transportadores de glucosa, proteína eritrocitaria de banda 3, receptores β -2 adrenérgicos, receptor de transferrina, receptor de VIP, proteína de CMH de clase I de membrana, receptor de vasopresina de células LLC-PK1, receptor de lipoproteína de baja densidad, receptor de asialoglucoproteína, proteína CD4, receptor de tirotropina, receptor de PDGF, concanavalina A de judía de caballo, factor de veneno de cobra, lactotransferrina, factor de apareamiento de cloroplasto de espinaca, mucina de la glándula submaxilar, lactasa-florizina hidrolasa del borde en cepillo intestinal, glucoproteína anticongelante de pez del ártico, receptor de LDL, glucoforina A o β -HCG, una subunidad de péptido de cualquiera de las anteriores o un fragmento funcional de cualquiera de las anteriores.

50 Ejemplo 18

Modificación de proteínas producidas en levadura

55 Se produce una proteína de interés, especialmente una descrita en los ejemplos 15 y 17, en una levadura seleccionada a partir de *Pichia spp* (especialmente *Pichia pastoris*), *Hansenula spp* (especialmente *Hansenula polymorfa*), *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, o *S. cerevisiae* y se trata tal como se describe en el ejemplo 12 con una α -1,2-manosidasa previamente al tratamiento secuencial con GlcNAc Tr I, β -1,4-galactosiltransferasa y α -2,6-sialiltransferasa.

60

65

ES 2 260 768 T3

TABLA 1

Hoja de datos: pCAMFhGNTIf1

5 Información huésped/plásmido

Nº almacenamiento: 3124

10 Tipo de bacteria huésped: MC1061

Plásmido ayudante (helper):

Resistencia huésped/plásmido: amp

15 Temperatura: 37°C

Información adicional:

20 Descripción del plásmido

CG: preMFA1/hGlcNAc-TI (fusión de la secuencia señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α de *S. cerevisiae* al fragmento de ADNc humano que codifica para N-acetilglucosaminiltransferasa I madura)

25 SN: 3124

RU: uso restringido

30 PG: EU-VARIA

SF: p3124.SEQ

35 DT: LU:

<u>FT:</u>	Código	Iniciación	Terminación	Descripción	Comentarios
40	LEN	6230U			PLÁSMIDO DE LONGITUD
	CLO	1D	170D	rGIBf	PARTE EXÓN
45	CLO	171D	529D	3FR	3+3UTR+poliR DE β -GLOBINA DE CONEJO
	PRO	689D	605D	lac	REGIÓN FLANQUEANTE EN
	ORI	747D	948D	SVORI	3' DE GEN DE β -GLOBINA DE CONEJO
50	SIG	951D	1025D	poliA	PROMOTOR
	SIG	1025D	951D	poliA	FRAGMENTO DE SV40 QUE CONTIENE
55	ORI	1540U	1140U	ORI	ORI BIDIRECCIONAL
	SEL	2943D	2083D	AMP	SEÑAL DE poliA DE LA REGIÓN
	CLO	3053D	3460D	hCMV	TEMPRANA DE SV40
	PRO	3472U	4705D	Ac	TARDÍA DE SV40
60	SIG	4721D	4975D	preMF	PLÁSMIDO ORIGEN
	GEN	4976D	6190D	GNTIf	GEN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
65					POTENCIADOR DE hCMV-IE
					PROMOTOR DE β -ACTINA DE POLLO
					SECUENCIA PREPRO DEL FACTOR 1 DE
					APAREAMIENTO α DE <i>S. cerevisiae</i>
					SECUENCIA MADURA QUE CONTIENE
					EL FRAGMENTO hGlcNAc-TI

ES 2 260 768 T3

TABLA 1 (continuación)

5	<p><u>HC:</u> <i>E.coli</i></p> <p>Células de mamíferos (células COS para expresión transitoria; otras para transformación permanente)</p>
	<p><u>IM:</u></p>
10	<p><u>OR:</u> Eco-pMB1</p> <p>SV40</p>
	<p><u>PC:</u> pCAGGS; pSCGAL1MF3; pUChGNT11</p>
15	<p><u>PR:</u> hCMV-IE (potenciador del promotor)</p> <p>CHI-Ac</p> <p>Eco-lac</p>
20	<p><u>RB:</u> Eco-lacZ</p>
	<p><u>RF:</u> Kumar <i>et al.</i>, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 9948-9952</p> <p>Marleen Maras y Roland Contreras</p>
25	<p><u>RK:</u> Iniciación de la secuencia de nucleótidos en la mitad del sitio EcoRI.</p> <p>Este plásmido se construyó tal como sigue: 1) se ligó el fragmento XbaI-StuI de pSCGAL1MF3, que contenía la secuencia señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α de <i>S. cerevisiae</i>, al fragmento de vector XbaI-Eco47III de pUChGNT11; 2) se digirió entonces esta construcción intermedia con HindIII y EcoRI, se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se añadieron ligadores de EcoRI (5'-CGGAATTCCG-3'); 3) finalmente, se digirió este fragmento EcoRI-EcoRI con XbaI y EcoRI y el fragmento XbaI-EcoRI resultante se insertó en el vector pCAGGS digerido con XbaI-EcoRI.</p> <p>Este plásmido de expresión porta una fusión de la secuencia señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α de <i>S. cerevisiae</i> que codifica para N-acetilglucosaminiltransferasa I, clonado en la orientación sentido con respecto al promotor de β-actina de pollo, que está precedido por la secuencia potenciadora CMV-IE.</p> <p>La secuencia de nucleótidos del gen GlcNAc-TI humano se obtuvo de la base de datos de secuencias de nucleótidos EMBL (Nº de registro M55621).</p>
30	
35	
40	
45	<p><u>RS:</u> U-AflII, U-AkwNI, U-ApaI, U-AvrII, U-BbsI, U-BcgI, U-BsaAI, U-BsmI, U-Bsp1201, U-DrdI, U-EcoRI, U-FspI, U-HindIII, U-MamI, U-MstII, U-NsiI, U-PflMI, U-PvuI, U-SfiI, U-SmaI, U-SnaBI, U-SnaI, U-SpeI, U-SphI, U-Sse8387I, U-SspI, U-XbaI, U-XcmI, U-XmaI</p>
50	<p><u>SE:</u> Amp</p>
	<p><u>SQ:</u> /pCAGGS/13/4722/p2154/724/460/hGNT1/285/1505/TCGACTGGA/</p> <p>/pUC18/419/400/CGGAA//</p>
55	
	<p><u>TE:</u></p>
60	<p><u>VS:</u></p>
	<p><u>SD:</u></p>
65	

ES 2 260 768 T3

TABLA 2

Hoja de datos: pSCGAL1MF3

5 Información huésped/plásmido
 N° de almacenamiento: 3123
 10 Tipo de bacteria huésped: MC1061
 Plásmido ayudante:
 Resistencia huésped/plásmido: amp
 15 Temperatura: 37°C
 Información adicional:

20 Descripción del plásmido

CG: preMF α 1 (señal prepro de secreción del gen del factor 1 de apareamiento α de *S. cerevisiae*)
 25 SN: 3123
RU: -
 30 PG: LEVADURA
SF: p3123.SEQ
 35 DT: LU:

<u>FT:</u>	Código	Iniciación	Terminación	Descripción	Comentarios
40	LEN	3477U			PLÁSMIDO DE LONGITUD
	GEN	451D	238D	lacZ	ADN de lacZ α
	SIG	716D	452D	preMF	SECUENCIA PREPRO DEL FACTOR 1 DE APAREAMIENTO α DE <i>S. cerevisiae</i>
45	PRO	1211U	828D	GAL1	PROMOTOR
	PRO	1382U	1299D	lac	PROMOTOR
	ORI	1860U	1470U	ORI	PLÁSMIDO ORIGEN
	SEL	3277D	2417D	AMP	GEN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

50 HC: *E.coli*

IM:

55 OR: Eco-pMB1

PC: pSCGAL1MF2

60 PR: Sce-GAL1

Eco-lac

RB: Eco-lacZ

65 RF: Peter Impe y Roland Contreras

ES 2 260 768 T3

TABLA 2 (continuación)

5	<u>RK:</u> Iniciación de la secuencia de nucleótidos entre el gen de resistencia a ampicilina y el ADN de lacZ.
	Este plásmido se construyó tal como sigue: se abrió pSCGAL1MF2 con AccI, se rellenó con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se ligó. De esta manera, se pierden los sitios HindIII y Sall del poliligador, y se crea un sitio NruI en el poliligador, y se convierte en único el sitio <i>HindII</i> dentro de la señal prepro de secreción del gen 1 del factor de apareamiento α de <i>S. cerevisiae</i> .
10	U-MamI sólo corta en cepas gram negativas.
	<u>RS:</u> E-Asp718, E-BspMI, E-HindIII, E-KpnI, E-NruI, E-SphI, E-Sse8387I, E-StuI
15	U-AatII, U-AflIII, U-AgeI, U-AlwNI, U-Asp700, U-BbeI, U-BcgI, U-BsaI, U-BspMI,
	U-Eam1105I, U-EcoO109, U-EheI, U-HindII, U-KasI, U-MamI, U-NarI, U-NdeI,
20	U-PssI, U-ScaI, U-SspI
	<u>SE:</u> amp
	<u>SQ:</u> /p2154/1/432/p2154/431/3475//
25	<u>TE:</u>
	<u>VS:</u> PLÁSMIDO
30	<u>SD:</u>
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	

ES 2 260 768 T3

TABLA 3

Hoja de datos: pCAGGS

5

Información huésped/plásmido

Nº de almacenamiento: 2453

10

Tipo de bacteria huésped: MC1061

Plásmido ayudante:

15

Resistencia huésped/plásmido: amp

Temperatura: 37°C

Información adicional:

20

Descripción del plásmido

CG:

25

SN: 2453

RU: Uso restringido

30

PG: EU-VARIA

SF: pCAGGS.SEQ

35

DT:

LU:

40

<u>FT:</u>	Código	Iniciación	Terminación	Descripción	Comentarios
------------	--------	------------	-------------	-------------	-------------

	LEN	4818U			PLÁSMIDO DE LONGITUD
	CLO	10D	182D	rGIBf	PARTE EXÓN
	CLO	183D	541D	3FR	3+3UTR+poliR DE β -GLOBINA DE CONEJO
45					REGIÓN FLANQUEANTE EN
					3' DE GEN DE β -GLOBINA DE CONEJO
	PRO	701U	618D	lac	PROMOTOR
	ORI	859U	961D	SVORI	FRAGMENTO SV40, QUE CONTIENE
					ORI BIDIRECCIONAL
50	SIG	953D	1037D	poliA	SEÑAL poliA DE LA REGIÓN
					TEMPRANA de SV40
	SIG	1037D	963D	poliA	SEÑAL poliA DE LA REGIÓN
					TARDÍA DE SV40
55	ORI	1555U	1145U	ORI	PLÁSMIDO ORIGEN
	SEL	2955D	2095D	AMP	GEN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
	CLO	3095D	3472D	CMV	POTENCIADOR DE CMV-IE
	PRO	3464U	4819D	AG	PROMOTOR HÍBRIDO DE
60					β -ACTINA/ β -GLOBINA: VÉASE RK

65

ES 2 260 768 T3

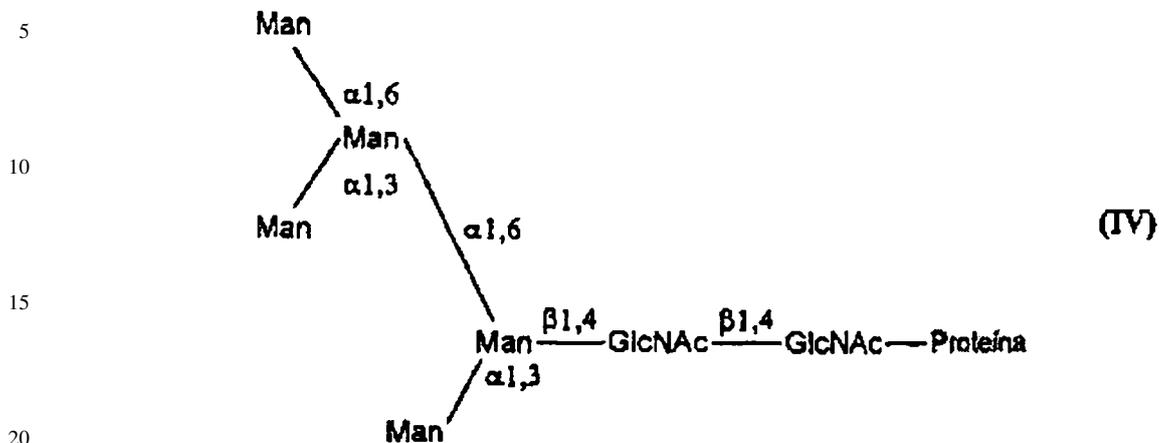
TABLA 3 (continuación)

5	<p>HC: <i>E. COLI</i></p> <p>Células de mamíferos (células COS para expresión transitoria; otras para transformación permanente)</p>
	<p>IM:</p>
10	<p>OR: Eco-pMB1</p> <p>SV40</p>
	<p>PC: puc13; pAGS-3 (ninguno de ellos está presente en las existencias físicas)</p>
15	<p>PR: CHI/RAB-AG</p> <p>hCMV-IE (potenciador del promotor)</p>
20	<p>Eco-lac</p>
	<p>RB: Eco-lacZ</p>
25	<p>RF: Este plásmido fue una donación del Prof. J. Miyazaki (Universidad de Tokio, Japón).</p> <p>Niwa <i>et al.</i>, Gene 108 (1991), 193-200</p> <p>Peter Vanhoenacker</p>
30	<p>RK: Iniciación de la secuencia de nucleótidos en la mitad del sitio EcoRI no único.</p> <p>La secuencia de nucleótidos del plásmido se reconstruyó según la información en la publicación de Niwa <i>et al.</i>, 1991. Se verificaron experimentalmente los siguientes sitios de restricción (Marc Van de Craen y Vera Goossens): BgIII, BsaAI, HindII, MstII, NcoI, SspI, PvuII, XbaI y XhoI. Este plásmido es útil para una expresión altamente eficaz de los genes bajo el control del promotor híbrido de β-actina/β-globina de conejo + el potenciador de CMV-IE en varias células de mamíferos.</p>
35	<p>pCAGGS porta un promotor de β-actina de pollo modificado: la secuencia aceptora de empalme de la región de promotor de β-actina se sustituye por un fragmento de β-globina de conejo que contiene una parte en 3' del segundo intrón y una parte en 5' del tercer exón. El promotor híbrido de β-actina/β-globina resultante se designa como el promotor AG.</p>
40	<p>U-BcII sólo corta en cepas gram negativas.</p>
45	<p>RS: U-AccI, U-ApaI, U-Asp700, U-BalI, U-BcgI, U-BglII, U-BsaAI,</p> <p>U-BsaI, U-Bsml, U-Bsp120I, U-BstXI, U-DrdI, U-EagI, U-Eam1105I,</p> <p>U-EspI, U-FspI, U-HindII, U-HindIII, U-MstII, U-NsiI, U-PfiMI,</p>
50	<p>U-PstI, U-PvuI, U-SacII, U-SalI, U-Scal, U-SfaNI, U-SfiI,</p> <p>U-SgrAI, U-SnaBI, U-SpeI, U-SspI, U-StuI, U-XbaI, U-XhoI</p>
55	<p>SE: amp</p>
60	<p>SQ: /TTCCCTCGAGGAA/RGlobinB/1545/2069/NNNNC/pUC13/427/624/NNNNNNNNNNN/</p> <p>/pAGS-3/350/4/N/pUC13/625/2611/NNNNNGTC/pCDM8/2815/2435/NNNNNGTC/</p> <p>/pAGS-3/2998/1664//</p>
	<p>TE:</p>
65	<p>VS: LANZADERA</p>
	<p>SD:</p>

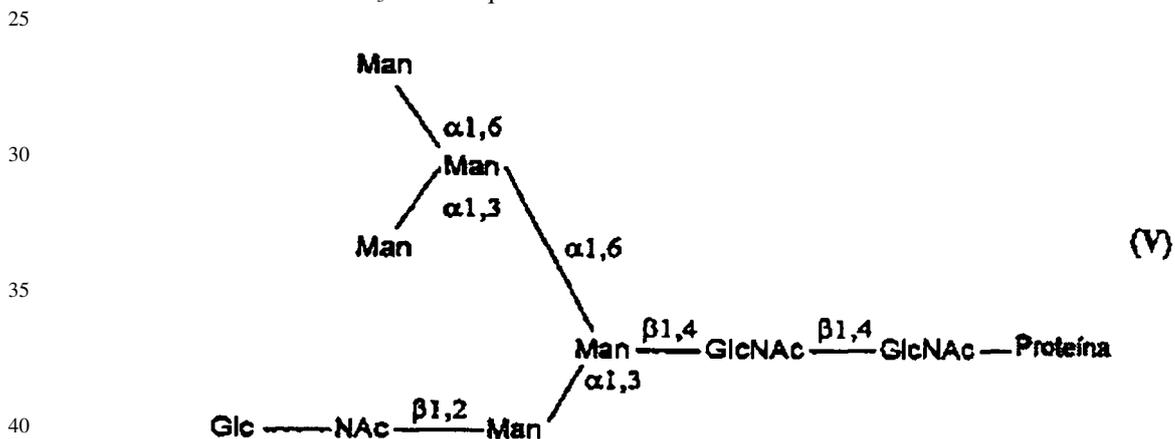
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una glucoproteína híbrida, **caracterizada** porque dicho procedimiento comprende cultivar un hongo filamentoso de manera que produzca una glucoproteína del tipo rica en manosa que es un sustrato 5 acceptor para GlcNAc Tr I, y hacer reaccionar dicha glucoproteína del tipo rica en manosa con GlcNAc Tr I.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa es una proteína que es homóloga a dicho hongo.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa es una proteína que es heteróloga a dicho hongo.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho hongo es *Trichoderma* o *Aspergillus*.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho hongo es *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa se hace reaccionar con GlcNAc Tr I intracelularmente en dicho hongo.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa se hace reaccionar con α -1,2-manosidasa.
- 25 8. Procedimiento para producir una glucoproteína híbrida en una levadura u hongo filamentoso, **caracterizado** porque dicho procedimiento comprende
- (a) hacer reaccionar una glucoproteína del tipo rica en manosa producida en una levadura u hongo filamentoso con una α -1,2-manosidasa *in vivo*; y
- 30 (b) hacer reaccionar la glucoproteína de la etapa (a) con GlcNAc Tr I.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (8) se produce intracelularmente.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha levadura se selecciona del grupo que consiste en un miembro de *Pichia spp.*, *Hansenula spp.*, *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, y *Yarrowia lipolytica*.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha *Pichia spp.* es *Pichia pastoris*.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha *Hansenula spp.* es *Hansenula polymorpha*.
13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha levadura es *S. cerevisiae*.
14. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho hongo es *Trichoderma* o *Aspergillus*.
- 45 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho hongo es *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
16. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en el que la glucoproteína del tipo rica en manosa se hace reaccionar con una UDP-GlcNAc.
- 50 17. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, que comprende además hacer reaccionar dicha glucoproteína híbrida con β -1,4-galactosiltransferasa.
- 55 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que se hace reaccionar dicha glucoproteína híbrida con UDP-galactosa.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, que comprende además hacer reaccionar dicha glucoproteína híbrida con α -2,6-sialiltransferasa.
- 60 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que se hace reaccionar dicha glucoproteína híbrida con CMP-ácido siálico.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en el que dichas etapas de reacción se llevan a cabo *in vitro*.
- 65 22. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que se hace reaccionar dicha glucoproteína híbrida con una α -1,2-manosidasa antes de dicha reacción con GlcNAc Tr I.

23. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa es una $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ que tiene la estructura



24. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en el que dicha glucoproteína del tipo rica en manosa es una $\text{Glc-Nac-Man}_5\text{GlcNAc}$ que tiene la estructura



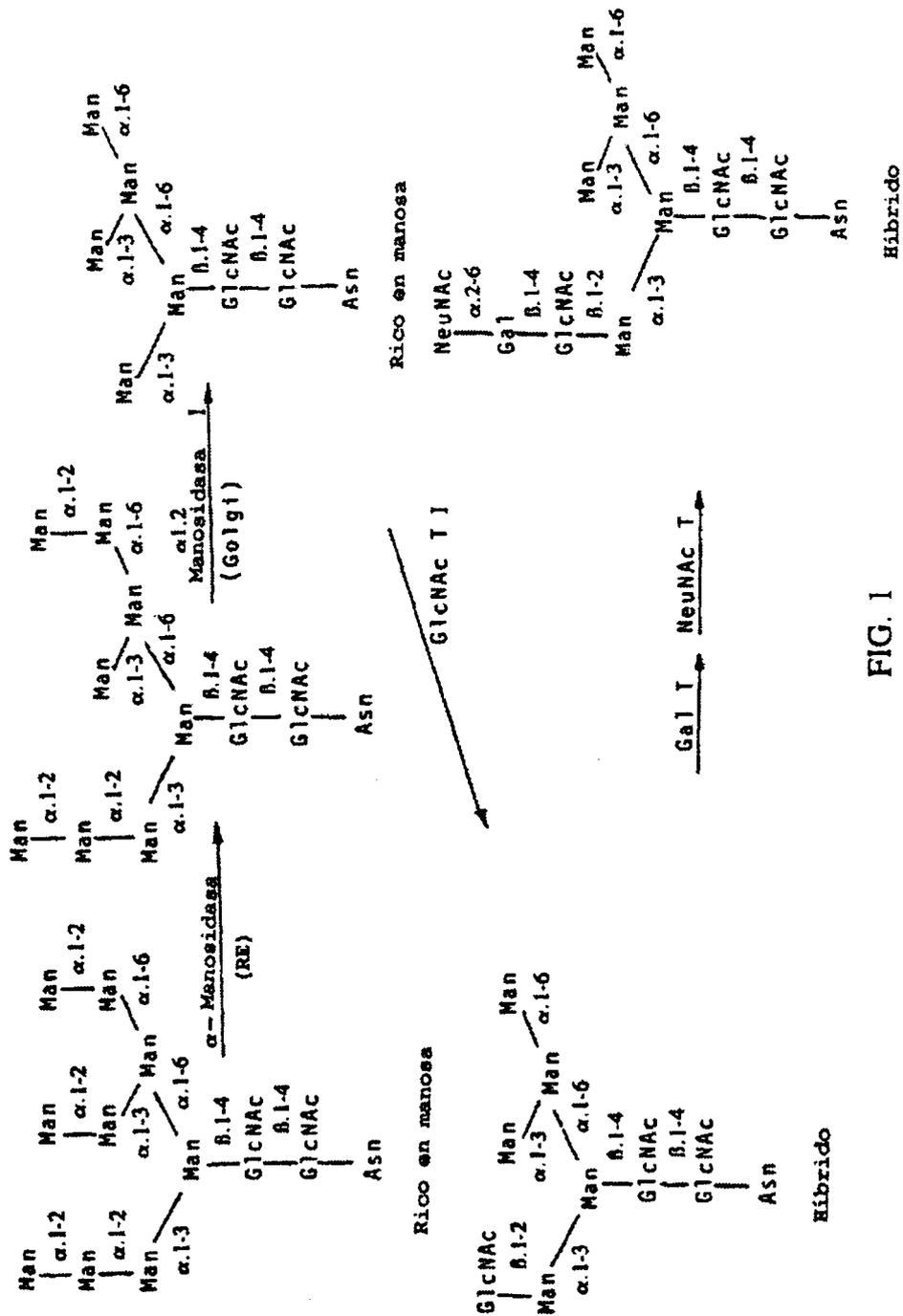


FIG. 1

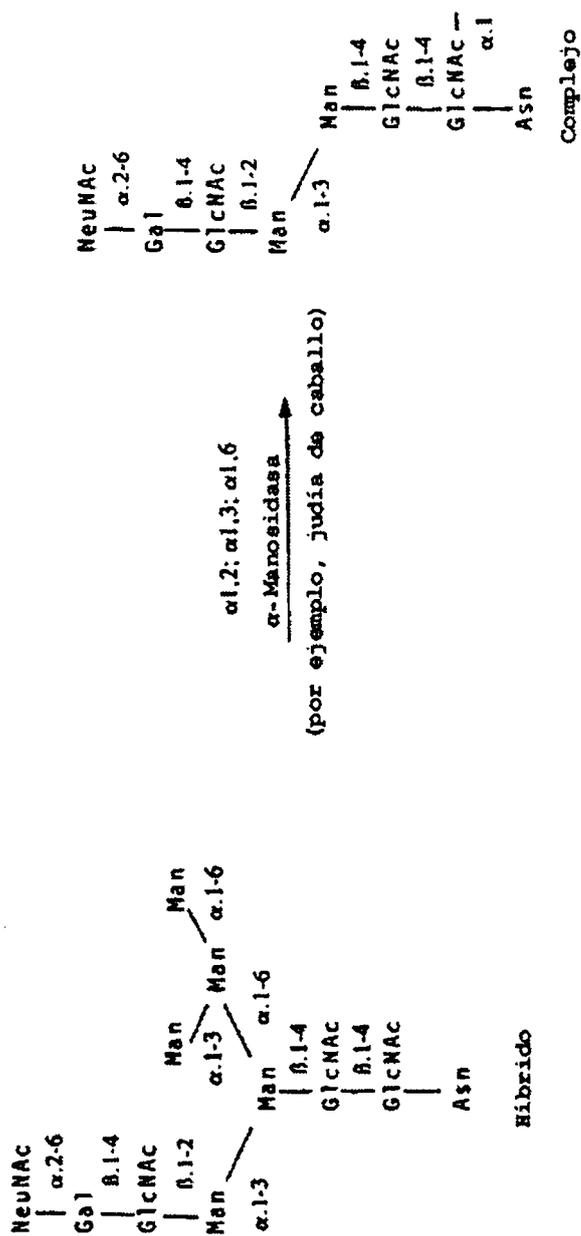
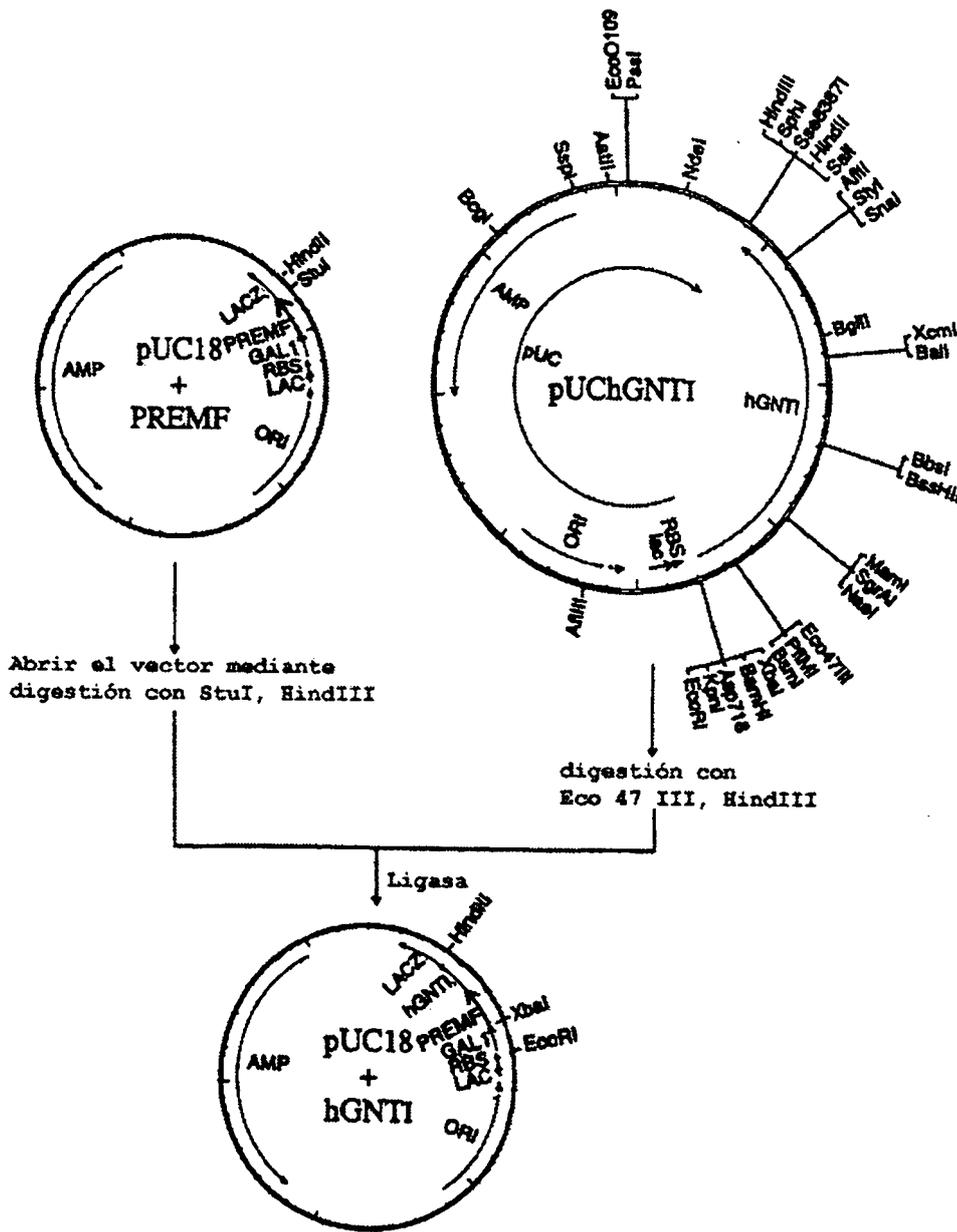


FIG. 1A



(Tras la secuencia señal de PREMF)

FIG. 4C

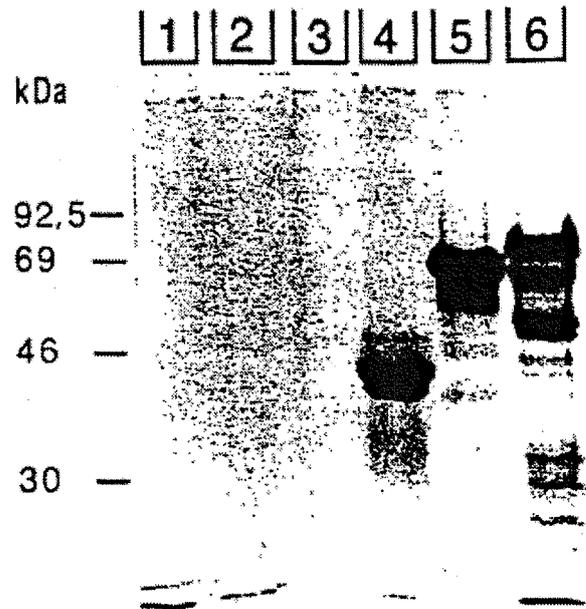


FIG 5

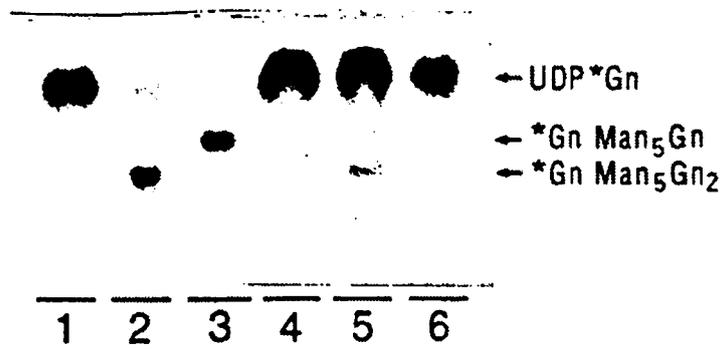


FIG 6

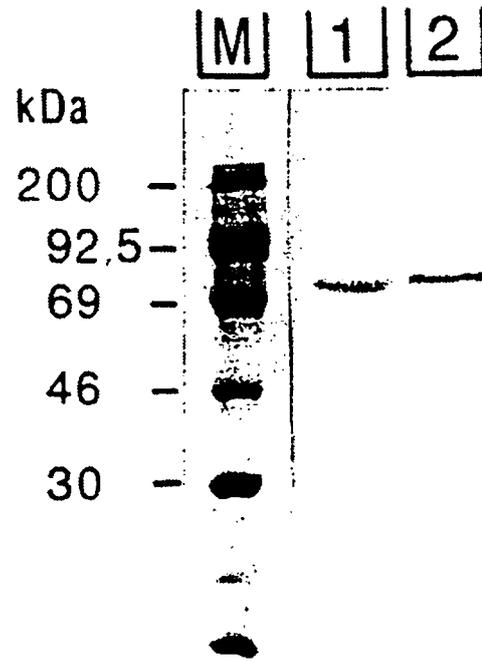


FIG 7

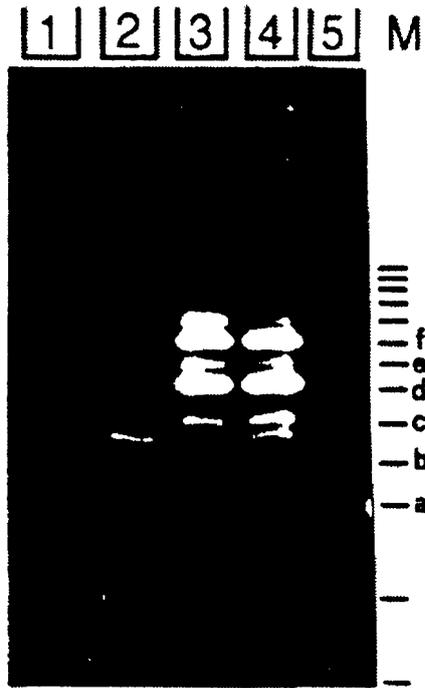


FIG 8

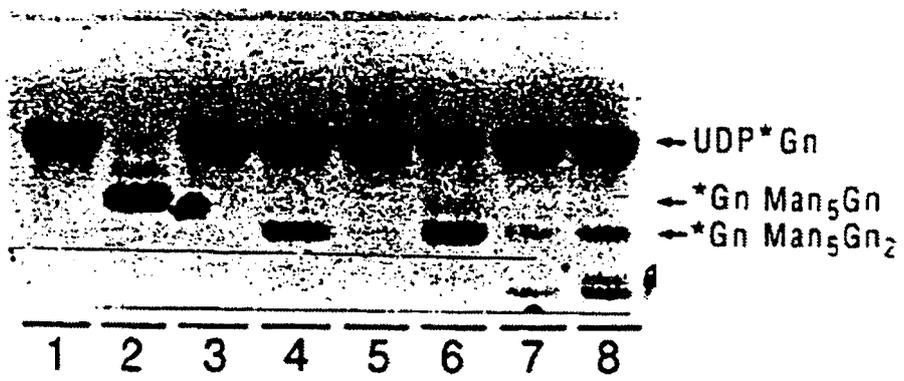


FIG 9

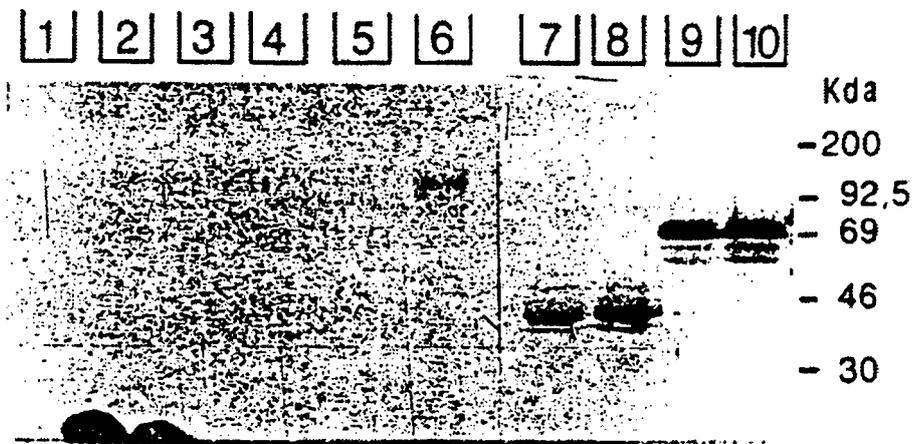


FIG 10

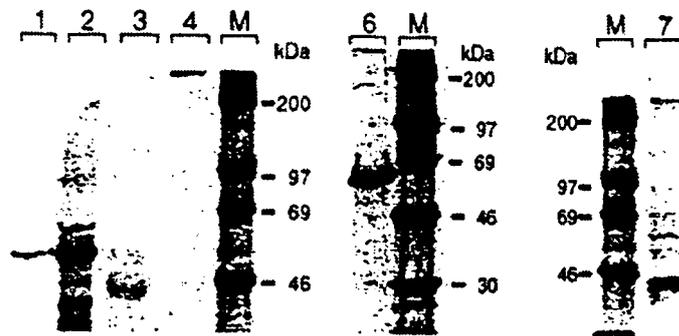


FIG 11

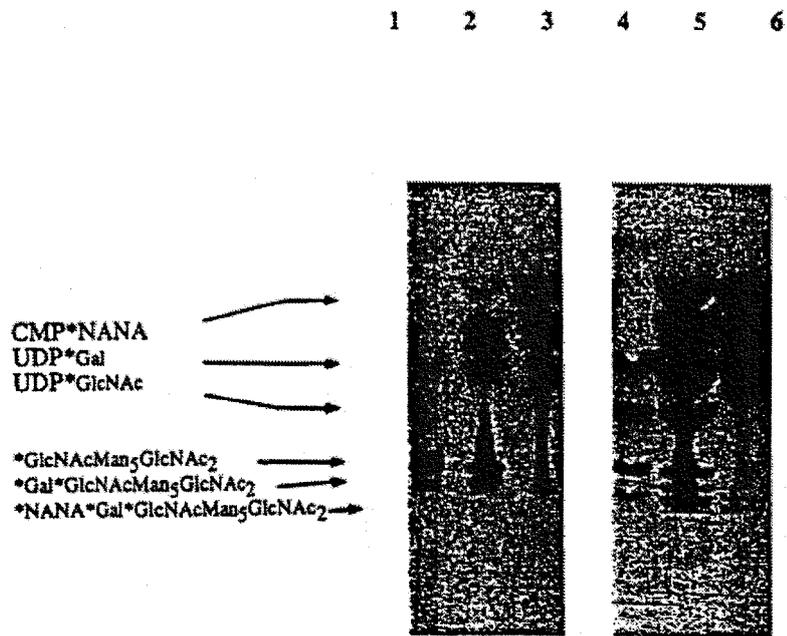


FIG 12

ES 2 260 768 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Métodos para modificar restos de hidratos de carbono
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO
 - (B) CALLE
 - 15 (C) CIUDAD
 - (D) ESTADO
 - (E) PAÍS
 - (F) CÓDIGO POSTAL
- 20 (v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patentin Release nº 1.0, Versión nº 1.30
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE:
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO:
 - 40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/SUMARIO
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE COMUNICACIONES TELEFÓNICAS:
- 45 (A) TELÉFONO:
 - (B) TELEFAX:

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
 - 55 (D) TOPOLOGÍA: no relevante
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

60 CCAGGATGCT GAAGAAGCAG TCTGCA

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 260 768 T3

(C) TIPO DE HEBRA: no relevante

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

5

CCAGTCGACA GGTGCTAATT CCAGCTAG

28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 41 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15

(C) TIPO DE HEBRA: no relevante

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

25

Met Leu Lys Lys Gln Ser Ala Gly Leu Val Leu Trp Gly Ala Ile Leu
1 5 10 15

Phe Val Ala Trp Asn Ala Leu Leu Leu Leu Phe Phe Trp Thr Arg Pro
20 25 30

Ala Pro Gly Arg Pro Pro Ser Val Ser
35 40

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 255 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: no relevante

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA

45

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..255

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

50

55

60

65

ES 2 260 768 T3

ATG ACA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC 48
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 5
 GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA 96
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 10
 ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC 144
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 15
 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG 192
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 20
 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC ACC ATT CCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA 240
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 25
 TCT TTG GAT AAA AGG 255
 Ser Leu Asp Lys Arg
 85

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 85 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 45
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 50
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 55
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 65
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 85
 Ser Leu Asp Lys Arg
 85