

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 465**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2006 E 06837184 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1954815**

54 Título: **Producción de glucoproteínas con O-glucosilación reducida**

30 Prioridad:

22.11.2005 US 737108 P

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

23.04.2015

73 Titular/es:

**GLYCOFI, INC. (100.0%)
21 LAFAYETTE STREET, SUITE 200
LEBANON NH 03766, US**

72 Inventor/es:

**BOBROWICZ, PIOTR;
COOK, JAMES W. y
KETT, WARREN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 465 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de glucoproteínas con O-glucosilación reducida

5 **Antecedentes de la invención****(1) Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a métodos para producir proteínas que tienen patrones específicos de glucosilación. En particular, la presente invención se refiere a métodos para producir proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida.

(2) Descripción de la técnica relacionada

15 Las glucoproteínas median muchas funciones esenciales en seres humanos y otros mamíferos, incluyendo catálisis, señalización, comunicación célula-célula, y reconocimiento y asociación molecular. Las glucoproteínas componen la mayoría de las proteínas no citosólicas en organismos eucariotas (Lis y Sharon, 1993, Eur. J. Biochem. 218:1-27). Muchas glucoproteínas se han explotado para propósitos terapéuticos, y durante las últimas dos décadas, versiones recombinantes de glucoproteínas de origen natural han sido una parte principal de la industria de biotecnología. Ejemplos de proteínas glucosiladas recombinantes usadas como agentes terapéuticos incluyen eritropoyetina (EPO), anticuerpos monoclonales (mAb) terapéuticos, activador de plasminógeno tisular (tPA), interferón- β (IFN- β), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y gonadotropina coriónica humana (hCH) (Cumming et al., 1991, Glycobiology 1:115-130). Variaciones en los patrones de glucosilación de glucoproteínas producidas de forma recombinante han sido recientemente el tópico de mucha atención en la comunidad científica como proteínas recombinantes producidas como enfoque profiláctico y terapéutico potencial en clínica.

25 En general, las estructuras de glucosilación de oligosacáridos de glucoproteína variarán dependiendo de la especie hospedadora de las células usadas para producirlos. Las proteínas terapéuticas producidas en células hospedadoras no humanas probablemente contienen glucosilación no humana que puede provocar una respuesta inmunogénica en seres humanos, por ejemplo, hipermanosilación en levaduras (Ballou, 1990, Methods Enzymol. 185:440-470); α (1,3)-fucosa y β (1,2)-xilosa en plantas, (Cabanés-Macheteau et al., 1999, Glycobiology, 9: 365-372); ácido N-glucosililneuramínico en células de ovario de hámster Chino (Noguchi et al., 1995, J. Biochem. 117: 5-62); y, glucosilación Ga1 α -1,3Gal en ratones (Borrebaeck, et al., 1993, Immun. Today, 14: 477-479). Las cadenas de carbohidrato unidas a proteínas en células animales incluyen cadenas de carbohidrato de tipo enlace N-glucósido (también llamados N-glucanos; o glucosilación N-ligada) unidas a un resto de asparagina (Asn) en la proteína y cadenas de carbohidrato tipo enlace O-glucósido (también llamados O-glucanos; o glucosilación O-ligada) unidas a un resto de serina (Ser) o treonina (Thr) en la proteína.

30 Como las estructuras oligosacáridas de glucoproteínas producidas por células de mamífero no humanas tienden a estar más estrechamente relacionadas con aquellas de glucoproteínas humanas, se producen glucoproteínas más comerciales en células de mamífero. Sin embargo, las células de mamífero tienen varias desventajas importantes como células hospedadoras para la producción de proteínas. Más allá de ser costosos, los procesos para producir proteínas en células de mamífero producen poblaciones heterogéneas de glucoformas, tienen bajos títulos volumétricos, y requieren tanto contención viral en curso como un tiempo significativo para generar líneas celulares estables.

35 Está bien reconocido que las glucoformas particulares en una proteína pueden afectar profundamente a las propiedades de la proteína, incluyendo su farmacocinética, farmacodinámica, interacción con receptor, y propiedades de direccionamiento específicas de tejido (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297). Por ejemplo, se ha demostrado que diferentes patrones de glucosilación de Ig están asociados con diferentes propiedades biológicas (Jefferis y Lund, 1997, Antibody Eng. Chem. Immunol., 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, Trends Biotechnol., 15: 26-32). Se ha demostrado adicionalmente que la galactosilación de una glucoproteína puede variar con las condiciones de cultivo celular, que pueden volver algunas composiciones de glucoproteína inmunogénicas dependiendo del patrón específico de galactosa en la glucoproteína (Patel et al., 1992, Biochem J. 285: 839-845). Sin embargo, como no se sabe cuál o cuáles glucoformas específicas contribuyen a una función biológica deseada, la capacidad de enriquecer glucoformas específicas en glucoproteínas es muy deseable. Como diferentes glucoformas están asociadas con diferentes propiedades biológicas, la capacidad de enriquecer glucoproteínas que tengan una glucoforma específica puede usarse para dilucidar la relación entre una glucoforma específica y una función biológica específica de la glucoproteína. Además, la capacidad de enriquecer glucoproteínas que tengan una glucoforma específica posibilita la producción de glucoproteínas terapéuticas que tengan especificidades particulares. Por tanto, la producción de composiciones de glucoproteína que estén enriquecidas en glucoformas particulares es muy deseable.

40 Aunque la vía de glucosilación N-ligada se ha sometido a mucho análisis, el proceso y función de glucosilación O-ligada aún no está tan bien comprendido. Sin embargo, se sabe que en contraste con la glucosilación N-ligada, la O-glucosilación es un evento post-traducciona, que sucede en el *cis*-Glogi (Varki, 1993, Glycobiol., 3: 97-130). Aunque

no parece existir una secuencia aceptora consenso para glucosilación O-ligada como para la glucosilación N-ligada, una comparación de secuencias de aminoácidos respecto a una gran cantidad de sitios de glucosilación O-ligada de varias glucoproteínas muestra una frecuencia aumentada de restos de prolina en las posiciones -1 y +3 respecto a los restos glucosilados y un marcado aumento de restos de serina, treonina y alanina (Wilson et al., 1991, Biochem. J., 275: 529-534). Tramos de restos de serina y treonina en glucoproteínas, también pueden ser sitios potenciales para O-glucosilación.

Una familia de genes que tiene un papel de glucosilación O-ligada son los genes que codifican la Dol-P-Man:Proteína (Ser/Thr) Manosil Transferasa (Pmt). Estos genes altamente conservados se han identificado tanto en eucariotas superiores tales como seres humanos, roedores, insectos y similares así como en eucariotas inferiores tales como hongos y similares. Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* codifican hasta siete genes *PMT* que codifican homólogos Pmt (revisado en Willer et al. Curr. Opin. Struct. Biol. 2003 Oct;13(5): 621-30.). En levaduras, la glucosilación O-ligada empieza por la adición de la manosa inicial a partir de dolicol-fosfato manosa a un resto de serina o treonina de una glucoproteína naciente en el retículo endoplasmático por uno de los siete genes de O-manosil transferasa. Aunque parece haber siete genes *PMT* que codifican homólogos Pmt e levaduras, la O-manosilación de proteínas fúngicas y heterólogas secretadas en levaduras es principalmente dependiente de los genes que codifican Pmt1 y Pmt2, que parecen funcionar como heterodímeros. *PMT1* y *PMT2* y sus productos proteicos, Pmt1 y Pmt2, respectivamente, parecen estar altamente conservados entre especies.

Tanner et al. en la patente de Estados Unidos Nº 5.714.377 describe los genes *PMT1* y *PMT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y un método para preparar proteínas recombinantes que tengan glucosilación O-ligada reducida que usa células fúngicas en que uno o más genes *PMT* se han modificado genéticamente de modo que se produzcan proteínas recombinantes, que tienen glucosilación O-ligada reducida.

Ng et al. en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos Nº 20020068325 describe inhibición de O-glucosilación a través del uso de antisentido o cosupresión o a través de la modificación por ingeniería de cepas hospedadoras de levadura que han perdido mutaciones funcionales en genes asociados con glucosilación O-ligada, en particular, uno o más de los genes *PMT*.

Las UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetil galactosaminil-transferasas (GalNAc-transferasas) están implicadas en la glucosilación O-ligada tipo mucina encontrada en eucariotas superiores. Estas enzimas inician la O-glucosilación de aminoácidos específicos de serina y treonina en proteínas añadiendo N-acetilgalactosamina al grupo hidroxilo de estos aminoácidos al cual después pueden añadirse restos de manosa de un modo por etapas. Clausen et al. en la patente de Estados Unidos Nº 5.871.990 y la solicitud de patente publicada de Estados Unidos Nº 20050026266 describen una familia de ácidos nucleicos que codifican UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamine:polipéptido N-acetil galactosaminil-transferasas (GalNAc-transferasas). Clausen en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos Nº 20030186850 describe el uso de GalNAc-beta-benzilo para inhibir selectivamente lectinas de polipéptido GalNAc-transferasas y no servir como sustratos para otras glucosiltransferasas implicadas en biosíntesis de O-glucanos, inhibiendo de este modo la O-glucosilación.

Se han descrito inhibidores de glucosilación O-ligada. Por ejemplo, Orchard et al. en la patente de Estados Unidos Nº 7.105.554 describe benzilideno tiazolidinadionas y su uso como agentes antimicóticos, por ejemplo, agentes antifúngicos. Se ha informado que estas benzilideno tiazolidinadionas inhiben la enzima Pmt1, evitando la formación de las manoproteínas O-ligadas y comprometiendo la integridad de la pared celular fúngica. El resultado final es el hinchamiento celular y finalmente la muerte a través de ruptura.

Konrad et al. en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos Nº 20020128235 describe un método para tratar o prevenir la diabetes mellitus por inhibición farmacológica de glucosilación de proteínas O-ligada en un tejido o célula. El método depende del tratamiento de un individuo diabético con (Z)-1-[N-(3-Amoniopropil)-N-(n-propil)amino] diazenio-1,2-diolato o un derivado del mismo, que se une a N-acetilglucosamina O-ligada transferasa e inhibe de este modo la glucosilación O-ligada.

Kojima et al. en la patente de Estados Unidos Nº 5.268.364 describe composiciones terapéuticas para la inhibición de O-glucosilación usando compuestos tales como bencilo- α -N-acetilgalactosamina, que inhibe la extensión de O-glucosilación conduciendo a acumulación de O- α -GalNAc, para bloquear la expresión de SLe^x o SLe^a por leucocitos o células tumorales e inhibir de este modo la adhesión de estas células a células endoteliales y plaquetas.

Boime et al. en la patente de Estados Unidos Nº 6.103.501 describe variantes de hormonas en que la glucosilación O-ligada estaba alterada por modificación de la secuencia de aminoácidos en el sitio de glucosilación.

Los presentes inventores han descubierto que compuestos químicos particulares que son inhibidores de proteínas Pmt, que son generalmente letales para los hongos, pueden usarse de un modo que no es letal para las células hospedadoras para la producción de proteínas recombinantes con glucosilación O-ligada reducida. Esto posibilita controlar la glucosilación O-ligada de proteínas producidas en hongos y células de levadura. Otras clases de compuestos químicos, que los inventores creen que son inhibidores no letales de las enzimas *PMT*, también son útiles en la producción de glucoproteínas mejoradas con glucosilación O-ligada reducida. Los presentes inventores

han descubierto adicionalmente que la adición a la célula hospedadora o cultivo celular de ciertas clases de enzimas, concretamente, α -1,2-manosidasas, solas o en combinación con un inhibidor químico de proteínas Pmt realiza una reducción adicional de la O-glucosilación.

5 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona métodos para producir proteínas y glucoproteínas que tienen patrones específicos de glucosilación. En particular, la presente invención proporciona un método para preparar composiciones de proteína recombinante en una célula hospedadora en que la glucosilación O-ligada de la proteína recombinante se reduce poniendo en contacto las células hospedadoras con uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt de proteínas en la célula hospedadora o poniendo en contacto las células hospedadoras o la proteína recombinante con una o más α -1,2-manosidasas, o ambas. La cantidad de glucosilación O-ligada de la proteína o glucoproteína recombinante se reduce en comparación con la cantidad de glucosilación O-ligada de la proteína o glucoproteína recombinante producida por la célula hospedadora en ausencia del inhibidor.

Glucosilación O-ligada mediada por Pmt se refiere a glucosilación O-ligada donde la transferencia de restos de manosa a los restos de serina o treonina de una proteína está mediada por una proteína-O-D-manosiltransferasa (Pmt) u homólogo codificado por un gen *PMT* o su homólogo. Los inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt incluyen inhibidores que inhiben uno cualquiera de los homólogos de los genes *PMT*. En un aspecto actualmente preferido, el inhibidor inhibe al menos la actividad Pmt1 y/o Pmt2 de hongos y levaduras, o el correspondiente homólogo en otros organismos, incluyendo aunque sin limitación, mamíferos, plantas, e insectos.

Actualmente, es preferible que la cantidad de glucosilación O-ligada se haya reducido a través del uso de un inhibidor químico, por ejemplo, un inhibidor químico abarcado por la clase de agentes químicos llamados bencilideno tiazolidinadonas. En realizaciones particulares, el inhibidor químico se selecciona entre el grupo que consiste en ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; 3-hidroxi-4-(2-feniletotoxi)benzaldehído; 3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)-benzaldehído; ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxi)etoxi]-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético.

La invención proporciona el método para producir una proteína que tenga glucosilación O-ligada reducida que comprende:

- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una glucoproteína y un segundo ácido nucleico que codifica una α 1,2-manosidasa;
- (b) introducir el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en una célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora que contiene el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico para producir un cultivo de la célula hospedadora;
- (c) poner en contacto el cultivo de la célula hospedadora con uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt; y
- (d) aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos adicionales, se proporciona un método para producir composiciones de proteína recombinante que tienen glucosilación O-ligada reducida, que usan uno o más inhibidores de las proteínas Pmt implicadas en glucosilación O-ligada y/o una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida. Las α -1,2-manosidasas actualmente preferidas pueden aislarse de células eucariotas, incluyendo células de mamífero y de levadura. En realizaciones actualmente preferidas, la α -1,2-manosidasa es la producida por *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces* sp., o *Aspergillus* sp. En otras realizaciones actualmente preferidas, la α -1,2-manosidasa puede producirse a partir de una construcción quimérica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio catalítico de una α -1,2-manosidasa unido de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de direccionamiento celular no asociado normalmente con el dominio catalítico. En otras realizaciones, la α -1,2-manosidasa puede producirse por separado y añadir al cultivo celular, o puede producirse por co-expresión de la α -1,2-manosidasa con la glucoproteína recombinante.

En aspectos particulares del método, la composición de proteína recombinante comprende una glucoproteína que tiene glucosilación N-ligada donde la glucoproteína recombinante incluye al menos una N-glucoforma predominante y tiene glucosilación O-ligada reducida. Por lo tanto, se describen adicionalmente composiciones de glucoproteína que comprenden una especie predominante de estructura de N-glucono y que tienen glucosilación O-ligada reducida en comparación con composiciones de la glucoproteína que se ha producido en células hospedadoras que no se han incubado en presencia de un inhibidor de glucosilación O-ligada mediada por Pmt o una α -1,2-manosidasa capaz de recortar más de un resto de manosa de una estructura de glucono. En aspectos particulares, la composición de glucoproteína comprende una glucoproteína que tiene una estructura predominante de N-glucono seleccionada entre el grupo que consiste en las glucoformas $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $(\text{GalGlc}$

NAC)₂Man₅GlcNAc₂, NANAGalGlcNAcMan₃GlcNAc₂, NANA₂Gal₂GlcNAcMan₃GlcNAc₂, y GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂. Un aspecto importante del método es que proporciona una composición de glucoproteína que comprende glucosilación O-ligada reducida y predominantemente una glucoforma N-ligada específica en que la glucoproteína recombinante puede mostrar actividad biológica aumentada y/o inmunogenicidad indeseada disminuida respecto a composiciones de la misma glucoproteína producida a partir de cultivo celular de mamífero, tal como células CHO. Una ventaja adicional de producir la composición de glucoproteína que comprende glucosilación O-ligada reducida y una glucoforma N-ligada predominante es que evita la producción de glucoformas indeseadas o inactivas y mezclas heterogéneas, que pueden inducir efectos indeseados y/o diluir la glucoforma más eficaz. Por tanto, composiciones farmacéuticas terapéuticas de moléculas glucoproteicas que comprenden, por ejemplo, predominantemente las glucoformas Man₅GlcNAc₂, Man₃GlcNAc₂, GlcNAcMan₅GlcNAc₂, GlcNAcMan₃GlcNAc₂, GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂, GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂, Gal(GlcNAc)₂Man₅GlcNAc₂, (GalGlcNAc)₂Man₅GlcNAc₂, NANAGalGlcNAcMan₃GlcNAc₂, NANA₂Gal₂GlcNAcMan₃GlcNAc₂, y GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂ y que tienen glucosilación O-ligada reducida pueden ser muy eficaces a dosis inferiores, teniendo de este modo mayor eficacia/potencia.

Por lo tanto, se proporciona un método para producir una proteína que tenga glucosilación O-ligada reducida que comprende proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína; introducir el ácido nucleico en una célula hospedadora para proporcionar un cultivo de la célula hospedadora; poner en contacto el cultivo con uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt; y aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del inhibidor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos particulares del método, el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt o el cultivo se cultiva en presencia del uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt en el momento en que se establece el cultivo.

En un aspecto adicional del método, el ácido nucleico que codifica la proteína se une de forma funcional a un promotor inducible. Después el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y un inductor del promotor para inducir la expresión de la proteína y aislar la proteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o el cultivo se pone en contacto con un inductor del promotor para inducir la expresión de la proteína durante un tiempo antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y aislar la proteína producida por la célula hospedadora en presencia del inhibidor y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

Se proporciona adicionalmente un método para producir una proteína que tenga glucosilación O-ligada reducida que comprende proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína; introducir el ácido nucleico en una célula hospedadora para proporcionar un cultivo de la célula hospedadora; poner en contacto el cultivo con una o más enzimas α -1,2-manosidasa; y aislar la proteína producida por la célula hospedadora en presencia de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la glucoproteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos particulares del método, el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con la una o más enzimas α -1,2-manosidasa. En otros aspectos, el cultivo se cultiva en presencia de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa.

En aspectos adicionales del método, se proporciona un segundo ácido nucleico que codifica la una o más enzimas α -1,2-manosidasa y se introduce el segundo ácido nucleico en la célula hospedadora. En aspectos particulares, se proporciona un segundo ácido nucleico que codifica la una o más enzimas α -1,2-manosidasa unido de forma funcional a un promotor inducible y se introduce el segundo ácido nucleico en la célula hospedadora y el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras antes de inducir la expresión de la proteína y la una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o la expresión de la proteína se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la proteína para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

Se proporciona adicionalmente un método para producir una proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida que comprende proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína unido de forma funcional a un promotor inducible; introducir el ácido nucleico en una célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora que contiene el ácido nucleico para producir un cultivo de la célula hospedadora; poner en contacto el cultivo con uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y una o más de una o más enzimas α -1,2-manosidasa; y aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores y la una o más de una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos particulares del método, el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt o el cultivo se cultiva en presencia del uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt en el momento en que se establece el cultivo.

En un aspecto adicional del método, el ácido nucleico que codifica la proteína se une de forma funcional a un promotor inducible. Después el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y un inductor del promotor para inducir la expresión de la proteína y aislar la proteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o el cultivo se pone en contacto con un inductor del promotor para inducir la expresión de la proteína durante un tiempo antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y aislar la proteína producida por la célula hospedadora en presencia del inhibidor y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos particulares del método, el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con la una o más enzimas α -1,2-manosidasas. En otros aspectos, el cultivo se cultiva en presencia de la una o más enzimas α -1,2-manosidasas.

En aspectos adicionales del método, se proporciona un segundo ácido nucleico que codifica la una o más enzimas α -1,2-manosidasas y se introduce el segundo ácido nucleico en la célula hospedadora. En aspectos particulares, se proporciona un segundo ácido nucleico que codifica la una o más enzimas α -1,2-manosidasas unido de forma funcional a un promotor inducible y se introduce el segundo ácido nucleico en la célula hospedadora y el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras antes de inducir la expresión de la proteína y la una o más enzimas α -1,2-manosidasas para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o la expresión de la proteína se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasas para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida o la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasas se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la proteína para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.

En aspectos adicionales de los anteriores métodos que usan uno o más inhibidores de una proteína Pmt, actualmente, se prefiere seleccionar el uno o más inhibidores entre la clase de moléculas que comprende bencilideno tiazolidinadionas. Actualmente, es preferible seleccionar el uno o más inhibidores entre el grupo que consiste en ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metil-ene]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; y ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxi)etoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético.

En aspectos particulares de los métodos anteriores que usan una α -1,2-manosidasas, actualmente es preferible que la α -1,2-manosidasas se seleccione entre el grupo que consiste en *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces* sp., y *Aspergillus* sp. Actualmente, es preferible que la α -1,2-manosidasas sea de *Trichoderma reesei*. Como alternativa, la célula hospedadora puede incluir además del primer ácido nucleico que codifica la proteína o glucoproteína, un segundo ácido nucleico, que codifica la α -1,2-manosidasas, unido de forma funcional a un promotor inducible. La expresión de la α -1,2-manosidasas y la proteína o glucoproteína puede inducirse simultáneamente o la expresión de la proteína o glucoproteína puede inducirse antes de la expresión de la α -1,2-manosidasas o viceversa.

Aunque el método puede realizarse usando cualquier célula hospedadora que produzca proteínas que tengan glucosilación O-ligada, en aspectos actualmente preferidos, la célula hospedadora es una célula eucariota inferior, preferiblemente una célula fúngica o una célula de levadura. Actualmente, se prefiere que la célula hospedadora se seleccione entre el grupo que consiste en células de *K. lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, y *Hansenula*. En otras realizaciones para producir glucoproteínas recombinantes en particular, la célula hospedadora es una célula de levadura o fúngica filamentosa que se ha modificado genéticamente para producir glucoproteínas con predominantemente una estructura particular de N-glucano. En aspectos particularmente preferidos, las células hospedadoras se modifican genéticamente de modo que expresen glucoproteínas recombinantes en que el patrón de glucosilación sea tipo humano o humanizado. En particular, las células hospedadoras pueden modificarse de modo que expresen glucoproteínas recombinantes que tengan predominantemente una estructura de N-glucano deseada particular. Una célula hospedadora eucariota inferior cuando se usa en este documento en relación con perfiles de glucosilación, se refiere a cualquier célula eucariota que habitualmente produce glucanos N-ligados de alto contenido de manosa, y por tanto incluye las células eucariotas inferiores más típicas, incluyendo células fúngicas y algas uni- y multi-celulares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el efecto de inhibidores de Pmt sobre la O-glucosilación de proteínas indicadoras recombinantes secretadas en *Pichia pastoris*. Los inhibidores químicos de Pmt reducen la O-glucosilación hasta un nivel similar al observado en una cepa que carece de PMT1. Se usó transferencia de Western usando un anticuerpo anti-polihistidina para detectar el dominio Kringle 1-3 humano (K1-3) marcado con His de plasminógeno humano en el medio de crecimiento de cepas de tipo silvestre (carriles 1-3) y pmt1 (carriles 4-5). Las bandas de migración más lenta (observadas como una mancha de mayor peso molecular para K1-3 en el carril 1) indican proteína O-glucosilada. Pmti-1, inhibidor 1 de PMT.

La Figura 2 muestra una transferencia de Western que demuestra el efecto de α -manosidasa de *T. reesei* y el inhibidor químico Pmti-2 sobre la O-glucosilación de polipéptidos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina. Tanto la α -manosidasa de *T. reesei* como los inhibidores químicos de Pmt redujeron el nivel de O-glucosilación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para expresar una proteína recombinante (incluye polipéptidos y glucoproteínas), que es susceptible a glucosilación O-ligada en una célula hospedadora particular, que tiene una cantidad reducida de glucosilación O-ligada (incluyendo glucosilación no O-ligada) en ese tipo celular. El método implica inducir la expresión de una proteína de interés en una célula hospedadora en que la proteína es susceptible a glucosilación O-ligada en la célula hospedadora en presencia de un inhibidor químico de la actividad de una o más proteínas Dol-P-Man:Proteína (Ser/Thr) Manosil Transferasa (Pmt) implicadas en la transferencia de manosa a un resto de serina o treonina de la proteína en la célula o una o más α 1,2-manosidasas, o ambas, en el momento en que se induce la expresión de la proteína. La proteína que se expresa en presencia del inhibidor o la una o más α 1,2-manosidasas tiene una cantidad reducida de glucosilación O-ligada en comparación con la cantidad de glucosilación O-ligada que estaría presente en la proteína si se hubiera producido en ausencia del inhibidor o la una o más α 1,2-manosidasas, o ambos. El método es particularmente útil porque proporciona un medio para producir proteínas terapéuticamente relevantes donde se desea que la proteína tenga una cantidad reducida de O-glucosilación en células hospedadoras tales como eucariotas inferiores, por ejemplo levaduras, y bacterias, que normalmente producirían proteínas con glucanos O-ligados, que tienen una cantidad reducida de glucanos O-ligados. Sin embargo, aunque el método es especialmente adecuado para expresar proteínas con glucosilación O-ligada reducida en organismos eucariotas inferiores, el método también puede ponerse en práctica en organismos eucariotas superiores y bacterias.

El método es una mejora sobre los métodos de la técnica previa para producir proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida en células hospedadoras en que las proteínas son susceptibles a glucosilación O-ligada. Por ejemplo, Tanner et al. en la patente de Estados Unidos N° 5.714.377 describe un método para preparar proteínas recombinantes que tienen glucosilación O-ligada reducida usando células fúngicas tales como células de levadura en que uno o más genes PMT que codifican la proteína Pmt se han modificado genéticamente de modo se producen proteínas recombinantes, que tienen glucosilación O-ligada reducida. Aunque la delección de cualquiera de los genes *PMT1* o *PMT2* en una célula hospedadora fúngica posibilita la producción de una proteína recombinante que tiene glucosilación O-ligada reducida en la célula hospedadora fúngica, la expresión de los genes *PMT1* y *PMT2* es importante para células hospedadoras cultivadas y cualquier delección individual también afecta de forma adversa a la capacidad de la célula hospedadora fúngica de crecer haciendo por tanto difícil producir una cantidad suficiente de células hospedadoras o proteína recombinante con una cantidad reducida de glucosilación O-ligada. La delección de ambos genes parece ser letal para la célula hospedadora fúngica. Por lo tanto, la eliminación genética de los genes *PMT1* y *PMT2* en una célula hospedadora parecería ser un medio indeseable para producir proteínas recombinantes que tengan glucosilación O-ligada reducida.

En contraste, los genes *PMT* en las células hospedadoras usadas en el método de la presente invención no se han modificado o delecionado, lo que posibilita que la célula hospedadora O-glucosile aquellas proteínas que son importantes para el crecimiento celular hasta el momento en que se inhibe la actividad de las proteínas Pmt. En general, esto posibilita que las células hospedadoras crezcan hasta niveles mayores que los niveles que podrían obtenerse si los genes *PMT* se hubieran delecionado. Además, en realizaciones particulares, la expresión de la proteína recombinante en la célula hospedadora se controla mediante un promotor inducible y la actividad Pmt en la célula hospedadora no se inhibe o se añade una o más α 1,2-manosidasas, o ambos, hasta que induzca la expresión de la proteína recombinante. Esto posibilita la producción de grandes cantidades de células hospedadoras que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en cultivo antes de inducir la expresión de la proteína recombinante y añadir el inhibidor de Pmt y/o una o más α 1,2-manosidasas. Esto puede posibilitar la producción de cantidades mayores de proteína recombinante que tiene glucosilación O-ligada reducida en el cultivo en un periodo más corto de tiempo que lo que sucedería para células hospedadoras en que se han delecionado uno o más genes *PMT* y han crecido mal en cultivo.

Esta mejora sobre la técnica previa también facilita la producción de glucoproteínas que tiene glucosilación O-ligada reducida en células hospedadoras que se han modificado genéticamente para producir glucoproteínas que tienen predominantemente una estructura particular de glucano N-ligado pero que también O-glucosilan la glucoproteína.

Se han descrito métodos para producir una amplia diversidad de glucoproteínas que tienen predominantemente glucoformas N-ligadas particulares en la patente de Estados Unidos N° 7.029.872 y las solicitudes publicadas de Estados Unidos N° 20050170452, 20050260729, 20040230042, 20050208617, 20050208617, 20040171826, 20060160179, 20060040353, y 20060211085. Puede usarse una cualquiera de las células hospedadoras descritas en la patente y solicitudes de patente mencionadas anteriormente para producir una glucoproteína que tiene predominantemente una estructura particular de glucano N-ligado y que tiene glucosilación O-ligada reducida usando el método descrito en este documento. Se ha descubierto que algunas células hospedadoras que se han modificado genéticamente para producir glucoproteínas que tienen predominantemente una estructura particular de glucano N-ligado puede crecer menos bien en cultivo en condiciones particulares que células hospedadoras que no se han modificado. Por ejemplo, células fúngicas y de levadura particulares en que genes implicados en la hiperanosilación se han deletado y otros genes necesarios para producir estructuras particulares de glucano N-ligado de tipo mamífero o humano se han añadido, pueden crecer menos bien que células fúngicas o de levadura que no tienen las modificaciones genéticas. En algunas de estas células fúngicas o de levadura modificadas genéticamente, la introducción adicional de deletaciones de los genes *PMT1* o *PMT2* es letal para las células o afecta de forma adversa a la capacidad de las células de crecer hasta cantidades suficientes en cultivo. El método de este documento evita los efectos nocivos potenciales de deletar los genes *PMT1* y *PMT2* permitiendo que las células crezcan hasta cantidades suficientes en cultivo antes de inducir la expresión de la glucoproteína recombinante y añadir un inhibidor de la actividad de las proteínas Pmt, o una o más α 1,2-manosidasas, o ambos, para producir la glucoproteína recombinante que tiene predominantemente estructuras particulares de glucano N-ligado y glucosilación O-ligada reducida.

Por lo tanto, un aspecto importante del método es que proporciona una composición de glucoproteína que comprende glucosilación O-ligada reducida y una glucoforma N-ligada específica predominante en que la glucoproteína recombinante puede mostrar actividad biológica aumentada y/o inmunogenicidad indeseada disminuida respecto a composiciones de la misma glucoproteína producida a partir de cultivo celular de mamífero, tal como células CHO. Una ventaja adicional de producir la composición de glucoproteína que comprende glucosilación O-ligada reducida y una glucoforma N-ligada predominante es que evita la producción de glucoformas indeseadas o inactivas y mezclas heterogéneas, lo que puede inducir efectos indeseados y/o diluir la glucoforma más eficaz. Por tanto, composiciones farmacéuticas terapéuticas de moléculas glucoproteicas que comprenden, por ejemplo, predominantemente las glucoformas $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, y $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ y que tienen glucosilación O-ligada reducida pueden ser muy eficaces a dosis inferiores, teniendo de este modo mayor eficacia/potencia.

En general, el método para producir proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida comprende transformar una célula hospedadora con un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante o heteróloga en que es deseable producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida. El ácido nucleico que codifica la proteína recombinante está unido de forma funcional a secuencias reguladoras que permiten la expresión de la proteína recombinante. Dichas secuencias reguladoras incluyen un promotor inducible y opcionalmente un potenciador cadena arriba, o 5', al ácido nucleico que codifica la proteína de fusión y un sitio de terminación de la transcripción 3' o cadena abajo del ácido nucleico que codifica la proteína recombinante. El ácido nucleico también codifica normalmente una región UTR 5' que tiene un sitio de unión al ribosoma y una región no traducida 3'. El ácido nucleico a menudo es un componente de un vector replicable en células en que se expresa la proteína recombinante. El vector también puede contener un marcador para permitir el reconocimiento de células transformadas. Sin embargo, algunos tipos celulares, particularmente levaduras, pueden transformarse satisfactoriamente con un ácido nucleico que carece de secuencias externas de vector.

Los ácidos nucleicos que codifican proteínas recombinantes deseadas pueden obtenerse de varias fuentes. Pueden amplificarse secuencias de ADNc a partir de líneas celulares que se sabe que expresan la proteína usando cebadores para regiones conservadas (véase, por ejemplo, Marks et al., J. Mol. Biol. 581-596 (1991)). También pueden sintetizarse ácidos nucleicos de novo basándose en secuencias de la bibliografía científica. También pueden sintetizarse ácidos nucleicos por extensión de oligonucleótidos solapantes que abarcan una secuencia deseada (véase, por ejemplo, Caldas et al., Protein Engineering, 13, 353-360 (2000)).

En un aspecto, el ácido nucleico que codifica la proteína se une de forma funcional a un promotor inducible, que permite inducir la expresión de la proteína cuando se desee. En otro aspecto, el ácido nucleico que codifica la proteína se une de forma funcional a un promotor constitutivo. Para facilitar el aislamiento de la proteína expresada, actualmente es preferible que la proteína incluya una secuencia señal que dirija la proteína para excretarse en el medio de cultivo celular donde después puede aislarse. En el primer aspecto, las células hospedadoras transformadas se cultivan durante un tiempo suficiente para producir una multiplicidad deseada de células hospedadoras suficiente para producir la cantidad deseada de proteína antes de añadir uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt al medio de cultivo. El inductor e inhibidor pueden añadirse al cultivo simultáneamente o el inductor se añade al cultivo antes de añadir el uno o más inhibidores de Pmt o el uno o más inhibidores de Pmt se añaden al cultivo antes de añadir el inductor. La proteína inducida se produce teniendo glucosilación O-ligada reducida y puede recuperarse del medio de cultivo o para proteínas que no tienen una

secuencia señal, de la célula hospedadora por lisis. En el segundo aspecto, donde el ácido nucleico que codifica la proteína está unido de forma funcional a un promotor constitutivo, el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt se añaden al medio de cultivo al mismo tiempo que se establece el cultivo y la proteína, que se produce teniendo glucosilación O-ligada reducida, puede recuperarse del medio de cultivo o para proteínas que no tienen una secuencia señal, de la célula hospedadora por lisis. Un ejemplo que ilustra el método usando un promotor inducible se muestra en el Ejemplo 2 y un ejemplo que ilustra el método usando un promotor constitutivo se muestra en el Ejemplo 3.

Inhibidores útiles para producir proteínas con glucosilación O-ligada reducida son agentes químicos o composiciones que inhiben la actividad de una o más de las proteínas Pmt. Cuando la célula hospedadora es un eucariota inferior tal como hongos o levaduras, es deseable que el inhibidor inhiba al menos la actividad de Pmt1 o Pmt2, o ambos. En eucariotas superiores, es deseable que el inhibidor inhiba la actividad del homólogo en el eucariota superior que corresponde a Pmt1 o Pmt2. Inhibidores químicos que pueden usarse incluyen las benzilideno tiazolidinadionas identificadas en la patente de Estados Unidos Nº 7.105.554, que incluye ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; 3-hidroxi-4-(2-feniletotoxi)benzaldehído; 3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)-benzaldehído; y, ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxi)etoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético. Otros compuestos que pueden ser útiles son los compuestos estructuralmente similares descritos en Voss et al. en el documento WO 94/29287, que describe métodos para preparar ácidos carboxílicos de arilideno-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidina y que se describe que son útiles en la profilaxis y tratamiento de efectos tardíos de diabetes así como la profilaxis y tratamiento de aterosclerosis y arterioesclerosis y en Esswein et al. en la patente de Estados Unidos Nº 6.673.816, que describe métodos para preparar derivados de ácidos rodaninacarboxílicos y su uso para el tratamiento de trastornos óseos metabólicos.

En los ejemplos, se muestran inhibidores químicos seleccionados entre el grupo que consiste en ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; y, ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxi)etoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético que son eficaces en producir proteínas recombinantes que tienen glucosilación O-ligada reducida en cepas de *Pichia pastoris* que tienen genes *PMT1* y *PMT2* funcionales intactos. La Tabla 1 del Ejemplo 2 muestra que uno cualquiera de los tres inhibidores químicos anteriores de Pmt añadidos a un cultivo de *Pichia pastoris* recombinante que tiene genes *PMT1* y *PMT2* funcionales intactos y transformada con un ácido nucleico que codifica una proteína Kringle 1-3 secretable recombinante unida de forma funcional a un promotor inducible en el momento de la inducción de la expresión de la proteína recombinante, produce una proteína recombinante que tiene un nivel de glucosilación O-ligada reducida que era comparable con el nivel de glucosilación O-ligada observada para células de *Pichia pastoris* que contienen una delección del gen *PMT1* o *PMT2*. Los inhibidores Pmti anteriores se han usado en cantidades de aproximadamente 0,03 µM a 20 µM para producir proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida en comparación con la cantidad de glucosilación O-ligada en la proteína cuando se cultiva en cultivos celulares hospedadores similares en ausencia de inhibidores Pmti. Los resultados mostrados en el Ejemplo 3 muestran adicionalmente que los cultivos celulares hospedadores pueden cultivarse en presencia de inhibidor Pmti a una cantidad que es suficiente para inhibir la glucosilación O-ligada sin eliminar las células hospedadoras.

El método puede incluir añadir al medio de cultivo que contiene el uno o más inhibidores de una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la proteína recombinante que tiene glucosilación O-ligada reducida. Las α -1,2-manosidasas son una familia conservada de enzimas eucariotas para la maduración de N-glucanos, que son capaces de recortar $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ en levaduras. (Vallee et al., 2000, EMBO J., 19: 581-588). Las α -1,2-manosidasas también son conocidas como α -manosidasas de clase I y se han identificado en mamíferos, especies de eucariotas inferiores, y células de insecto (Kawar et al., 2000, Glycobiology 10: 347-355). Se sabe que las células de mamífero tienen varias α -manosidasas de clase I, algunas de las cuales son capaces de recortar múltiples restos de manosa (Moremen et al., 1994, Glycobiology 4: 113-125), mientras que las levaduras parecen tener menos α -1,2-manosidasas más especializadas. Por ejemplo, se ha descrito que *Saccharomyces* tiene una única α -1,2-manosidasa codificada por MNN1, que retira un resto específico de manosa (por ejemplo, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) (Herscovics, 1999, Biochim Biophys Acta., 1473: 96-107). Por tanto, la α -1,2-manosidasa endógena presente en muchos eucariotas inferiores tales como hongos y levaduras y que no puede retirar múltiples restos de manosa de estructuras de glucano, no es capaz de posibilitar la producción de proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida. Por lo tanto, el método de este documento requiere la introducción en el medio de cultivo que contiene las células hospedadoras de una α -1,2-manosidasa capaz de recortar múltiples restos de manosa de un glucano O-ligado o la introducción en la célula hospedadora de un ácido nucleico que codifique una α -1,2-manosidasa capaz de recortar múltiples restos de manosa de un glucano O-ligado. La α -1,2-manosidasa de este documento incluye la α -1,2-manosidasa nativa intacta; una α -1,2-manosidasa modificada para potenciar su actividad α -1,2-manosidasa; una α -1,2-manosidasa modificada para disminuir su actividad α -1,2-manosidasa; y una α -1,2-manosidasa recombinante que comprende al menos el dominio catalítico que tiene la actividad α -1,2-manosidasa (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el dominio catalítico que tiene la actividad α -1,2-manosidasa fusionada a proteínas, polipéptidos o péptidos heterólogos).

En realizaciones particulares, la α -1,2-manosidasa, que es capaz de recortar múltiples restos de manosa de un glucano O-ligado y que se añade al cultivo celular, se produce por *Trichoderma* sp., *Saccharomyces* sp., o *Aspergillus* sp. Actualmente, las α -1,2-manosidasas preferidas se obtienen de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*. *T. reesei* es también conocida como *Hypocrea jecorina*. En el Ejemplo 3, se usó una levadura transformada que comprende un casete de expresión, que expresa una α -1,2-manosidasa recombinante que comprende el dominio catalítico α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* fusionado a la secuencia pre-señal α MAT de *Saccharomyces cerevisiae*, para producir proteínas recombinantes que tienen glucosilación O-ligada reducida. Otro ejemplo de una α -1,2-manosidasa recombinante que podría usarse en el método de este documento para producir proteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida es la α -1,2-manosidasa recombinante de *Trichoderma reesei* descrita en Maras et al., 2000, J. Biotechnol. 77:255-263 donde se fusionó el dominio catalítico α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* con un péptido prepro-señal α MAT de *Saccharomyces cerevisiae*.

La α -1,2-manosidasa también puede producirse a partir de un ácido nucleico quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el dominio catalítico de una α -1,2-manosidasa, que es capaz de recortar múltiples restos de manosa de glucanos O-ligados, unida de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de direccionamiento celular que no está normalmente asociado con el dominio catalítico. El ácido nucleico quimérico puede unirse de forma funcional a un promotor constitutivo o inducible. El ácido nucleico quimérico se transforma en una célula hospedadora para producir la α -1,2-manosidasa, que después se aísla y después se añade al medio de cultivo que contiene células transformadas con el ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga en el momento en que se induce la expresión de la proteína. Como alternativa, la célula hospedadora se transforma con el ácido nucleico quimérico que codifica la α -1,2-manosidasa y el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante y que co-expresa la α -1,2-manosidasa y la proteína recombinante al mismo tiempo. En realizaciones particulares, tanto el ácido nucleico quimérico que codifica la α -1,2-manosidasa como el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante están ambos unidos de forma funcional a un promotor inducible. En otras realizaciones, uno o los dos promotores son constitutivos. El Ejemplo 3 ilustra el método donde se unen de forma funcional ácidos nucleicos que codifican tanto la α -1,2-manosidasa como la proteína recombinante a un promotor constitutivo, se introducen en una célula hospedadora, y después se incuba un cultivo de las células hospedadoras en presencia de uno o más inhibidores de Pmt para producir la proteína recombinante que tiene glucosilación O-ligada reducida. El Ejemplo 3 muestra adicionalmente que parece que el inhibidor Pmti y la α -1,2-manosidasa parecen reducir sinérgicamente la cantidad de glucosilación O-ligada en comparación con la cantidad de glucosilación O-ligada en presencia de cualquiera de ellos individualmente.

En aspectos particulares, la glucosilación O-ligada reducida puede realizarse añadiendo solamente la una o más α -1,2-manosidasas y no uno o más inhibidores de Pmt al medio de cultivo. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante se une de forma funcional a un promotor inducible, que permite inducir la expresión de la proteína recombinante cuando se desee. En otro aspecto, el ácido nucleico que codifica la proteína se une de forma funcional a un promotor constitutivo. Para facilitar el aislamiento de la proteína recombinante expresada, actualmente es preferible que la proteína incluya una secuencia señal que dirija la proteína recombinante para excretarse en el medio de cultivo celular donde después puede aislarse.

En el primer aspecto, las células hospedadoras transformadas se cultivan durante un tiempo suficiente para producir una multiplicidad deseada de células hospedadoras suficiente para producir la cantidad deseada de la proteína recombinante antes de añadir la una o más α -1,2-manosidasas al medio de cultivo. El inductor y la una o más α -1,2-manosidasas pueden añadirse al cultivo simultáneamente o el inductor se añade al cultivo antes de añadir la una o más α -1,2-manosidasas o la una o más α -1,2-manosidasas se añaden al cultivo antes de añadir el inductor. La proteína recombinante inducida se produce teniendo glucosilación O-ligada reducida y puede recuperarse del medio de cultivo o para proteínas que no tienen una secuencia señal, de la célula hospedadora por lisis.

En el segundo aspecto, donde el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante está unido de forma funcional a un promotor constitutivo, la una o más α -1,2-manosidasas se añaden al medio de cultivo al mismo tiempo que se establece el cultivo y la proteína recombinante, que se produce teniendo glucosilación O-ligada reducida, puede recuperarse del medio de cultivo o para proteínas recombinantes que no tienen una secuencia señal, de la célula hospedadora por lisis.

En un aspecto adicional más para producir proteínas que tiene glucosilación O-ligada reducida sin usar un inhibidor de la glucosilación O-ligada mediada por Pmt, la célula hospedadora se transforma con un ácido nucleico quimérico que codifica la α -1,2-manosidasa y un ácido nucleico que codifica la proteína recombinante y que co-expresa la α -1,2-manosidasa y la proteína recombinante para producir la proteína recombinante que tiene glucosilación O-ligada reducida. En realizaciones particulares, tanto el ácido nucleico que codifica la α -1,2-manosidasa como el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante están ambos unidos de forma funcional a un promotor inducible. En otras realizaciones, uno o los dos promotores son constitutivos. En el caso de un promotor inducible, las células hospedadoras se cultivan para producir una multiplicidad deseada de células hospedadoras antes de inducir la expresión de la α -1,2-manosidasa y/o la proteína recombinante. El Ejemplo 3 ilustra el método donde ácidos nucleicos que codifican tanto las α -1,2-manosidasas como la proteína recombinante se unen de forma funcional a un

promotor constitutivo, se introducen en una célula hospedadora y después se incuba un cultivo de las células hospedadoras durante un tiempo para producir la proteína recombinante, que tiene glucosilación O-ligada reducida en comparación con la proteína recombinante producida en células en ausencia de la α -1,2-manosidasa.

5 II. Células hospedadoras

Aunque las células hospedadoras para el método de este documento incluyen tanto células eucariotas superiores como células eucariotas inferiores, las células eucariotas inferiores, por ejemplo células de hongos filamentosos y levaduras, son actualmente preferidas para la expresión de proteínas porque pueden cultivarse de forma económica, dan altos rendimientos de proteína, y cuando se modifican apropiadamente son capaces de producir proteínas que tienen patrones adecuados de glucosilación. Los eucariotas inferiores incluyen levaduras, hongos, coanoflagelados, microsporidios, alveolados (por ejemplo, dinoflagelados), estramenópilos (por ejemplo, algas pardas, protozoos), rodófitos (por ejemplo, algas rojas), plantas (por ejemplo, algas verdes, células vegetales, musgo) y otros protistas. Las levaduras y los hongos incluyen, aunque sin limitación: *Pichia* sp. (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*), *Saccharomyces* sp. (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp. (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Candida albicans*, *Aspergillus* sp (por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*), *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp. (por ejemplo, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*), *Physcomitrella patens* y *Neurospora crassa*. Las levaduras, en particular, son actualmente preferidas porque las levaduras ofrecen genética establecida que permite rápidas transformaciones, estrategias de localización de proteínas ensayadas, y fáciles técnicas de knock-out génico. Los vectores adecuados tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación, y similares según se desee.

Diversas levaduras, tales como *K. lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, y *Hansenula polymorpha* son actualmente preferidas para cultivo celular porque son capaces de crecer hasta altas densidades celulares y secretar grandes cantidades de proteína recombinante. Asimismo, los hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp, *Neurospora crassa*, y otros pueden usarse para producir proteína recombinantes a una escala industrial.

Los eucariotas inferiores, en particular los hongos filamentosos y levaduras, pueden modificarse genéticamente de modo que expresen proteínas o glucoproteínas en que el patrón de glucosilación es de tipo humano o humanizado. Esto puede conseguirse eliminando enzimas endógenas seleccionadas de glucosilación y/o suministrando enzimas exógenas como se describe por Gerngross et al. en la patente de Estados Unidos N° US7029872, y las solicitudes de patente publicada de Estados Unidos N° 20040018590, 20050170452, 20050260729, 20040230042, 20050208617, 20040171826, 20050208617, 20060160179, 20060040353, y 20060211085. Por tanto, una célula hospedadora puede modificarse adicional o alternativamente para expresar una o más enzimas o actividades enzimáticas, que posibiliten la producción de estructuras particulares de N-glucano a un alto rendimiento. Dicha enzima puede dirigirse a un orgánulo subcelular hospedador en que la enzima tendrá actividad óptima, por ejemplo, mediante un péptido señal no asociado normalmente con la enzima. Las células hospedadoras también pueden modificarse para expresar un transportador de nucleótido con azúcar y/o una enzima nucleótido difosfatasa. El transportador y la difosfatasa mejoran la eficacia de las etapas modificadas de glucosilación, proporcionando los sustratos apropiados para las enzimas de glucosilación en los compartimientos apropiados, reduciendo la inhibición competitiva de producto, y promoviendo la retirada de nucleósidos difosfato. Véase, por ejemplo, Gerngross et al. en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N° 20040018590 y Hamilton, 2003, Science 301: 1244-46 y la patente y solicitudes de patente de Estados Unidos mencionadas anteriormente.

A modo de ejemplo, una célula hospedadora (por ejemplo, de levadura o fúngica) puede seleccionarse o modificarse por ingeniería para que esté empobrecida en actividades 1,6-manosil transferasa, que de lo contrario añadiría restos de manosa en el N-glucano de una glucoproteína, y para incluir adicionalmente un ácido nucleico para la expresión ectópica de una actividad α -1,2 manosidasa, que posibilita la producción de glucoproteínas recombinantes que tienen más del 30 por ciento en moles de N-glucanos $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Cuando se produce una glucoproteína en las células hospedadoras de acuerdo con el método descrito en este documento, las células hospedadoras producirán una glucoproteína que tiene predominantemente una estructura de N-glucano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ y O-glucosilación reducida en comparación con la glucoproteína producida en la célula de otro modo. En un aspecto adicional, la célula hospedadora se modifica por ingeniería para incluir adicionalmente un ácido nucleico para la expresión ectópica de actividad GlcNAc transferasa I, que posibilita la producción de glucoproteínas que tienen predominantemente N-glucanos $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. Cuando se produce una glucoproteína en las células hospedadoras de acuerdo con el método descrito en este documento, las células hospedadoras producirán una glucoproteína que tiene predominantemente una estructura de N-glucano $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ y O-glucosilación reducida en comparación con la glucoproteína producida en la célula de otro modo. En un aspecto adicional más, la célula hospedadora se modifica por ingeniería para incluir adicionalmente un ácido nucleico para la expresión ectópica de actividad manosidasa II, que posibilita la producción de glucoproteínas que tienen predominantemente N-glucanos $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Cuando se produce una glucoproteína en las células hospedadoras de acuerdo

con el método descrito en este documento, las células hospedadoras producirán una glucoproteína que tiene predominantemente una estructura de N-glucano $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ y O-glucosilación reducida en comparación con la glucoproteína producida en la célula de otro modo. En un aspecto adicional más, la célula hospedadora se modifica por ingeniería para incluir adicionalmente un ácido nucleico para la expresión ectópica de actividad GlcNAc transferasa II, que posibilita la producción de glucoproteínas que tienen predominantemente N-glucanos $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Cuando se produce una glucoproteína en las células hospedadoras de acuerdo con el método descrito en este documento, las células hospedadoras producirán una glucoproteína que tiene predominantemente una estructura de N-glucano $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ y O-glucosilación reducida en comparación con la glucoproteína producida en la célula de otro modo. En aspectos adicionales más, las anteriores células hospedadoras pueden modificarse adicionalmente por ingeniería para producir N-glucano híbrido o complejo particular o estructuras de N-glucano de tipo humano para incluir adicionalmente uno o más genes eucariotas superiores implicados en la glucosilación N-ligada, en cualquier combinación, que codifican por ejemplo, actividades sialiltransferasa, actividades manosidasa de clase II y III, actividad GlcNAc transferasa II, III, IV, V, VI, IX, y actividad galactosa transferasa. Actualmente es preferible que las células incluyan adicionalmente uno o más ácidos nucleicos que codifiquen actividad difosfatasa UDP-específica, actividad difosfatasa GDP-específica, y actividad transportadora UDP-GlcNAc.

Pueden usarse plantas y cultivos de células vegetales para la expresión de proteínas y glucoproteínas con glucosilación O-ligada reducida como se muestra en este documento (Véase, por ejemplo Larrick y Fry, 1991, Hum. Antibodies Hybridomas 2: 172-89; Benvenuto et al., 1991, Plant Mol. Biol. 17: 865-74; Durin et al., 1990, Plant Mol. Biol. 15: 281-93; Hiatt et al., 1989, Nature 342: 76-8). Los hospedadores vegetales preferibles incluyen, por ejemplo, *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, y *Solanum tuberosum*.

También puede usarse cultivo de células de insecto para producir proteínas y glucoproteínas con glucosilación O-ligada reducida, como se muestra en este documento por ejemplo, sistemas de expresión basados en baculovirus (Véase, por ejemplo, Putlitz et al., 1990, Bio/Technology 8: 651-654).

Aunque no es actualmente tan económico de cultivar como los eucariotas inferiores y procariotas, también puede usarse cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir proteínas y glucoproteínas con glucosilación O-ligada reducida como se muestra en este documento (Véase Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, NY, 1987)). Los hospedadores adecuados incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, preferiblemente líneas celulares de mieloma o similares o células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., 1986, Immunol. Rev. 89:49-68), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y ajuste de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Generalmente, se incluye un marcador de selección, tal como un casete de expresión neoR, en el vector de expresión.

El ácido nucleico que codifica la proteína a expresar puede transferirse a la célula hospedadora por métodos convencionales, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, puede usarse tratamiento con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, reproducción natural, lipofección, biolística, transducción basada en virus, o electroporación para hospedadores celulares. Se prefiere transgénesis por balística con partículas de tungsteno para células y tejidos vegetales. (Véase, en líneas generales, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1982))

Una vez expresadas, las proteínas o glucoproteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (Véase, en líneas generales, Scopes, R., Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Se prefieren glucoproteínas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad, y más preferido del 98 al 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, las proteínas pueden después usarse de forma terapéutica (incluyendo de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes, y similares. (Véase, en líneas generales, Immunological Methods, Vols. I y II (Lefkovits y Pemes, eds., Academic Press, NY, 1979 y 1981).

Por lo tanto, se proporcionan adicionalmente composiciones de glucoproteína que comprenden una especie predominante de estructura de N-glucano y que tienen glucosilación O-ligada reducida en comparación con composiciones de la glucoproteína que se ha producido en células hospedadoras que no se han incubado en presencia de un inhibidor de glucosilación O-ligada mediada por Pmt o una α -1,2-manosidasa capaz de recortar más de un resto de manosa de una estructura de glucano o ambos. En aspectos particulares, la composición de glucoproteína comprende una glucoproteína que tiene una estructura predominante de N-glucano seleccionada entre el grupo que consiste en las glucoformas $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, y

GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂.

III. Composiciones farmacéuticas

5 Pueden incorporarse proteínas y glucoproteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida en composiciones farmacéuticas que comprenden la glucoproteína como un agente terapéutico activo y otros diversos componentes farmacéuticamente aceptables (Véase, Remington's Pharmaceutical Science (15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, y similares.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son estériles, sustancialmente isotónicas, libres de pirógenos y se preparan de acuerdo con GMP de la FDA u organismo similar. Las glucoproteínas pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol, o etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Las glucoproteínas pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que pueden formularse de tal modo que permitan una liberación sostenida del ingrediente activo. Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, en forma de soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, como se ha analizado anteriormente (Véase Langer, Science 249, 1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)).

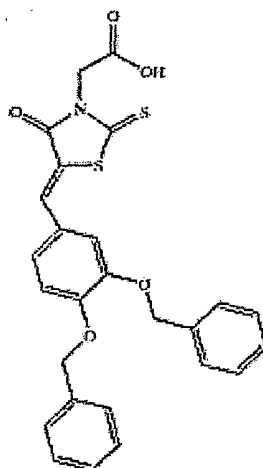
Salvo que se defina de otro modo en este documento, los términos y expresiones científicas y técnicas usadas en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden habitualmente por los especialistas en la técnica. Además, salvo que el contexto lo requiera de otro modo, los términos singulares incluirán el plural y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de bioquímica, enzimología, biología molecular y celular, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en este documento son las bien conocidas y habitualmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y descritos en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan durante toda la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, y suplementos hasta 2002); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990); Taylor y Drickamer, Introduction to Glycobiology, Oxford Univ. Press (2003); Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ; Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol I, CRC Press (1976); Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol II, CRC Press (1976); Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999).

Los siguientes ejemplos pretenden promover una comprensión adicional de la presente invención.

EJEMPLO 1

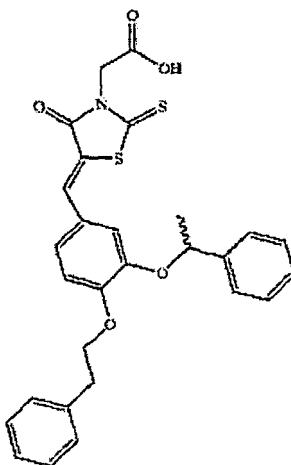
Este ejemplo proporciona un método para preparar diversos inhibidores de Pmt. Salvo que se estipule de otro modo, todos los materiales se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) y se usaron según se recibieron. Los espectros de ¹H RMN de todos los intermedios y productos finales fueron de acuerdo con los datos publicados.

La preparación de Pmti-1, (ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético), es del siguiente modo.



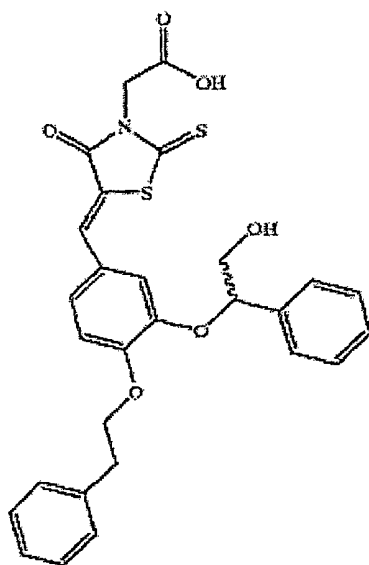
El procedimiento se adaptó del de Orchard *et al.* en la patente de Estados Unidos N° 7.105.554. Se calienta hasta reflujo una solución de ácido rodanina-3-acético (1 g, 5,20 mmol, 1 equiv.), 3,4-dibenciloxibenzaldehído (2,04 g, 6,25 mmol, 1,2 equiv.), y acetato sódico (1,3 g, 15,6 mmol, 3 equiv.) en ácido acético (30 ml), y se agita durante una noche. Según se enfría la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, el producto se precipita y filtra y se lava con ácido acético, después con éter de petróleo. El residuo se disuelve en DMSO caliente, se filtra, y se precipita mediante la adición de agua. Después de enfriarlo, el precipitado se filtra y se recrystaliza en acetato de etilo y éter de petróleo para dar un producto que se suspende en agua y se seca por congelación durante una noche al vacío para dar el producto final en forma de un polvo amarillo esponjoso.

La preparación de Pmti-2, (ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético), es de siguiente modo.



Este producto se sintetiza de acuerdo con las directrices de Orchard *et al.* en la patente de Estados Unidos N° 7.105.554. Se calienta una solución de ácido rodanina-3-acético (375 mg, 1,96 mmol, 1 equiv.), 3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)benzaldehído (680 mg, 1,96 mmol, 1 equiv.) y acetato amónico (453 mg, 3 equiv.) hasta 70 °C durante diez minutos, después se enfría hasta temperatura ambiente y se diluye con acetato de etilo (100 ml). La solución orgánica se lava con HCl 1 M (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml), después se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El producto se purifica por cromatografía líquida usando una columna de vidrio de 10 x 2,5 cm compactada con C18 35-75 mm (Alltech Associates, Deerfield, IL). Se emplea elución en gradiente. Tampón A es ácido acético al 0,1 % y tampón B es acetonitrilo al 80 %. El gradiente está compuesto por 20 % de B durante tres minutos, aumentando hasta el 75 % de B durante 40 minutos. El caudal es 8 ml/min. La detección es a 280 nm. Las fracciones apropiadas se combinan, se concentran, y se secan por congelación al vacío para dar el producto en forma de un polvo amarillo esponjoso.

La preparación de Pmti-3, (ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxietoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético), (Orchard *et al.* en la patente de Estados Unidos N° 7.105.554) se sintetiza en tres etapas del siguiente modo.



Etapa 1: Producción de (+)-(S)-2-acetoxy-1-bromo-1-feniletano. Se añade HBr-ácido acético frío (12,4 g, 52,2 mmol) gota a gota a (-)-(R)-1-feniletano-1,2-diol (2,4 g, 17,4 mmol) durante aproximadamente cinco minutos y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se añade agua (25 ml) y la solución se neutraliza con carbonato sódico y se extrae con éter (3 x 30 ml). Los extractos combinados se secan y se evaporan para dar (+)-(S)-2-acetoxy-1-bromo-1-feniletano (3,93 g, 93 %, d^{25}_D 1,415 g/ml, $[\alpha]_D^{24} + 93,5^\circ$ (c 5,63 en CCl_4) 2,72 (5H, s), 4,98 (aH, dd, 6,7 y 7,0 Hz) y 5,56 (2H, d). Este producto no se destila. La homogeneidad isomérica se establece por comparación del espectro de rmn (ausencia de resonancia de PhCH^*OAc) con el de 1,2-diacetoxy-1-feniletano. (Obsérvese que los reactivos racémicos están sustituidos para los isómeros ópticos enumerados).

Etapa 2: Producción de 3-[(1-fenil-2-hidroxi)etoxi]-4-(2-feniletoxi)-benzaldehído. Se añade (2-acetoxy-1-bromoetil)benzoceno (3,32 g, 13,67 mmol, 1,2 equiv.) (el producto de la Etapa 1), a una solución agitada de 3-hidroxi-4-(2-feniletoxi)-benzaldehído (2,76 g, 11,39 mmol, 1 equiv.) y carbonato de cesio (2,97 g, 9,11 mmol, 0,8 equiv.) en N,N-dimetilformamida (15 ml). La solución se agita durante 19 horas a temperatura ambiente, después 21 horas a 80 °C. La reacción se trata por reparto entre acetato de etilo y agua (se añade salmuera para ayudar a descomponer la emulsión que se forma). La capa orgánica se lava dos veces más con agua y salmuera, y después se seca sobre sulfato sódico y se evapora para dar un aceite oscuro. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice y la elución con éter dietílico da un aceite naranja. Este aceite se disuelve en metanol (100 ml) y se añade a la solución una solución acuosa de hidróxido sódico (7 ml, 1 M). Después de 30 minutos, la mezcla se evapora (para retirar el metanol) y el residuo se reparte entre diclorometano y agua. La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice y la elución con éter de petróleo:éter dietílico (1:2) da el producto en forma de un polvo de color crema.

Etapa 3: Producción de Pmti-3. Se calienta hasta reflujo una solución de ácido rodanina-3-acético (158 mg, 0,828 mmol, 1 equiv.), 3-(1-fenil-2-hidroxi)etoxi)-4-(2-feniletoxi)benzaldehído (300 mg, 0,828 mmol, 1 equiv.) (el producto de la Etapa 2), y acetato amónico (191 mg, 3 equiv.) en tolueno (10 ml) durante 3,5 horas, se enfría hasta temperatura ambiente, y se diluye con acetato de etilo (50 ml). La solución orgánica se lava con HCl 1 M (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml), después se seca sobre sulfato sódico y se evapora. Después de tratamiento, el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo da una goma amarilla, que se recristaliza en éter dietílico y éter de petróleo para dar el producto en forma de un polvo amarillo.

EJEMPLO 2

Este ejemplo muestra que *Pichia pastoris* transformada con un vector de expresión que codifica la glucoproteína marcadora Kringle 1-3 y tratada con inhibidores de Pmt producía una glucoproteína que tiene O-glucosilación reducida.

Se transformó ADN plasmídico que codifica una glucoproteína indicadora marcada con His que consiste en los dominios de plasminógeno humano K1, K2, y K3 (proteína Kringle 1-3) bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* en *Pichia pastoris* de tipo silvestre para producir la cepa yJC53. La proteína indicadora Kringle que consiste en los dominios K1, K2, K3, y K4 se ha analizado en Duman et al. Biotechnol. Appl. Biochem. (1998), v.28, p.39-45 y solamente el dominio K3 en Choi et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(9): 5022-5027. La secuencia de aminoácidos de la proteína Kringle 1-3 usada en el Ejemplo es SECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTTDPEKRYDY CDILECEEECMHCSEGENYDGKISKTMGLECQAWDSQSPHAHGYPISKFPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPN KRWELCDIPRCTTPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHSRTPENFPCKNLDENYCRN

PDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDGGGHHHHHHHHH (SEC ID N° 1). La proteína Kringle 1-3 contiene al menos dos sitios potenciales de O-glucosilación de mamífero que se ajustan a la secuencia consenso supuesta P en -1 y +3: el resto de serina, que está O-glucosilado, está con mayúscula en la secuencia de aminoácidos "pppSsgp" y el resto de treonina, que está O-glucosilado, está con mayúscula en la secuencia de aminoácidos "lapTapp". Los sitios de O-glucosilación están subrayados en la anterior secuencia de aminoácidos. Los sitios potenciales de O-glucosilación de mamífero se localizan entre los dominios K1 y K2 y los dominios K2 y K3. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 1, en levaduras la proteína tiene aproximadamente 20 sitios de glucosilación O-ligada. Por tanto, la glucosilación O-ligada puede ser una desventaja significativa para producir proteínas en levaduras sin inhibir la glucosilación O-ligada como se muestra por los métodos de este documento. Un sitio de N-glucosilación reside en el dominio K3, que se había eliminado reemplazando la asparagina en la posición 208 de la SEC ID N° 1 con una serina. Por lo tanto, los únicos glucanos en la proteína Kringle 1-3 serían el resultado de O-glucosilación.

El plásmido que contiene el ADN que codifica la proteína Kringle 1-3 se preparó usando el cebador directo K1-3/UP 5'-CGGAA TTCTC AGAGT GCAAG ACTGG GAATA GAA-3' (SEC ID N° 2) y cebador inverso K1-3/LP1 (Cebador inverso, 3Gly+2His, apareado con K 1-3/UP) 5'-ATGAT GATGA CCACC ACCGT CCTGG ACCAC AGGGG TTAG-3' (SEC ID N° 3) para producir un producto de PCR, que después se amplifica por PCR usando el cebador inverso K1-3/LP2 (Cebador inverso, 3Gly+ 9His+codón de parada, apareado con K 1-3/UP) 5'-TTAAT GATGA TGATG ATGAT GATGA TGATG ACCAC CACC-3' (SEC ID N° 4). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: después de 1 ciclo de 95 °C durante 2 minutos como etapa de desnaturalización, la reacción de PCR se sometió a 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto, y después 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos. Después de la reacción de PCR y purificación en columna de los productos de PCR, se generaron los salientes de nucleótido A de los productos de PCR usando ExTaq (1 ciclo de 72 °C durante 15 minutos). Los productos de PCR resultantes se usaron para la segunda reacción de PCR como un molde de PCR donde los cebadores, K1-3/UP y K1-3/LP2, se usaron para amplificar Kringle 1-3 de tipo silvestre+3Gly+9His, que se clonó en un vector plasmídico pCR2.1 (Invitrogen) para producir pBK105. Después se usaron los siguientes cebadores de PCR para generar una mutación de Asn a Ser en la posición 208 en la proteína Kringle 1-3 para producir la secuencia de aminoácidos NRTP a partir de la secuencia de aminoácidos SRTP: cebador directo K3f (Asn a Ser) 5'-ACCCCTCACACACATTCTAGGACACCAGAAAACCTTC-3' (SEC ID N° 5) y cebador inverso K3r 5'-CTGTGCACTCCAGTGCTGACAGGTGTG-3' (SEC ID N° 6). La mutación de Asn a Ser entonces se generó en pBK105 mediante la PCR inversa. Las condiciones de PCR fueron las siguientes; después de 1 ciclo de 95 °C durante 2 minutos como una etapa de desnaturalización, la reacción de PCR se sometió a 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 5 minutos, y después 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes se ligaron para producir el plásmido pBK118, que se secuenció para confirmar la mutación.

El plásmido pBK118 se digirió con EcoRI y los fragmentos de ADN se purificaron en gel y se clonaron en los sitios EcoRI de pPICZaA (Invitrogen La Jolla, CA) para producir pBK119 (plásmido de expresión de *Pichia*). El plásmido pPICZaA contiene una señal de secreción de α -factor que permite la secreción eficaz de la mayoría de las proteínas de *Pichia pastoris*; 5'-AOX, un fragmento de 942 pb que contiene el promotor AOX 1 que permite la expresión inducible por metanol y de alto nivel en *Pichia pastoris*; y, el gen de resistencia a ZEOCINA para la selección positiva en *E. coli* y *Pichia pastoris*. El plásmido pBK119 se linealizó con *PmeI* antes de su transformación en cepas de *Pichia pastoris*. El plásmido pBK se transformó en *Pichia pastoris* cepa yJC53, una cepa de tipo silvestre, y diversas cepas *PMT* knockout.

Las cepas de levadura *PMT* knockout se crearon en *Pichia pastoris* siguiendo el procedimiento resumido para *Saccharomyces cerevisiae* en Gentsch y Tanner, EMBO J. 1996 Nov 1;15(21): 25752-5759. Los genes *PMT* de *Pichia pastoris* se identificaron en la secuencia de nucleótidos del genoma de *Pichia pastoris* obtenida de Integrated Genomics, Chicago, IL por búsqueda de homología usando las secuencias de nucleótidos para los genes *PMT* de *Saccharomyces cerevisiae*. La delección de los genes *PMT* de *Pichia pastoris* (Pp*PMT*) fue del siguiente modo. Se generaron alelos de delección de Pp*PMT* por el método de PCR solapante (véase por ejemplo, Davidson et al., 2004, Glycobiology 14:399-407; Ho et al., 1989, Gene 77:51-9; Horton et al., 1989, Gene 77:61-8). En la primera reacción de PCR, se amplificaron por PCR el ADN que comprende las secuencias de nucleótidos para las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *PMT* y los marcadores de resistencia *NAT* o *HYG* (Goldstein y McCusker, 1999, Yeast 14:1541-1553; Goldstein et al., 1999, Yeast 15:507-110). Las secuencias de los cebadores para las regiones que flanquean los genes *PMT* se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos genómica de *Pichia pastoris* obtenida de Integrated Genomics, Chicago, IL como guía. Se usó el ADN genómico de *Pichia pastoris* como molde para la amplificación por PCR de las regiones flanqueantes de Pp*PMT*, mientras que los fragmentos *NAT* y *HYG* se amplificaron por PCR usando plásmidos descritos en (Goldstein. y McCusker, 1999, *ibid.*; Goldstein et al., 1999, *ibid.*) como moldes. Después, en una segunda reacción de PCR, se usaron los tres productos de la PCR de primera ronda como moldes para generar un producto solapante que contenía los tres fragmentos como un alelo lineal único. El producto de PCR final entonces se empleó directamente para transformación. Los transformantes se seleccionaron en medio YPD que contenía 200 μ g/ml de higromicina o 100 μ g/ml de nourseotricina. En cada caso la integración apropiada del alelo mutante se confirmó por PCR. Las cepas *PMT* knockout creadas eran yJC51 (*pmt3 Δ* ,*pmt5 Δ* ,*pmt6 Δ*), yJC55 (*pmt1 Δ*), yJC66 (*pmt2 Δ*), y yJC65 (*pmt4 Δ*). Las cepas *PMT* knockout se transformaron cada una con plásmido pBK119 que codificaba la anterior proteína Kringle 1-3.

La expresión de la proteína Kringle 1-3 para las cepas transformadas de levadura se realizó en matraces de agitación a 24 °C con medio complejo con glicerol tamponado (BMGY) que consistía en extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,0, base de nitrógeno de levaduras al 1,34 %, biotina al 10-5 % 4 x, y glicerol al 1 %. El medio de inducción para la expresión de proteínas era medio complejo con metanol tamponado (BMMY) que consistía en metanol al 1 % en lugar de glicerol en BMGY. Se añadió inhibidor de Pmt Pmti-1, Pmti-2, o Pmti-3 en metanol al medio de cultivo hasta una concentración final de 0,2 μ M, 2 μ M, o 20 μ M en el momento en que se añadió medio de inducción. Las células se recogieron y centrifugaron a 2.000 rpm durante cinco minutos. Los inhibidores de Pmt Pmti-1, Pmti-2, y Pmti-3 son esencialmente intercambiables, con pequeñas variaciones en facilidad de uso. Por ejemplo, en las condiciones de cultivo celular descritas, la solubilidad de Pmti-3 es mayor que la de Pmti-1 y Pmti-2 y, por lo tanto, la más deseable de los tres.

Se separaron siete μ l del sobrenadante de los cultivos yJC53 tratados con Pmti-1 o yJC55 por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685 y después se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell (ahora Whatman, Inc., Florham Park, NJ)). La proteína Kringle 1-3 se detectó en las transferencias de Western usando un anticuerpo anti-His (H-15) de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) y se reveló usando el ImmunoPure Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Como se muestra en el carril 1 de la transferencia de Western mostrada en la Figura 1, la proteína Kringle 1-3 de *Pichia pastoris* sin tratar corre como una mancha debido a la presencia de O-glucosilación. Sin embargo, en contraste, la proteína Kringle 1-3 de yJC53 (*Pichia pastoris* tratada con Pmti-1 2 o 20 μ M, carriles 2 y 3, respectivamente) muestra una banda distinta, debido a la ausencia de O-glucosilación, similar a la de la proteína Kringle 1-3 expresada en yJC55 (un mutante *pmt1* Δ knockout de *Pichia pastoris*) (carriles 4 y 5). La Figura 1 muestra adicionalmente que Pmti-1 reducía la O-glucosilación hasta un nivel similar al observado en una cepa que carece de Pmt1.

Para medir la reducción de O-glucosilación por los inhibidores de Pmt, la proteína Kringle 1-3 se purificó del medio de cultivo usando cromatografía con quelación de níquel (Choi et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(9): 5022-5027) y los O-glucanos se liberaron de y separaron de la proteína Kringle 1-3 por eliminación alcalina (beta-eliminación) (Harvey, 1999 Mass Spectrometry Reviews 18, 349-451). Este proceso también reduce el extremo reductor recién formado del O-glucano liberado (oligomanosa o manosa) en manitol. El grupo manitol por tanto sirve como indicador único de cada O-glucano. Se requirieron 0,5 nmol de proteína Kringle 1-3, contenidos dentro de un volumen 100 μ l de tampón PBS, para la beta eliminación. La muestra se trató con 25 μ l de reactivo de borohidruro alcalino y se incubó a 50 °C durante 16 horas. Se añadieron aproximadamente 20 μ l de patrón interno arabitól, seguido de 10 μ l de ácido acético glacial. La muestra después se centrifugó a través de un filtro Millipore que contenía tanto SEPABEADS como resina AG 50W-X8 y se lavó con agua. Las muestras, incluyendo el lavado, se transfirieron a viales de plástico de tomamuestras automático y se evaporaron a sequedad en un evaporador de centrifugación. Se añadieron 150 μ l de AcOH/MeOH al 1 % a la muestras y las muestras se evaporaron a sequedad en un evaporador de centrifugación. Esta última etapa se repitió cinco veces más. Se añadieron 200 μ l de agua y se analizaron 100 μ l de la muestra por cromatografía de intercambio aniónico de alto pH acoplada con HPLC Dionex de detección electroquímica pulsada (HPAEC-PAD). Se determinó una ocupación promedio de O-glucano basada en la cantidad de manitol recuperado. Los resultados se resumen en la Tabla 1, que muestra que uno cualquiera de los inhibidores químicos de *Pmt* reducía la glucosilación O-ligada de la proteína Kringle 1-3 secretada en las cepas de *Pichia pastoris* que contenían genes *PMT1* y *PMT2* intactos hasta un nivel que era comparable al nivel de glucosilación O-ligada observado para células que contiene delecciones del gen *PMT1* o *PMT2*. La Tabla 1 también muestra que aunque la proteína tiene dos sitios potenciales de glucosilación O-ligada de mamífero, en levaduras la proteína tiene aproximadamente 20 sitios de glucosilación O-ligada.

Tabla 1

Cepa	Genotipo relevante	Tratamiento	Ocupación de O-glucano ¹
yJC53	Tipo silvestre	0	20
		Pmti-1 2 μ M	9
yJC51	<i>pmt</i> Δ 3, Δ 5, Δ 6	0	17
		Pmti-1 2 μ M	6
		Pmti-1 20 μ M	4
		Pmti-2 0,2 μ M	3
		Pmti-2 2 μ M	2
		Pmti-3 0,2 μ M	6
		Pmti-3 2 μ M	4
yJC55	<i>pmt</i> Δ 1	0	3
		Pmti-1 2 μ M	2
		Pmti-1 20 μ M	2

yJC66	<i>pmtΔ 2</i>	0	4
		Pmti-1 2 μM	4
		Pmti-1 20 μM	4
yJC65	<i>pmtΔ 4</i>	0	18
		Pmti-1 2 μM	7
		Pmti-1 20 μM	4
†cantidad promedio de cadenas de manosa O-ligadas por proteína.			

EJEMPLO 3

5 En este ejemplo, las células de levadura transformadas con ADN que codifica la α -manosidasa de *T. reesei* provocan la producción de proteínas con O-glicosilación reducida y esa O-glicosilación estaba adicionalmente reducida cuando las células también se incubaban en presencia de un inhibidor de Pmt.

10 Se expresaron las cadenas H + L de un anticuerpo monoclonal anti-Her2 en *Pichia pastoris* cepas GS115 (TS) y GS115 que se había modificado genéticamente para para co-expresar α -manosidasa de *T. reesei* (+Trman). GS115 está disponible en Invitrogen (Carlsbad, CA) y, con la excepción de una mutación *HIS4* para posibilitar la selección por *his4*, tiene un fenotipo esencialmente de tipo silvestre. Las cadenas H + L se expresaron como dos genes diferentes del plásmido pJC284, que se obtuvo del plásmido pAO815 de Invitrogen.

15 Los genes H + L se degeneraron usando secuencias de anticuerpo anti-Her2 obtenidas de GenBank. El número de acceso a GenBank para la cadena L es 1N8Z_A y el número de acceso a GenBank para la región variable de cadena H más el dominio CH1 es 1N8Z_B. El número de acceso a GenBank para la región Fc de cadena H es BC092518. Ambas secuencias de ADN de cadena H y L se optimizaron en los codones de acuerdo con el uso de codones de *Pichia pastoris* para potenciar la traducción en *Pichia pastoris*. La optimización de codones para su uso en *Pichia* sp. es bien conocida en la técnica y se ha descrito en, por ejemplo, Outchkourov et al., 2002, Protein Expr. Purif. 24:18-24; Sharp y Li, 1987, Nucleic Acids Res. 15:1281-95; Woo JH, Liu et al., 2002, Protein Expression and Purification 25:270-282, y Nakamura, et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28:292. Las regiones constantes de la cadena H (IgG1 humana) y cadena L (Kappa humana) se sintetizaron por GeneArt Inc., Regensburg, Alemania. Las regiones variables se prepararon de forma interna usando oligonucleótidos adquiridos en IDT Inc. (Coralville, IA) en un método de PCR solapante. Las cadenas H y L de longitud completa se ensamblaron por PCR solapante, y las cadenas H y L resultantes se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen La Jolla, CA) para generar pDX344 y pDX349, respectivamente. Las cadenas H + L de pDX344 y pDX349 se combinaron con promotores GAPDH y secuencias terminadoras AOX1 en el vector pDX580 (estructura derivada del vector pGAPZA de Invitrogen). Finalmente, los casetes de expresión de cadena H + L se subclonaron a partir de pDX580 en el vector pJC284. La secuencia de nucleótidos del ADN de codones optimizados que codifica la cadena ligera se muestra en la SEC ID N° 7 y la secuencia de nucleótidos del ADN de codones optimizados que codifica la cadena pesada se muestra en la SEC ID N° 8. El plásmido pJC284 tiene promotores GAPDH para expresar los genes H + L y un gen *his4* intacto para la selección de transformantes en la cepa GS115 y GS115(+Trman). Las cepas de levadura GS115 y GS115(+Trman) se transformaron con pJC285 y los transformantes con el plásmido integrado en el genoma en el locus *his4* se aislaron para producir cepas que producían el anticuerpo anti-Her2.

35 La construcción de la cepa GS115(+Trman) fue del siguiente modo. La α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* se expresó a partir de un casete de expresión en el plásmido pJC285. El plásmido pJC285 se obtuvo del vector pGAPZA de Invitrogen, que tiene el gen de resistencia a Zeocina como marcador de selección, y contiene un casete de expresión que comprende ADN que codifica el dominio catalítico α -1,2-manosidasa de *T. reesei* (SEC ID N° 9) con las primeras 84 pares de bases que codifican su secuencia señal reemplazados con un ADN que codifica la secuencia pre señal α MAT de *Saccharomyces cerevisiae* (SEC ID N° 10), que codifica justo los aminoácidos de direccionamiento al RE, unido de forma funcional a ADN que comprende el promotor GAPDH de *Pichia pastoris* (SEC ID N° 11) en el extremo 5' y ADN que comprende la secuencia de terminación de la transcripción AOX1 de *Pichia pastoris* (SEC ID N° 12) en el extremo 3'. La secuencia de nucleótidos del casete de expresión completo se expone en la SEC ID N° 13. La cepa de levadura GS115 se transformó con pJC285 y los transformantes con el plásmido integrado en el genoma en el locus GAPDH se aislaron para producir la cepa GS115(+Trman).

50 Se cultivaron cultivos duplicados de las cepas en 200 ml de medio complejo de dextrosa tamponado (BMDY) que consistía en extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, fosfato potásico 100 mM pH 6,0, base de nitrógeno de levaduras al 1,34 %, biotina al 0,00004 %, dextrosa al 2 %, y con o sin Pmti-2 a 0,3 o 0,03 μM. Después de 72 horas de crecimiento, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se centrifugaron para retirar las células de levadura. Se purificó el anticuerpo en la fracción sobrenadante restante (aproximadamente 200 ml) sobre una columna de Proteína A y se sometió a análisis de O-glucano como se ha descrito en el Ejemplo 2. Además del ensayo de manitol, se determinó la longitud promedio de cadenas de manosa O-ligadas por análisis cromatográfico sin hidrólisis. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

55

Hay 14 sitios de O-glucano de levadura en el anticuerpo. Cuando el anticuerpo se produjo en la cepa GS115 de tipo silvestre, los 14 sitios de O-glucano tienen estructuras de glucano teniendo el 8 % de los sitios justo una manosa, teniendo el 39 % una cadena de dos manosas, teniendo el 43 % una cadena de tres manosas, y teniendo el 9 % una cadena de cuatro manosas (véase la Tabla 2). Sin embargo, cuando el anticuerpo se produjo en células de tipo silvestre tratadas con el inhibidor químico Pmti-2, solamente dos los 14 sitios de O-glucano estaban ocupados y para el 76 % de los dos sitios, la cadena de manosa tenía solamente un resto de manosa. Ninguno de los dos sitios tenía una cadena de manosa con tres o cuatro restos de manosa. Debe apreciarse que el análisis no determinó qué dos de los 14 sitios estaban ocupados. Estaban ocupados dos sitios de O-glucano por molécula de anticuerpo en cualquier combinación o están preferentemente ocupados sitios particulares de O-glucano. En el último caso, para proporcionar anticuerpos (u otras proteínas) completamente desprovistos de O-glucanos, las secuencias de aminoácidos que comprenden los sitios de O-glucano preferidos pueden modificarse en secuencias de aminoácidos que eliminan la glucosilación O-ligada en los sitios.

La Tabla 2 muestra adicionalmente que cuando el anticuerpo se producía en células que incluían ADN que codifica la α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* (cepa GS115(+Trman)), solamente cuatro de los 14 sitios de O-glucano estaban ocupados y para el 95 % de los cuatro sitios, la cadena de manosa tenía solamente un resto de manosa. Ninguno de los cuatro sitios tenía una cadena de manosa con tres o cuatro restos de manosa. Si sitio particulares están preferentemente O-glucosilados, para proporcionar anticuerpos (u otras proteínas) completamente desprovistas de O-glucanos, las secuencias de aminoácidos que comprenden los sitios preferidos de O-glucano pueden modificarse en secuencias de aminoácidos que eliminan la O-glucosilación en los sitios.

Finalmente, la Tabla 2 muestra que cuando el anticuerpo se producía en células que incluían ADN que codifica la α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* y en presencia de Pmti-2, solamente uno de los 14 sitios de O-glucano estaba ocupado y para el 91 % de los sitios, la cadena de manosa tenía solamente un resto de manosa. Ninguna cadena de manosa tenía tres o cuatro restos de manosa. Si solamente uno o solamente unos pocos sitios están preferentemente O-glucosilados, para proporcionar anticuerpos (u otras proteínas) completamente desprovistas de O-glucanos, las secuencias de aminoácidos que comprenden los sitios preferidos de O-glucano pueden modificarse en secuencias de aminoácidos que eliminan la O-glucosilación en los sitios.

La Tabla 2 muestra adicionalmente que 0,3 μ M de inhibidor Pmti es suficiente para reducir la ocupación en aproximadamente el 86 % y la longitud de la cadena para el 76 % de las moléculas a una manosa permitiendo al mismo tiempo que el cultivo crezca. Incluir la α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* permitió que se redujera la cantidad de inhibidor Pmti en 10 veces y se redujo la ocupación hasta un 93 % y la longitud de cadena para el 87 % de las moléculas a una manosa. Estos resultados muestran que usar una cantidad de inhibidor Pmti que no eliminar las células es suficiente para producir glucoproteínas que tienen glucosilación O-ligada reducida. Estos resultados muestran adicionalmente que el inhibidor Pmti y la α -manosidasa parecen reducir de forma sinérgica la cantidad de glucosilación O-ligada.

Tabla 2

Cepa	Ocupación	Man1	Man2	Man3	Man4
GS115	14	8	39	43	9
GS115 + Pmti-2 0,3 μ M	2	76	24	0	0
GS115(+Trman)	4	95	5	0	0
GS115(+Trman) + Pmti-2 0,3 μ M	1	91	9	0	0
GS115(+Trman) + Pmti-2 0,03 μ M	1	87	13	0	0

Se redujeron siete μ l del sobrenadante para cada uno de los anteriores y se sometieron a SDS-PAGE y transferencia de Western usando un anticuerpo anti-IgG (H y L) humana conjugado con HRP para detectar cadenas H y L. Los resultados se muestran en la Figura 2. La cadena H hiper O-glucosilada es la banda de migración más lenta visible en el primer par de carriles en la Figura 2. La Figura 2 muestra que existe una disminución en la cantidad de cadena pesada O-glucosilada cuando el anticuerpo se coexpresaba con α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* o las células que expresan el anticuerpo se incubaban en presencia del inhibidor Pmti-2, o cuando el anticuerpo se coexpresaba con α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* y las células que expresan ambas proteínas se incubaban en presencia del inhibidor Pmti-2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlycoFi, Inc. Bobrowiza, Piotr Cook, James W. Kett, Warren

<120> PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS CON O-GLUCOSILACIÓN REDUCIDA

<130> PCT GF0005Y

ES 2 534 465 T3

<150> 60/737.108
<151> 15-11-2005

5 <160> 13

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10 <210> 1
<211> 288
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> proteína Kringle 1-3

<400> 1

```
Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser
 1                5                10                15
Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro
      20                25                30
His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu
      35                40                45
Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys
```

ES 2 534 465 T3

50						55						60				
Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Leu	Glu	
65					70					75				80		
Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asp	Gly	Lys	
				85					90				95			
Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	
			100					105					110			
Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Asn	
		115					120						125			
Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Arg	Pro	Trp	
		130				135					140					
Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	
145				150						155				160		
Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu	
				165					170					175		
Lys	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	Val	Thr	Val	Ser	
			180					185					190			
Gly	His	Thr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	His	Thr	His	Ser	
		195					200					205				
Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Asn	Tyr	Cys	
		210				215						220				
Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Cys	His	Thr	Thr	Asn	Ser	
225				230						235				240		
Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Ser	Pro	
				245					250					255		
Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Glu	Leu	Thr	Pro	
			260					265					270			
Val	Val	Gln	Asp	Gly	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	His	His	His	
		275					280						285			

5 <210> 2
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo K1-3/UP

<400> 2
 cggaattctc agagtgcaag actggaata gaa 33

15 <210> 3
 <211> 39
 <212> ADN

ES 2 534 465 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso K1-3/LP1

5

<400> 3
atgatgatga ccaccaccgt cctggaccac aggggtag 39

<210> 4
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador inverso K1-3/LP2

15

<400> 4
ttaatgatga tgatgatgat gatgatgatg accaccacc 39

20

<210> 5
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Cebador directo K3f (Asn a Ser)

<400> 5
accctcaca cacattctag gaccaccagaa aacttc 36

30

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador inverso K3r

<400> 6
ctgtgcactc cagtgctgac aggtgtg 27

40

<210> 7
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Secuencia optimizada por codones codificante de cadena ligera

50

<400> 7

ES 2 534 465 T3

gacattcaga tgacacagtc tccatcttct ttgtccgctt ccgtcgggtga tagagttact 60
atcacctgta gagcttccca agacgtcaac accgctgtcg cctggtacca acagaagcca 120
ggtaaggctc caaaactttt gatctactct gcctctttct tgtactccgg tgttccatcc 180
agattttctg gttctagatc cggtagccac ttcacctga ccatctcttc cttgcaacca 240
gaagacttcg ctacctacta ctgtcaacaa cactacacta ctctccaac tttcgggtcaa 300
ggaactaagg ttgagattaa gagaactggt gctgctccat ccgttttcat tttcccacca 360
tccgacgaac aattgaagtc tggtagagct tccgttggtt gtttggtgaa caacttctac 420
ccaagagagg ctaaggttca gtggaagggt gacaacgctt tgcaatccgg taactcccaa 480
gaatccgtta ctgagcagga ttctaaggat tccacttact cettgtcctc cactttgact 540
ttgtccaagg ctgattacga gaagcacaag gtttacgcat gcgaggttac acatcagggt 600
ttgtcctccc cagttactaa gtccttcaac agaggagagt gttaa 645

5 <210> 8
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia optimizada por codones codificante de cadena pesada
<400> 8

ES 2 534 465 T3

gagggtccaat tgggtgaatc tgggtggaggt ttgggtccaac cagggtggatc tctgagactt 60
tcttgtgctg cctctgggtt caacattaag gatacttaca tccactgggt tagacaggct 120
ccaggtaagg gtttggagtg ggttgctaga atctacccaa ccaacgggta caccagatac 180
gctgattccg ttaagggtag attcaccatt tccgctgaca cttccaagaa cactgcttac 240
ttgcaaatga actctttgag agctgaggac actgocgtct actactgttc cagatgggggt 300
ggtgacgggt tctacgccat ggactactgg ggtcaaggta ccttgggttac tgtctcttcc 360
gcttctacta agggaccatc cgtttttcca ttggctccat cctctaagtc tacttccgggt 420
gggtactgctg ctttgggatg tttggttaag gactacttcc cagagcctgt tactgtttct 480
tggaactccg gtgctttgac ttctgggtgt cacacttcc cagctgtttt gcaatcttcc 540
ggtttgtact ccttgtcctc cgttgttact gttccatcct cttccttggg tactcagact 600
tacatctgta acgtaacca caagccatcc aacactaagg ttgacaagaa ggttgagcca 660
aagtcctgtg acaagacaca tacttgtcca ccatgtccag ctccagaatt gttgggtgggt 720
ccatccggtt tcttgttccc accaaagcca aaggacactt tgatgatctc cagaactcca 780
gaggttacat gtgttgttgt tgacgtttct cagcaggacc cagagggtta gttcaactgg 840
tacgttgacg gtgttgaagt tcacaacgct aagactaagc caagagagga gcagtacaac 900
tccacttaca gagttgtttc cgttttgact gttttgcacc aggattgggt gaacggaaag 960
gagtacaagt gtaaggtttc caacaaggct ttgccagctc caatcgaaaa gactatctcc 1020
aaggctaagg gtcaaccaag agagccacag gtttacactt tgccaccatc cagagatgag 1080
ttgactaaga accaggtttc cttgacttgt ttgggttaaag gattctaccc atccgacatt 1140
gctgttgagt gggaaatctaa cgggtcaacca gagaacaact acaagactac tccaccagtt 1200
ttggattctg acggttcctt cttcttgtac tccaagttga ctggtgacaa gtccagatgg 1260
caacagggtg acgttttctc ctgttccggt atgcatgagg ctttgcacaa cactacact 1320
caaaagtccct tgtctttgtc cccaggtaag taa 1353

<210> 9
<211> 500
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Promotor GAPDH de *Pichia pastoris*

<400> 9

agatcttttt tgtagaaatg tcttgggtgtc ctctgtccaat caggtagcca tctctgaaat 60
atctggctcc gttgcaactc cgaacgacct gctggcaacg taaaattctc cggggtaaaa 120
cttaaagtgt gagtaatgga accagaaacg tctcttccct tctctctcct tccaccgcc 180
gttaccgtcc ctaggaaatt ttactctgct ggagagcttc ttctacggcc ccttgcagc 240
aatgctcttc ccagcattac gttgcgggta aaacggaggt cgtgtaccgc acctagcagc 300
ccagggatgg aaaagtcccg gccgtcgtct gcaataatag cggggcggacg catgtcatga 360
gattattgga aaccaccaga atcgaatata aaaggcgaac acctttccca attttgggtt 420
ctcctgacct aaagacttta aatttaattt atttgtccct atttcaatca attgaacaac 480
tatttcgaaa cgaggggaatt 500

ES 2 534 465 T3

<210> 10
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia pre-señal alfa-MAT de *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 10
 10 atgagatttc ctcaatfff tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc attagct 57
 <210> 11
 <211> 1494
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio catalítico alfa-1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei*
 20 <400> 11
 cgcgccggat ctcccaacce tacgagggcg gcagcagtca aggcgcgatt ccagacgctc 60
 tggaaacgctt accaccattt tgcctttccc catgacgacc tccacceggg cagcaacage 120
 tttgatgatg agagaaaacgg ctggggctcg tcggcaatcg atggottgga cacggctatc 180
 ctcattggggg atgccgacat tgtgaacacg atccttcagt atgtaccgca gatcaacttc 240
 accacgactg cggttgcaa ccaaggcacc tccgtgttcg agaccaacat tcggtacctc 300
 ggtggcctgc tttctgccta tgacctgttg cgaggtectt tcagctcctt ggcgacaaac 360
 cagaccctgg taaacagcct tctgaggcag gctcaaacac tggccaacgg cctcaagggt 420
 gcgttcacca ctcccagcgg tgtcccggac cctaccgtct tcttcaacce tactgtccgg 480
 agaagtggtg catctagcaa caacgctcgt gaaattggaa gcctgggtgt cgagtggaca 540
 cggttgagcg acctgacggg aaacccgcag tatgccacgc ttgcgcagaa gggcgagtcg 600
 tatctcctga atccaaaggg aagcccggag gcattggcctg gcctgattgg aacgtttgtc 660
 agcaccgagc acggtacctt tcaggatagc agcggcagct ggtecgccct catggacagc 720
 ttctacgagt acctgatcaa gatgtacctg tacgaccocg ttgcgtttgc aactacaag 780
 gatcgctggg tccttctctg cgactcgacc attgocgacc tcgcctctca cccgtcgacg 840
 cgcaaggact tgaccttttt gtcttcgtac aacggacagt ctacgtcgc aaactcagga 900
 catttgcca gttttgcgg tggcaacttc atcttgggag gcattctcct gaacgagcaa 960
 aagtacattg actttggaat caagcttgc agctcgtact ttgccacgta caaccagacg 1020
 gcttctggaa tcggccccga aggcttcgcg tgggtggaca gcgtgacggg cgccggcggc 1080
 tcgccgccct cgtcccagtc cgggttctac tcgtcggcag gattctgggt gacggcaccg 1140
 tattacatcc tgcggccgga gacgctggag agcttgtact acgcataccg cgtcacgggc 1200
 gactccaagt ggcaggacct ggcgtgggaa gcgttcagtg ccattgagga cgcattgccg 1260
 gccggcagcg cgtactcgtc catcaacgac gtgacgcagg ccaacggcgg ggggtgctct 1320
 gacgatatgg agagcttctg gtttgccgag gcgctcaagt atgcgtacct gatctttgcg 1380
 gaggagtcgg atgtgcaggt gcaggccaac ggcgggaaca aatttgtctt taacacggag 1440
 gcgcaccctt ttagcatccg ttcattcatca cgacggggcg gccaccttgc ttaa 1494

ES 2 534 465 T3

<210> 12
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de terminación de la transcripción AOX1 de *Pichia pastoris*

10

aagggcgaat tcaattcacg tggcccagcc ggcggtctcg gatcgggtacc tcgagccgcg 60
 gcggccgccca gcttggggccc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgcgcg 120
 tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt tagccttaga catgactggt cctcagttca 180
 agttggggcac ttacgagaag accggtcttg ctagattcta atcaagagga tgtcagaatg 240
 ccatttgccct gagagatgca ggcttcattt ttgatacttt tttatttgta acctatatag 300

 tataggattt tttttgtcat tttgtttctt ctcgtagcag cttgctcctg atcagcctat 360
 ctgcagctg atgaatatct tgtggtaggg gtttgggaaa atcattcgag tttgatgttt 420
 ttcttggtat tcccactcc tcttcagagt acagaagatt aagtgagacc ttcgtttgtg 480
 cggatc 486

15

<210> 13
 <211> 2550
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Casete de expresión alfa-1,2-mannosidasa de *Trichoderma reesei*

25

<221> promotor
 <222> (1) ... (507)
 <223> Secuencia promotora de GAPDH

30

<221> sig_peptide
 <222> (508) ... (564)
 <223> Secuencia pre-sígnal alfa-MAT que codifica a *Saccharomyces cerevisiae*

35

<221> CDS
 <222> (565) ... (205B)
 <223> Dominio catalítico alfa-1,2-mannosidasa que codifica a *Trichoderma reesei*

<221> terminador
 <222> (2065) ... (2550)
 <223> Secuencia de terminación de la transcripción AOX1 de *Pichia pastoris*

<400> 13

agatcttttt tgtagaaatg tcttgggtgc ctcgccaat caggtagcca tctctgaaat 60
 atctggctcc gttgcaactc cgaacgacct gctggcaacg taaaattctc cggggtaaaa 120
 cttaaagtgt gagtaatgga accagaaacg tctcttccct tctctctctc tccaccgcc 180

ES 2 534 465 T3

gttacgctcc ctaggaaatt ttactctgct ggagagcttc ttctacggcc cccttgccagc 240
aatgctcttc ccagcattac gttgcgggta aaacggaggt cgtgtacccg acctagcagc 300
ccagggatgg aaaagtcccg gccgtcgctg gcaataatag cgggcggacg catgtcatga 360
gattattgga aaccaccaga atcgaatata aaaggcgaac acctttccca attttggttt 420
ctcctgaccc aaagacttta aatttaattt atttgtccct atttcaatca attgaacaac 480
tatttcgaaa cgaggggaatt cgaaacg atg aga ttt cct tca att ttt act gct 534

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala

-15

gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta gct cgc gcc gga tct ccc aac 582
Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Arg Ala Gly Ser Pro Asn
-10 -5 1 5

cct acg agg gcg gca gca gtc aag gcc gca ttc cag acg tcg tgg aac 630
Pro Thr Arg Ala Ala Ala Val Lys Ala Ala Phe Gln Thr Ser Trp Asn
10 15 20

gct tac cac cat ttt gcc ttt ccc cat gac gac ctc cac ccg gtc agc 678
Ala Tyr His His Phe Ala Phe Pro His Asp Asp Leu His Pro Val Ser
25 30 35

aac agc ttt gat gat gag aga aac ggc tgg ggc tcg tcg gca atc gat 726
Asn Ser Phe Asp Asp Glu Arg Asn Gly Trp Gly Ser Ser Ala Ile Asp
40 45 50

ggc ttg gac acg gct atc ctc atg ggg gat gcc gac att gtg aac acg 774
Gly Leu Asp Thr Ala Ile Leu Met Gly Asp Ala Asp Ile Val Asn Thr
55 60 65 70

atc ctt cag tat gta ccg cag atc aac ttc acc acg act gcg gtt gcc 822
Ile Leu Gln Tyr Val Pro Gln Ile Asn Phe Thr Thr Thr Ala Val Ala
75 80 85

aac caa ggc atc tcc gtg ttc gag acc aac att cgg tac ctc ggt ggc 870
Asn Gln Gly Ile Ser Val Phe Glu Thr Asn Ile Arg Tyr Leu Gly Gly
90 95 100

ES 2 534 465 T3

ctg ctt tct gcc tat gac ctg ttg cga ggt cct ttc agc tcc ttg gcg 918
 Leu Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Leu Arg Gly Pro Phe Ser Ser Leu Ala
 105 110 115

aca aac cag acc ctg gta aac agc ctt ctg agg cag gct caa aca ctg 966
 Thr Asn Gln Thr Leu Val Asn Ser Leu Leu Arg Gln Ala Gln Thr Leu
 120 125 130

gcc aac ggc ctc aag gtt gcg ttc acc act ccc agc ggt gtc ccg gac 1014
 Ala Asn Gly Leu Lys Val Ala Phe Thr Thr Pro Ser Gly Val Pro Asp
 135 140 145 150

cct acc gtc ttc ttc aac cct act gtc cgg aga agt ggt gca tct agc 1062
 Pro Thr Val Phe Phe Asn Pro Thr Val Arg Arg Ser Gly Ala Ser Ser
 155 160 165

aac aac gtc gct gaa att gga agc ctg gtg ctc gag tgg aca cgg ttg 1110
 Asn Asn Val Ala Glu Ile Gly Ser Leu Val Leu Glu Trp Thr Arg Leu
 170 175 180

agc gac ctg acg gga aac ccg cag tat gcc cag ctt gcg cag aag ggc 1158
 Ser Asp Leu Thr Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Gln Leu Ala Gln Lys Gly
 185 190 195

gag tcg tat ctc ctg aat cca aag gga agc ccg gag gca tgg cct ggc 1206
 Glu Ser Tyr Leu Leu Asn Pro Lys Gly Ser Pro Glu Ala Trp Pro Gly
 200 205 210

ctg att gga acg ttt gtc agc acg agc aac ggt acc ttt cag gat agc 1254
 Leu Ile Gly Thr Phe Val Ser Thr Ser Asn Gly Thr Phe Gln Asp Ser
 215 220 225 230

agc ggc agc tgg tcc ggc ctc atg gac agc ttc tac gag tac ctg atc 1302
 Ser Gly Ser Trp Ser Gly Leu Met Asp Ser Phe Tyr Glu Tyr Leu Ile
 235 240 245

aag atg tac ctg tac gac ccg gtt gcg ttt gca cac tac aag gat cgc 1350

ES 2 534 465 T3

Lys Met Tyr Leu Tyr Asp Pro Val Ala Phe Ala His Tyr Lys Asp Arg	
250	255
260	
tgg gtc ctt gct gcc gac tcg acc att gcg cat ctc gcc tct cac ccg	1398
Trp Val Leu Ala Ala Asp Ser Thr Ile Ala His Leu Ala Ser His Pro	
265	270
275	
tcg acg cgc aag gac ttg acc ttt ttg tct tcg tac aac gga cag tct	1446
Ser Thr Arg Lys Asp Leu Thr Phe Leu Ser Ser Tyr Asn Gly Gln Ser	
280	285
290	
acg tcg cca aac tca gga cat ttg gcc agt ttt gcc ggt ggc aac ttc	1494
Thr Ser Pro Asn Ser Gly His Leu Ala Ser Phe Ala Gly Gly Asn Phe	
295	300
305	310
atc ttg gga ggc att ctc ctg aac gag caa aag tac att gac ttt gga	1542
Ile Leu Gly Gly Ile Leu Leu Asn Glu Gln Lys Tyr Ile Asp Phe Gly	
315	320
325	
atc aag ctt gcc agc tcg tac ttt gcc acg tac aac cag acg gct tct	1590
Ile Lys Leu Ala Ser Ser Tyr Phe Ala Thr Tyr Asn Gln Thr Ala Ser	
330	335
340	
gga atc ggc ccc gaa ggc ttc gcg tgg gtg gac agc gtg acg ggc gcc	1638
Gly Ile Gly Pro Glu Gly Phe Ala Trp Val Asp Ser Val Thr Gly Ala	
345	350
355	
ggc ggc tcg ccg ccc tcg tcc cag tcc ggg ttc tac tcg tcg gca gga	1686
Gly Gly Ser Pro Pro Ser Ser Gln Ser Gly Phe Tyr Ser Ser Ala Gly	
360	365
370	
ttc tgg gtg acg gca ccg tat tac atc ctg cgg ccg gag acg ctg gag	1734
Phe Trp Val Thr Ala Pro Tyr Tyr Ile Leu Arg Pro Glu Thr Leu Glu	
375	380
385	390
agc ttg tac tac gca tac cgc gtc acg ggc gac tcc aag tgg cag gac	1782
Ser Leu Tyr Tyr Ala Tyr Arg Val Thr Gly Asp Ser Lys Trp Gln Asp	

ES 2 534 465 T3

	395	400	405	
ctg gcg tgg gaa gcg ttc agt gcc att gag gac gca tgc cgc gcc ggc				1830
Leu Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ala Ile Glu Asp Ala Cys Arg Ala Gly				
	410	415	420	
agc gcg tac tcg tcc atc aac gac gtg acg cag gcc aac ggc ggg ggt				1878
Ser Ala Tyr Ser Ser Ile Asn Asp Val Thr Gln Ala Asn Gly Gly Gly				
	425	430	435	
gcc tct gac gat atg gag agc ttc tgg ttt gcc gag gcg ctc aag tat				1926
Ala Ser Asp Asp Met Glu Ser Phe Trp Phe Ala Glu Ala Leu Lys Tyr				
	440	445	450	
gcg tac ctg atc ttt gcg gag gag tcg gat gtg cag gtg cag gcc aac				1974
Ala Tyr Leu Ile Phe Ala Glu Glu Ser Asp Val Gln Val Gln Ala Asn				
	455	460	465	470
ggc ggg aac aaa ttt gtc ttt aac acg gag gcg cac ccc ttt agc atc				2022
Gly Gly Asn Lys Phe Val Phe Asn Thr Glu Ala His Pro Phe Ser Ile				
	475	480	485	
cgt tca tca tca cga cgg ggc ggc cac ctt gct taa ttaaggaagg				2068
Arg Ser Ser Ser Arg Arg Gly Gly His Leu Ala *				
	490	495		
gcgaattcaa ttcacgtggc ccagccggcc gtctcggatc ggtacctcga gccgcggcgg				2128
ccgccagctt gggcccgaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaata gcgccgtcga				2188
ccatcatcat catcatcatt gagttttagc cttagacatg actgttcctc agttcaagtt				2248
gggcacttac gagaagaccg gtcttgctag attctaataca agaggatgtc agaatgccat				2308
ttgcctgaga gatgcaggct tcatttttga tactttttta tttgtaacct atatagtata				2368
ggattttttt tgtcattttg tttcttctcg tacgagcttg ctctgatca gcctatctcg				2428
cagctgatga atatcttggt gtaggggttt gggaaaatca ttcgagtttg atgtttttct				2488
tggtatttcc cactcctctt cagagtacag aagattaagt gagaccttcg tttgtgcgga				2548
tc				2550

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida, que comprende:
- 5 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una glucoproteína y un segundo ácido nucleico que codifica una α 1,2-manosidasa;
- (b) introducir el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en una célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora que contiene el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico para producir un cultivo de la célula hospedadora;
- 10 (c) poner en contacto el cultivo de la célula hospedadora con uno o más inhibidores de la glucosilación O-ligada mediada por Dol-P-Man:Proteína (Ser/Thr) Manosil Transferasa (Pmt); y
- (d) aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la α -1,2-manosidasa comprende el dominio catalítico de una α -1,2-manosidasa unido de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de direccionamiento celular no asociado normalmente con el dominio catalítico.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se cultiva en presencia del uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras que tienen el ácido nucleico y el segundo ácido nucleico antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y un inductor de los promotores para inducir la expresión de la proteína y la α 1,2-manosidasa y aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica la glucoproteína y el segundo ácido nucleico que codifica la α -1,2-manosidasa están unidos de forma funcional a un promotor inducible.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que el cultivo se pone en contacto con un inductor de los promotores para inducir la expresión de la proteína y la α 1,2-manosidasa durante un tiempo antes de poner en contacto el cultivo con el uno o más inhibidores de glucosilación O-ligada mediada por Pmt y aislar la glucoproteína producida por la célula hospedadora en presencia del uno o más inhibidores y el inductor para producir la proteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se cultiva durante un tiempo suficiente para proporcionar una multiplicidad de las células hospedadoras antes de inducir la expresión de la proteína y la una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la glucoproteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de la proteína se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa para producir la glucoproteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de la una o más enzimas α -1,2-manosidasa capaces de inhibir la glucosilación O-ligada se induce durante un tiempo antes de inducir la expresión de la glucoproteína para producir la glucoproteína que tiene glucosilación O-ligada reducida.
- 55 11. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más inhibidores se seleccionan entre el grupo que consiste en: ácido 5-[[3,4-bis(fenilmetoxi)fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; ácido 5-[[3-(1-feniletotoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético; y ácido 5-[[3-(1-fenil-2-hidroxietoxi)-4-(2-feniletotoxi)]fenil]metileno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinaacético.
- 60 12. El método de la reivindicación 1, en el que la α -1,2-manosidasa es de *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces* sp. o *Aspergillus* sp.
13. El método de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora es una célula fúngica o una célula de levadura.
- 65 14. El método de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en *K. lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolic*, y *Hansenula*.

15. El método de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora es una célula de levadura o un hongo filamentoso que se ha modificado genéticamente para producir glucoproteínas con una glucoforma predominante de N-glucano.
- 5 16. El método de la reivindicación 1, en el que las células hospedadoras se han modificado genéticamente para producir glucoproteínas en el que el patrón de N-glucosilación es de tipo humano o humanizado.

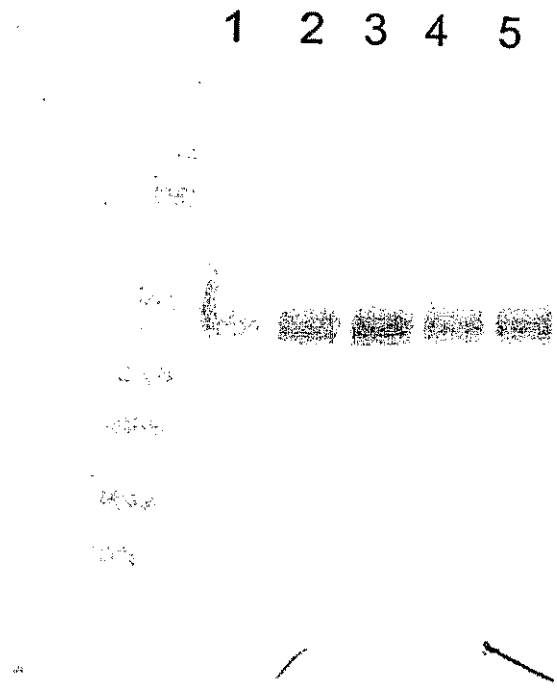


Fig. 1

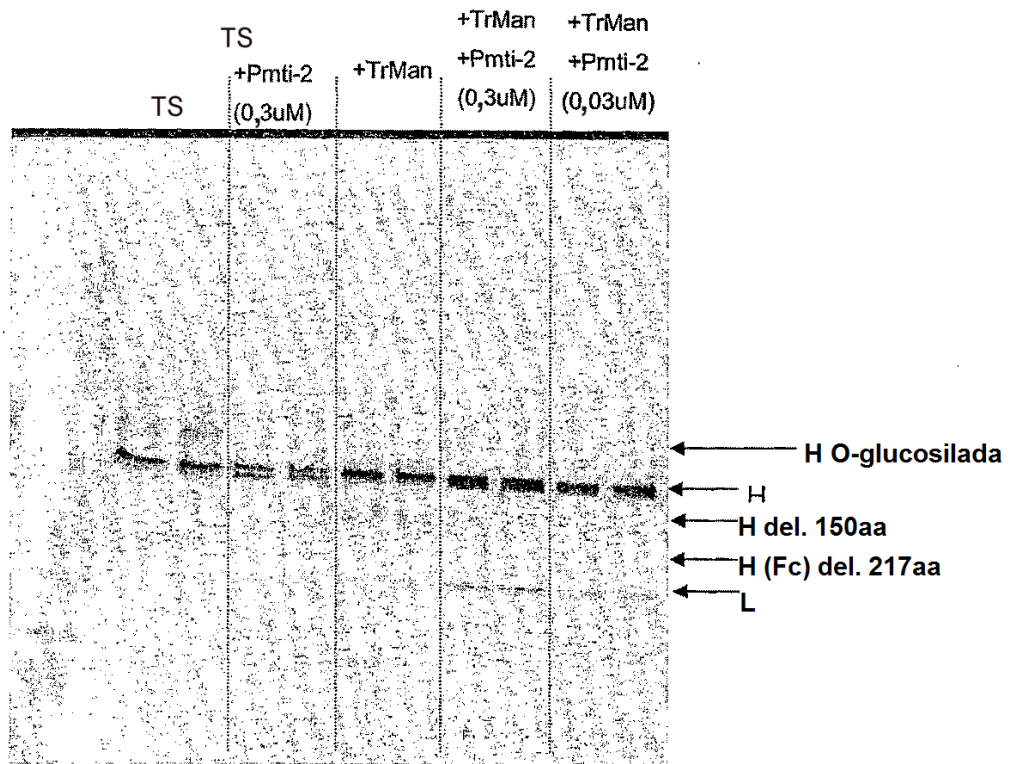


FIG. 2