



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 360**

51 Int. Cl.:
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06716639 .7**

96 Fecha de presentación : **03.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1861504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54 Título: **Glicoingeniería en setas.**

30 Prioridad: **07.03.2005 EP 05075551**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2010

73 Titular/es:
**Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Costerweg 50
6701 BH Wageningen, NL**

72 Inventor/es: **Rouwendal, Gerard, Johan, Adolph;
Florack, Dionisius, Elisabeth, Antonius;
Bosch, Hendrik, Jan y
Lugones, Luis, Gast n**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 338 360 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

Glicoingeniería en setas.

5 La invención se refiere al campo de la ingeniería genética, más específicamente al campo de la producción de glicoproteínas, más específicamente a la ingeniería del modelo de glicosilación de glicoproteínas.

10 Las glicoproteínas son proteínas que se han sometido a la llamada modificación post-translacional, en el sentido de que los grupos azúcar están covalentemente acoplados a la proteína. Se encontró que aproximadamente el 50% de las proteínas producidas por una célula viva sufren la glicosilación. Además, parece que el tipo de glicosilación es diferente entre los eucariotas, lo que significa que se usan tipos diferentes de restos de azúcar y/o un orden diferente de unión de los restos a la estructura de la proteína, formándose así una variedad de estructuras de ramificación. La glicosilación de proteínas está muy regulada y cambia durante la diferenciación, el desarrollo, bajo las diferentes condiciones fisiológicas y de cultivo de la célula y en la enfermedad. La glicosilación de proteínas recombinantes, sobre todo aquellas destinadas a una administración potencial a sujetos humanos, tiene una importancia crítica, ya que afecta a muchas propiedades de la (glico)proteína, tales como un plegamiento apropiado, resistencia/sensibilidad de proteasa, tráfico intracelular y compartimentalización, afinidades intermoleculares y reconocimiento de tejidos. La glicosilación afecta además profundamente al período de semivida biológico, la actividad, la función, la solubilidad, el aclaramiento desde la circulación y, crucial para las glicoproteínas farmacéuticas pretendidas, la antigenicidad.

20 Las células de especies no humanas no glicosilan sus proteínas del mismo modo que lo hacen las células humanas. En muchos casos, las diferencias son profundas. En general, las especies más distantes a los seres humanos en términos evolutivos, tales como bacterias, levaduras, hongos, insectos y plantas - las especies usadas más comúnmente en sistemas de expresión - tienen repertorios de glicosilación menores que el nuestro propio.

25 Los anticuerpos monoclonales secretados por sistemas de expresión de células recombinantes u organismos transgénicos casi siempre contienen un sitio de glicosilación único en Asn 297, un sitio localizado en el dominio CH2 dentro de la región Fc de la molécula. Los anticuerpos monoclonales que carecen del glicano N-unido en el dominio CH2 exhiben una unión de antígeno normal mediada por regiones hipervariables de las partes Fab de la molécula, pero son deficientes en las funciones del efector de Fc, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la lisis mediada por complemento (CDL). Estas y otras funciones del efector requieren el reconocimiento molecular entre el dominio Fc de la molécula IgG y proteínas tales como los receptores de Fc en las superficies de inmunocitos (ADCC) o proteínas solubles que inician la cascada del complemento (CML). La glicosilación es importante para la función efectora del anticuerpo, tal como ADCC y CML, que media la eliminación de células tumorales por anticuerpos desarrollados como oncolíticos.

35 Muchos sistemas de expresión son hoy día empleados o explorados como plataformas de producción biofarmacéuticas (*E. coli*, células CHO, células de insecto, plantas, algas, levaduras, hongos filamentosos, etc.). La conveniencia es determinada por muchos parámetros, como por ejemplo seguridad, eficacia, gastos y, por último, por modificaciones post-translacionales que, o bien, son requeridas, o bien, tienen que estar ausentes.

45 Están siendo explorados sistemas de expresión de levadura, y *Pichia pastoris*, en particular, como potenciales plataformas de producción para agentes biofarmacéuticos con requerimientos especiales en cuanto a la N-glicosilación. Como se discute anteriormente, la composición actual de esta modificación post-translacional es esencial para ciertos enfoques terapéuticos que implican anticuerpos monoclonales, sobre todo aquellos que requieren la acción del sistema inmunológico del paciente. Para este fin, tuvieron que ser establecidos cambios fundamentales en la ruta de N-glicosilación de esta levadura.

50 Aún queda la necesidad de un sistema que proporcione una glicosilación "tipo humana" con eficacia, de bajo coste y alto rendimiento.

Resumen de la invención

55 Los presentes inventores observaron que varios basidiomicetos carecen de N-glicanos hipermanosilados o complejos y que contienen principalmente N-glicanos con alto contenido en manosa en el intervalo de Man9 hasta Man5. Se encontró que la mera introducción de una actividad de GnT-I heteróloga, sin ninguna interferencia adicional con la ruta de N-glicosilación, permite la síntesis de la estructura híbrida GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂ (también denominada GnM5) en basidiomicetos. Esta estructura híbrida puede ser modificada después *in vivo* o *in vitro* para obtener una glicoproteína recombinante con un modelo de N-glicosilación tipo mamífero.

Descripción de las figuras

65 Figura 1. Espectros de masa MALDI-TOF de aductos (M + Na)⁺ de N-glicanos de carpóforos del tipo silvestre de *S. commune* (panel A) y la línea transgénica Sc2 (panel B) transformada con el gen de GnT-I humano. La flecha indica el ión correspondiente a GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂ en m/z 1460,5.

Figura 2. Un detalle de espectros de masa MALDI-TOF mostrados en la Figura 1. *S. commune* tipo silvestre (panel A) y la línea transgénica Sc2 transformada con el gen de GnT-I humano (panel B). La flecha indica el ión correspondiente a $\text{GlcNAc}(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ en m/z 1460,5.

5 Figura 3. Espectros de masa MALDI-TOF de aductos de $(M + \text{Na})^+$ de N-glicanos de carpóforos de *S. commune* tipo silvestre (panel A) y la línea transgénica Sc12 (panel B) transformada con el gen de GnT-I humano. La flecha indica el ión correspondiente a $\text{GlcNAc}(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ en m/z 1460,5.

10 Figura 4. Un detalle de espectros de masa MALDI-TOF mostrados en la Figura 3. *S. commune* tipo silvestre (panel A) y la línea transgénica Sc2 transformada con el gen de GnT-I humano (panel B). La flecha indica el ión correspondiente a $\text{GlcNAc}(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ en m/z 1460,5.

15 Figura 5. Transferencia Northern del ARN total purificado de micelios de ocho transformantes de *S. commune* que contienen el gen de hGnT-I usando un fragmento de este gen como sonda. La banda indicada por la flecha representa el transcrito de GnT-I.

Figura 6. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de Sall/EcoRI que comprende el promotor de *gpd* de *Schizophyllum commune*, el cDNA que codifica el GnT-I humano y una secuencia de terminación.

20 Descripción detallada de la invención

El modelo de glicosilación de proteínas humanas difiere de las glicosilaciones que pueden observarse en proteínas expresadas en sistemas de expresión de proteínas eucarióticos usados a menudo, tales como levaduras, plantas y células mamíferas (para una revisión, véase, por ejemplo, Spiro (2002), *Glycobiology*, Volumen 12, N°. 4, pp. 43R-56R).

25 Las bacterias, sobre todo la mayor parte usadas a gran escala para la producción de proteínas recombinantes, tienen la desventaja de que no glicosilan las proteínas recombinantemente expresadas.

30 Como es de esperar, la glicosilación en sistemas de expresión de células de mamíferos es la que más se parece a la glicosilación humana. Sin embargo, las líneas de células de mamíferos que son capaces de reproducir el procesamiento de glicoproteínas tipo humano tienen varios inconvenientes incluyendo bajos títulos de proteínas, tiempos de fermentación largos, productos heterogéneos y cuestiones de contención viral continua. Por ejemplo, parece que las células CHO, que son genéticamente modificadas para producir grandes cantidades de una proteína específica, no mantienen a menudo el nivel apropiado de glicosilación. Esto causa bajos rendimientos del producto utilizable, lo que contribuye al coste y a la complejidad de producir estas glicoproteínas.

40 La glicosilación en plantas ha sido propuesta como una alternativa, pero lograr los modelos de glicosilación deseados es todavía un problema con estos sistemas y es una barrera significativa para su adopción extendida para proteínas industriales.

Las levaduras y los hongos filamentosos son organismos de fermentación industrial robustos que pueden ser cultivados con una alta densidad de células en medios químicos definidos. Sin embargo, las glicoproteínas derivadas de sistemas de expresión fungosos y de levadura contienen a N-glicanos no humanos del tipo de alto contenido en manosa, que son inmunógenos en seres humanos y, por eso, de un valor terapéutico limitado. Las levaduras y los mamíferos comparten etapas iniciales de la N-glicosilación de proteínas, lo que implica una transferencia específica al sitio de $(\text{GlcNAc})_3-(\text{Man})_5-(\text{GlcNAc})_2$ del lado luminal del retículo endoplásmico (RE) a la proteína sintetizada *de novo*. Los posteriores recortes por glucosidasas I y II y una α -1,2-manosidasa residente en RE específica conduce a la formación de una estructura $(\text{Man})_8(\text{GlcNAc})_2$ (isómero ManBB), el N-glicano encontrado en la mayor parte de las glicoproteínas que dejan el RE. Después de la exportación de glicoproteínas que contienen $(\text{Man})_8-(\text{GlcNAc})_2$ predominantemente al aparato de Golgi, las rutas de procesamiento de N-glicano divergen notablemente entre mamíferos y levadura. El aparato de Golgi humano contiene varias α -1,2-manosidasas que eliminan la manosa para producir $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ (también denominada Man5). La estructura de Man5 es el aceptador preferido para N-acetilglucosaminil-transferasa I (GnT I), produciendo la estructura híbrida $\text{GlcNAc}(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ (también denominada GlcNAcMan_5 o GnM_5), que es el precursor para los N-glicanos complejos. Por otro lado, la N-glicosilación en levadura (p.ej. *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) no implica la retirada de residuos de manosa, sino la adición de numerosos residuos de manosa. Esto a menudo conduce a N-glicanos hipermanosilados con más de 100 residuos de manosa. Los modelos de glicosilación de levadura de panadero son muy inmunógenos en mamíferos (Balou, C.E. (1982) En: Strathern, J.N. *et al.* (editores.) "The Molecular Biology of The Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and Gene Expression". Cold Spring Harbor Laboratory Press, págs. 335-360). Además, los N-glicanos del tipo alto contenido en manosa de levadura no sirven como aceptador para GnT-I y por lo tanto no permiten su uso como precursores para N-glicanos complejos.

65 Se han emprendido varias tentativas para "humanizar" la ruta de glicosilación en hongos filamentosos y levadura. En el primero de estos estudios, se intentó usar *Aspergillus nidulans* como huésped para la expresión del GnT-I de conejo de cadena completa (Kalsner *et al.*, 1995). Se encontró intracelularmente actividad de GnT-I, pero no se detectó ninguna transferencia *in vivo* de residuos de GlcNAc a N-glicanos fungosos, posiblemente debido a los niveles insuficientes del aceptador de $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$. En 1997, Maras *et al.* mostraron que la *Trichoderma reesei* contenía el aceptador requerido para la actividad de GnT-I. Más tarde, se expresaron genes de GnT-I de rata y humano en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo filamentoso *T. reesei*, respectivamente, pero la transferencia exitosa *in*

vivo de residuos de GlcNAc sólo fue detectada en *T. reesei* (Yoshida *et al.*, 1999; Maras *et al.*, 1999). Otra vez, la falta de un aceptador adecuado combinada con la ausencia de un transportador de UDP-GlcNAc de Golgi prevendrá la adición de GlcNAc a N-glicanos de levadura. Además, se encontró que sólo una fracción menor de oligosacáridos de *T. reesei* liberados de glicoproteínas de *T. reesei* era Man₅(GlcNAc)₂. Más abundantes eran los oligosacáridos con de 6 a 9 residuos de manosa y también se encontraron N-glicanos con más de 9 residuos de manosa (véase el documento de EE.UU. N°. 5.834.251). En general, las estructuras de alto contenido en manosa son rápidamente retiradas en los seres humanos. Y, sobre todo, las estructuras con contenido ultra-alto de manosa (más de 9 residuos de manosa) son inmunógenas.

La glico-ingeniería de N-glicanos fungosos en la levadura *Pichia pastoris* requiere muchos cambios radicales en la maquinaria de la N-glicosilación natural, porque las cepas silvestres producen oligosacáridos N-unidos que no pueden actuar como aceptadores para las enzimas de planta y mamíferas que constituyen la ruta de N-glicosilación engranada hacia la síntesis de N-glicanos complejos (Choi *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2003). En primer lugar, se hizo un mutante del gen Och1p que codifica la α -1,6-manosiltransferasa que cataliza la adición de un residuo de manosa que inicia la adición de todavía más azúcares de manosa para el crecimiento de la estructura de N-glicanos. El mutante de este gen redujo enormemente la síntesis de N-glicanos hipermanosilados muy indeseables, pero requirió la introducción de una α -1,2-manosidasa I heteróloga localizada en el RE para lograr cepas de levadura que producen estructuras de N-glicano de Man₅ abundantes que constituyen el precursor para GnT-I. La expresión de genes de GnT-I heterólogos en los transformantes dobles produjo varias cepas capaces de transferir un azúcar de amino de GlcNAc a Man₅. Sin embargo, la eficacia fue baja y requirió la introducción de un cuarto transgen que codificaba el transportador de UDP-GlcNAc de *Kluyveromyces lactis* para lograr la conversión casi completa del N-glicano Man₅ en el híbrido GnM₅. Otra ingeniería genética que usaba manosidasa-II heteróloga y genes de GnT-II proporcionó cepas capaces de sintetizar estructuras de Gn2Man₃ uniformes. El empleo de una cepa de alg3 mutante permitió el desarrollo de cepas de *P. pastoris* que sintetizaban N-glicanos homogéneos de Gn2Man₃ sin usar una actividad de manosidasa-II. La falta de actividad de Alg3 genera N-glicanos que son fácilmente conformados en una estructura de Man₃ por una actividad de α -1,2-manosidasa-I codificada por un transgen que ha sido introducido en estas cepas (Bobrowicz *et al.*, 2004). De hecho, estos autores mostraron que la expresión de una enzima híbrida localizada en el aparato de Golgi que consiste en actividades de UDP-glucosa 4-epimerasa y β -1,4-galactosiltransferasas podría usarse para producir N-glicanos bi-antenarios, totalmente galactosilados, en esta levadura.

Así, aunque los hongos y los mamíferos comparten las etapas iniciales de la N-glicosilación de proteínas, la abundancia de N-glicanos hipermanosilados y la carencia de precursores para N-glicanos “tipo mamíferos” complejos los hacen poco atractivos para la producción de glicoproteínas recombinantes humanas.

Los presentes inventores encontraron que varios basidiomicetos carecen de N-glicanos hipermanosilados o complejos que contengan alto contenido en manosa y sólo contienen N-glicanos en el intervalo de Man₉ hasta Man₅. La presencia de cantidades significativas de N-glicanos Man₅ sugiere la presencia de una o varias α -1,2-manosidasas en el RE y/o aparato de Golgi que conforman la estructura de Man₉ hasta Man₅ y estructuras intermedias. Además, parecía que los basidiomicetos, al menos dos de ellos de los cuales el genoma ha sido completamente secuenciado (*Coprinus cinereus* y *Phanerochaete chrysosporium*), no contenían genes que codificaran enzimas implicadas en la síntesis de N-glicanos complejos. A diferencia de los hongos filamentosos y sistemas de expresión de levaduras descritos antes, parecía innecesario en los basidiomicetos interferir (genéticamente) con la ruta de N-glicosilación endógena para producir la N-glicosilación tipo mamífero, más específicamente, para producir la formación de la estructura híbrida GlcNAcMan₅(GlcNAc)₂ que es la primera etapa comprometida hacia la síntesis de N-glicanos híbridos y complejos. Como se muestra en este documento, la mera introducción de una actividad de GnT-I heteróloga, sin ninguna interferencia adicional con la ruta de N-glicosilación, permite la síntesis de GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂(GnM₅) en basidiomicetos. En consecuencia, la invención se refiere a un método para producir una proteína glicosilada en una célula huésped recombinante, en el que dicha célula huésped es un basidiomiceto provisto con actividad de UDP-N-acetilglucosamina: α -3-D-manosida β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT-I; CE 2.4.1.101). La GnT-I cataliza la siguiente reacción: UDP-N-acetil-D-glucosamina + 3-(α -D-manosil)- β -D-manosil-R \rightarrow UDP + 3-(2-[N-acetil- β -D-glucosaminil]- α -D-manosil)- β -D-manosil-R. La GnT-I es muy específica y sólo transfiere GlcNAc a la manosa α -1,3-unida periférica de una estructura Man₅(GlcNAc)₂. Otros nombres comunes para GnT-I son: α -1,3-manosil-glicoproteína 2- β -N-acetilglucosaminiltransferasa; N-acetilglucosaminiltransferasa I; N-glicosiloligosacárido-glicoproteína N-acetilglucosaminiltransferasa I; uridina difosfoacetilglucosamina- α -1,3-manosilglicoproteína β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa; UDP-N-acetilglucosaminil: α -3-D-manosida β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I y α -1,3-manosil-glicoproteína β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa. Además, la invención proporciona un método para expresar una enzima glicosiltransferasa heteróloga en un basidiomiceto, que comprende proporcionar dicho basidiomiceto con un constructo de ácido nucleico que codifica GnT-I, preferiblemente GnT-I humano, y que permite la expresión de dicho constructo en dicho basidiomiceto. La expresión de glucosiltransferasa heteróloga puede usarse para sintetizar enzimáticamente glicoproteínas y glicolípidos que tengan restos de oligosacáridos deseados en una célula huésped de basidiomiceto.

Los basidiomicetos están filogenéticamente mucho más cercanos a los animales que las levaduras (T.L. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7063 (1989)). En una realización, se usa una *Pleurotus* spp. o *Auricularia* spp. Muchas setas comestibles pertenecen al orden de Agaricales dentro de la subdivisión de Basidiomicetos. La familia de Agaricaceae es grande e incluye muchas setas familiares. Por ejemplo, *Agaricus bisporus* es el champiñón cultivado común. La *Pleurotus ostreatus*, que pertenece a la familia de Pleurotaceae, es una seta comestible comercialmente importante comúnmente conocida como la girbola. Este hongo es producido industrialmente como comida humana, y

constituye casi un cuarto de la producción de seta mundial. ,Por supuesto, también pueden usarse miembros de otras familias dentro de la subclase de holobasidiomycetida (setas sustanciales), tales como Schizophyllaceae.

El uso de basidiomicetos como punto de partida para la producción de proteínas con un modelo de glicosilación tipo humano proporciona tiempos más rápidos al mercado debido a las mencionadas ventajas anteriores. También el hecho de que el organismo de producción pueda tener un estado GRAYS (generalmente reconocido como seguro) proporciona una ruta de proceso rápida, ya que pueden ser evitadas largas, laboriosas e incómodas pruebas de aceptación. Además, la producción heteróloga en basidiomicetos plantea menos riesgos medioambientales y puede considerarse que da menos cuestiones de contención.

En una realización de la invención, se selecciona un basidiomiceto entre el grupo que consiste en *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Agrocybe aegerita*, *Coprinus cinereus*, *Lentinus edodes*, *Lepista nuda*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pholiota nameko*, *Boletus edulis*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus*, *Volvariella volvacea*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis*, *Auricularia auricular*, *Lyophyllum descendens*, *Naematoloma sublaterium*, *Stropharia rugoso-annulata* y *Cordyceps sinense*. En una realización preferida, el basidiomiceto puede ser cultivado en un medio artificial. Por ejemplo, se usa una *Schizophyllum* spp., tal como la *S. commune*. Además, el uso de un basidiomiceto sin esporas en un método de la invención, tal como *Pleurotus ostreatus*, es ventajoso porque requiere menos medidas de seguridad rigurosas. Cuando la célula huésped de basidiomiceto tiene que ser provista con actividad de GnT-I heteróloga, se requiere, por supuesto, que el basidiomiceto pueda ser transformado o, por otra parte, proporcionado con un constructo de ADN heterólogo. Los métodos para transformar basidiomicetos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Alves *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* 2004; **70** (II):6379; Godio *et al.*, *Curr. Genet.* 5 de octubre de 2004; Schuurs *et al.*, *Genetics.* 1997; **147** (2):589). El documento EP-A-0 570096 describe un sistema huésped-vector de basidiomiceto que implica al gen de OCTase de *Corioius hirsutus*.

Según la invención, los N-glicanos de Man₅ endógenos presentes naturalmente en basidiomicetos (o al menos parte de estos) pueden ser convertidos en N-glicanos de GlcNAcMan₅ por una actividad de GnT-I heteróloga. Esta etapa constituye la primera etapa dirigida hacia la formación de N-glicanos híbridos y complejos y como tal se requiere para cualquier etapa de glicoingeniería posterior. Requiere el uso de un gen de GnT-I heterólogo que sea adecuado para la expresión en basidiomicetos. La expresión de genes en basidiomicetos requiere una cierta composición de nucleótidos y es potenciada por la presencia de intrones (Schuren y Wessels, 1998; Lugones *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001; Scholtmeijer *et al.*, 2001). Preferiblemente, el gen que codifica a GnT-I que se usa para la expresión en un basidiomiceto tiene un contenido de G/C de al menos el 50% y ninguna extensión de aproximadamente 10 nucleótidos o menos con más de un 90% de A o T. Por lo tanto, los genes de fuentes heterólogas pueden requerir que la modificación consiga la expresión significativa en una célula huésped de basidiomiceto.

Por ejemplo, la expresión de un clon de cDNA derivado de planta que codifica GnT-I como el de *Arabidopsis thaliana* (Bakker *et al.*, 1999) requeriría la modificación extensa de la composición de nucleótidos para lograr la producción de la enzima y la modificación de modelos de N-glicano en basidiomicetos transformados. Existen diversos métodos que, por lo general, implican algún tipo de extensión PCR con solapamiento comenzando con oligonucleótidos largos, lo que puede ser empleado para construir un gen con la composición de nucleótidos deseada. Sin embargo, no puede excluirse que puedan encontrarse genes de cDNA de planta que cumplan todos los criterios para la expresión adecuada en basidiomicetos. En particular, pueden ser útiles en este sentido genes de cDNA de origen monocotiledóneo.

El cDNA de GnT-I humano es especialmente adecuado para poner en práctica la presente invención, ya que su composición de nucleótidos natural parece hacerlo adecuado para una expresión sin modificación. Sin embargo, serían adecuados muchos clones de cDNA más que codificaran otras enzimas de GnT-I de vertebrados.

Para conseguir la expresión de un gen de GnT-I adecuado en basidiomicetos, se clona típicamente su marco de lectura abierto completo en un vector de expresión adecuado para la transformación de basidiomicetos. El vector de expresión preferiblemente también comprende secuencias de ácidos nucleicos que regulan la iniciación de la transcripción y la terminación. También se prefiere incorporar al menos un gen marcador seleccionable para proporcionar la selección de transformantes. La expresión de una glucosiltransferasa puede conseguirse usando un promotor de basidiomiceto, p.ej un promotor constitutivo o un promotor inducible. Sobre todo son adecuados promotores constitutivos derivados de genes que codifican enzimas implicadas en la ruta glicolítica. Un ejemplo de un constitutivo fuerte es el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpdA). Este promotor es preferido para la expresión constitutiva cuando el material de ADN recombinante se expresa en un huésped de basidiomiceto. Otros ejemplos son el promotor de fosfoglicerato quinasa (pgk), el promotor de piruvato quinasa (pki), TPI, el promotor de triosa fosfato isomerasa (tpi), el promotor de la subunidad g de APC sintetasa (oliC) y el promotor de acetamidasa (amdS) de un basidiomiceto (documento WO96/41882).

En una realización, se usa un promotor de *gpd* (gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de basidiomiceto o una parte de éste, por ejemplo (una parte de) el promotor de *gpd* de *S. commune* o el promotor de *gpd* de *Lentinus edodes*. En otra realización, dicho promotor de *gpd* incluye el intrón 1 para potenciar la expresión del gen heterólogo (Ma *et al.*, 2001). Por ejemplo, se proporciona un basidiomiceto con un plásmido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de GnT-I humana flanqueada con una secuencia promotora de *gpd* de basidiomiceto, opcionalmente incluyendo el intrón 1, y una secuencia de terminación de basidiomiceto (véase, por ejemplo, la Figura 6). En una realización específica, la expresión de GnT-I en *S. commune* se consigue por la construcción de un vector que comprende

al promotor derivado de *S. commune* y un terminador derivado de *S. commune* con un intrón artificialmente añadido que flanquea el sitio de introducción del gen de GnT-I y un casete génico que presenta un marcador de resistencia a la fleomicina (Schuren y Wessels, 1994).

5 Los ejemplos de promotores inducibles son los promotores de basidiomiceto de los genes siguientes: xilanasas A (*xylA*), glucoamilasa A (*glaA*), celobiohidrolasa (*cbh*), amilasa (*amy*), invertasa (*suc*) y alcohol deshidrogenasa *alcA*, TAKA amilasa y amilogucosidasa (*ACT*) (véase el documento WO96/41882).

10 El documento WO2004/039985 describe promotores de transcripción fungosos que se usan adecuadamente para la expresión de genes heterólogos en un basidiomiceto. El documento WO2004/039985 describe que tres genes del basidiomiceto *Agaricus bisporus*, *abst1*, *raf1* y *mag2*, son considerablemente activos sólo durante la etapa 1, o más tarde, del desarrollo del carpóforo del hongo. El ADN heterólogo bajo el control de los mecanismos de expresión de estos genes fungosos proporciona una expresión selectiva en esta etapa del desarrollo del hongo, en vez que durante el crecimiento del micelio. De esa manera, poca o ninguna energía metabólica tiene que ser invertida a partir del crecimiento de micelio, maximizándose así la masa de carpóforo y el tejido concomitante capaz de expresar el gen heterólogo una vez que esté activado.

20 El constructo que codifica GnT-I puede ser transferido a un basidiomiceto según procedimientos estándares. En una realización, los protoplastos del monocarión de basidiomiceto son transformados como se describe en Schuren y Wessels (1994). Los transformantes pueden seleccionarse en el medio de selección. Después de algún tiempo, pueden cosecharse tapones micelares y cultivarse después en medio recién preparado.

25 Como se ha dicho, la invención permite la producción recombinante de una proteína de interés con un modelo de N-glicosilación tipo humano en un basidiomiceto. En una realización, una proteína de interés es una glicoproteína, tal como un anticuerpo (inmunoglobulina; Ig) o una hormona que debe ser proporcionada a un paciente en necesidad de la proteína, sobre todo por motivos terapéuticos.

30 En una realización, un método de la invención proporciona una molécula Ig glicosilada o su fragmento. Por ejemplo, el anticuerpo es una IgM, IgA, IgG o IgE de mamífero, o su fragmento. El contenido de hidratos de carbono de las Ig varía del 12-14%. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región Fc. La región IgG-Fc es un homodímero comprendido de regiones bisagra unidas a disulfuro intercadenas, dominios CH2 glicosilados, que llevan el oligosacárido N-unido en la asparagina 297 y dominios CH3 emparejados no covalentemente. Se ha demostrado que los mecanismos efectores mediados por FcγRI, FcγRII, FcγRIII y CIq están fuertemente comprometidos para las formas aglicosiladas o desglicosiladas de IgG. Las interacciones no covalentes múltiples entre el oligosacárido y la proteína causan unas influencias recíprocas en la conformación. El sitio de unión del oligosacárido, Asn 297, es proximal a la región N-terminal del dominio CH2, a partir de cuyo punto "corre hacia adelante" tal que los residuos de azúcar terminales están expuestos en el interfaz del dominio CH2/CH3. En una realización particularmente preferida, la invención proporciona la producción de un anticuerpo monoclonal en una célula huésped de basidiomiceto.

40 Los ejemplos de glicohormonas en las que la glicosilación desempeña un papel en las propiedades de tal hormona, sobre todo las propiedades terapéuticas, incluyen eritropoyetina (EPO), coriogonadotropina humana (HCG), follitropina (FSH), tirotrópina (TSH) y lutropina (LH). Sobre todo, aquellas proteínas que requieren el reconocimiento de órganos específicos o células a través del reconocimiento de azúcar-lectina son sustratos de proteína útiles para la modificación de modelos de glicosilación según la invención. El método de la invención es también útil para la fabricación de una proteína para uso en la sustitución de enzimas o terapia de reemplazo. En tal terapia, una enzima, que está baja en una célula u órgano, es reconocida por la célula u órgano proporcionando la enzima con un modelo de glicosilación apropiado.

50 La expresión de la proteína recombinante en un basidiomiceto puede conseguirse usando un vector de expresión adecuado en una manera similar a la que se describe antes para la expresión de GnT-I heterólogo.

La proteína N-glicosilada resultante de interés puede cosecharse a partir de basidiomicetos según procedimientos comunes que implican etapas de extracción de tejido, centrifugación y cromatográficas según la naturaleza de la proteína de interés.

55 La estructura híbrida GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂ producida en el basidiomiceto en virtud de la actividad de GnT-I heteróloga, puede ser modificada además, *in vivo* o *in vitro*, en N-glicanos complejos usando una o varias enzimas de modificación de glicosilación. Las enzimas de modificación de la glicosilación que son útiles en los métodos de la invención incluyen transferasas y manosidasas. La sección III del documento de EE.UU. N.º. 5.834.251 proporciona información detallada respecto a enzimas de modificación de la glicosilación que pueden ser usadas para poner en práctica la presente invención. Por ejemplo, la estructura híbrida GlcNAcMan₃GlcNAc₂ producida en el basidiomiceto en virtud de la actividad de GnT-I heteróloga puede ser tratada *in vivo* o *in vitro* con α-manosidasa II para producir GlcNAcMan₃GlcNAc₂. Esto puede servir posteriormente como un sustrato para GlcNAc-transferasa II o galactosiltransferasa usando UDP-GlcNAc o UDP-Gal, respectivamente para producir un modelo de glicosilación tipo complejo. Si Man-I y Man-II han funcionado correctamente, no quedaría ninguna manosa indeseable en esta etapa. Sin embargo, de ser requerido, cualquier residuo de manosa α-1,3- y α-1,6-unido restante puede ser retirado *in vivo* o *in vitro* usando una manosidasa "no específica" tal como, por ejemplo, la manosidasa de judía Jack comercialmente disponible, convirtiendo así una estructura de N-glicano híbrida en una compleja.

ES 2 338 360 T3

La modificación posterior puede realizarse *in vivo* y/o *in vitro*. Por supuesto, para la modificación posterior *in vivo* se requiere que la célula huésped de basidiomiceto sea proporcionada con la(s) necesaria(s) actividad(es) enzimática(s). Esto se consigue por la expresión del(de los) gen(es) heterólogo(s) que codifica(n) la(s) enzima(s).

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped de basidiomiceto que comprende la actividad de GnT-I, preferiblemente un basidiomiceto que expresa a GnT-I humano. También se proporciona el uso de un basidiomiceto como una célula huésped para la producción de una proteína (mamífera) N-glicosilada heteróloga. A causa de la significativa producción endógena de estructuras (Man)₅(GlcNAc)₂-N-glicano, un basidiomiceto proporciona un punto de partida ventajoso para la glicoingeniería de N-glicanos complejos. También se abarca la conversión *in vitro* de una glicoproteína que comprende una estructura (Man)₅(GlcNAc)₂ obtenida de un basidiomiceto en la estructura híbrida GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂ usando GnT-I (recombinante). Los detalles en cuanto a esta conversión *in vitro* pueden encontrarse en el documento de EE.UU. N°. 5.834.251 y las referencias de éste. Sin embargo, es, por supuesto, preferido usar una célula huésped de basidiomiceto que comprenda actividad de GnT-I, preferiblemente un basidiomiceto que exprese GnT-I humano.

15 También se proporciona un constructo de ácido nucleico que codifica un promotor *gpd*, con o sin el intrón 1, que comprende además un gen de GnT-I y, opcionalmente, una secuencia de terminación. La invención proporciona además una célula huésped de basidiomiceto provista de un constructo de ácido nucleico de la invención.

20 Sección experimental

Materiales y métodos

- cDNA preparado a partir del ARN total de células Jurkat fue usado para RT-PCR usando los cebadores HsGnTI-up (GTGACTCTAGAGGTCTCACATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGG) y HsGnTI-dw (GTGACGGATCCAGGTGCTAATTCAGCTAGGATCATAG). El fragmento se purificó con gel agarosa, se digirió con *Xba*I y *Bam*HI y se clonó en un plásmido pUC19-derivado. Un fragmento Eco31I/*Bam*HI que comprende el gen completo se clonó posteriormente corriente abajo de un fragmento del promotor de GPD de *S. commune* en un vector que también contenía el marcador de resistencia a la fleomicina adecuado para la selección de transformantes en *S. commune* (Schuren y Wessels, 1994).

Cepas, condiciones de crecimiento y medios

Se usaron los monocariones de *S. commune* 4-39 (MATA41MATB41, CBS 341.81) y 4-40 (MATA43MAIB43, CBS 341.81). Para el aislamiento de los carpóforos, los transformantes de la cepa 4-40 se cruzaron con la cepa tipo silvestre compatible 4-39 y se cultivaron durante una semana a 24°C en la luz.

Se cultivó *S. commune* en medio mínimo (MM) solidificado o no solidificado con agar al 1,5% (Dons *et al.*, 1979). Para la transformación, la cepa 4-40 se cultivó a partir de un homogenado micelar durante 2 días a 24°C y 225 revoluciones por minuto en 100 ml de MM en matraces de 250 ml. Para el aislamiento del ARN, las colonias se cultivaron durante 2 a 3 días sobre la superficie de una membrana de policarbonato perforada (PC) (diámetro 76 mm, 0,1 µm de poro; Poretics) que se colocó sobre el MM solidificado.

Transformación de S. commune

Se transformó la cepa de *S. commune* 4-40 como se describe antes (Schuren y Wessels, 1994), salvo que se formó una protoplasto en MgSO₄ 1 M que contenía 1 mg.mL⁻¹ de enzimas de lisado de *Trichoderma harzianum* (Sigma). Entonces, se añadieron de 5 a 10 µg de ADN a 3 x 10⁷ protoplastos en 100 µL de sorbitol 1 M. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM que contenían 25 µg.mL⁻¹ de fleomicina (Cayla, Toulouse, Francia). Para reducir la exposición a la fleomicina mutágena, las supuestas colonias resistentes se transfirieron al MM sin agente. Para este fin, se aislaron las hifas individuales usando un microscopio invertido para visualizarlas. Se comprobó la resistencia a la fleomicina de las colonias formadas a partir de estas hifas individuales.

Análisis de transferencia Northern

El ARN total se aisló del micelio que había sido triturado en nitrógeno líquido usando el reactivo Trizol (Gibco-BRL) siguiendo el protocolo de los fabricantes. Se separó el ARN en un gel de formaldehído al 1% y se corrió en una membrana Hybond-N⁺ (Amersham) según Sambrook *et al.* (1989). El ARN se hibridó con una sonda de ADN marcada con ³²P a 65°C como se describe por Church y Gilbert (1984).

Purificación de N-glicano

Se cosecharon los carpóforos maduros y en desarrollo, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron usando un mortero de mano. La extracción se hizo mediante agitación fuerte de 100-250 mg del material pulverizado con 750 µL de tampón HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5, metabisulfito de sodio 20 mM, EDTA 5 mM, SDS al 0,1%, polivinilpirrolidona insoluble al 1,7% (PVPP) a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf de 2 mL. Los restos se quitaron del extracto mediante dos centrifugaciones de 5 minutos sucesivas a 20.000 g y 5°C. La proteína total se granuló mediante una centrifugación de 5 minutos después de la adición de TCA y precipitación en

ES 2 338 360 T3

hielo durante al menos 30 minutos o durante la noche entera a 4°C. Los peletes se lavaron dos veces con acetona al 90% y se dejaron secar al aire. Los peletes se suspendieron de nuevo en 0,5 mL de HCl 10 mM y 1,5 mg.mL⁻¹ de pepsina usando un tratamiento de microtriturado Eppendorf seguido de tratamiento de 15-30 minutos en un baño de sonicación. El tratamiento con pepsina fue continuado durante 24 h a 37°C, y luego se terminó por neutralización a pH 7 con NH₄OH 1 N seguido de 10 minutos de calentamiento a 95°C. La solución del (glico) péptido resultante se liofilizó después de retirar el material insoluble vía centrifugación y el residuo se disolvió en 0,5 mL de tampón de fosfato de sodio, pH 7,5, Nonidet P-40 al 1% según la enzima usada en la siguiente etapa. Los N-glicanos se liberaron de la estructura del péptido mediante un tratamiento de 24 h a 37°C con 4,5 mU de PNGasa F (Biolabs de Nueva Inglaterra). Los N-glicanos se separaron por purificación del granel de péptidos pasándolos primero por un Dowex 50 AG 50W-X2 de 2 mL (Bio-Rad) y luego pasándolos sobre una columna C18 de 500 mg (Varian). En la etapa de purificación final, el eluato de la columna C18 se aplicó a una columna Carbograph Ultra-Clean de 150 mg de 8 mL (Alltech) a partir de la cual los N-glicanos unidos eluyeron en acetonitrilo al 25%. Los oligosacáridos se concentraron por liofilización. Para tratamientos de galactosidasa, se incubaron N-glicanos con 1,5 mU de β1,4-galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* (Calbiochem) en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 y se separó por purificación a partir de las sales y enzima usando una columna Ultra-Clean Carbograph de 150 mg y se concentró por liofilización. Los productos de digestión se analizaron por MALDI-TOF.

Análisis de N-glicano

Se disolvieron los N-glicanos purificados en 10 μL de NaAc 5 mM y 1 μL de esta solución se combinó con un volumen igual de ácido 2,5-dihidroxibenzoico al 10% en acetonitrilo al 50%. La mitad de esta disolución se tiñó en una placa de muestra de acero inoxidable y se secó bajo una corriente de aire a temperatura ambiente. Los espectros MALDI-TOF de ión positivo de los aductos (M+Na)⁺ se registraron en un MALDI-TOF Bruker Ultraflex ajustado con extracción retrasada, y un láser de nitrógeno (337 nm). Los espectros se generaron a partir de la suma de 200-300 pulsos del láser. Una serie de maltodextrina fue usada como estándar externo del peso molecular.

Resultados

El clon de cDNA que codifica la GnT-I humana se aisló a partir del cDNA hecho de células Jurkat. El marco de lectura abierto completo se clonó en un vector de expresión adecuado para la transformación de basidiomicetos como *Schizophyllum commune*. Este vector comprendía una secuencia del promotor derivada de una *S. commune* (secuencia véase el apéndice) y un terminador derivado de *S. commune* con un intrón artificialmente añadido bordeando el sitio de introducción del gen de GnT-I y el casete génico que presenta el marcador de resistencia a la fleomicina (Schuren y Wessels, 1994).

El constructo se usó para transformar protoplastos del monocarión 4-40 de *S. commune* como se ha descrito (Schuren y Wessels, 1994) y los transformantes se seleccionaron en medio MM que contenía 25 μg.mL⁻¹ de fleomicina. Después de una semana, los taponos micelares se tomaron y se transfirieron al medio MM recién preparado sin fleomicina. El micelio se cosechó y el análisis de transferencia Northern del ARN total aislado a partir de 8 transformantes reveló la expresión variable del transgen de GnT-I y la expresión más alta se encontró en los transformantes 2 y 12. Los transformantes se cruzaron con el monocarión compatible 4-39 y se cultivaron hasta la cosecha de los carpóforos en desarrollo y maduros. El material dicariótico cosechado se extrajo para purificar la proteína total y luego se liberaron los N-glicanos de la estructura de la proteína mediante PNGasa F y se purificaron antes del análisis MALDI-TOF.

El análisis MALDI-TOF del tipo silvestre y de los transformantes 2, 3, 4, 12 y 13 reveló varios N-glicanos muy abundantes en todas las muestras que representaban los oligosacáridos con alto contenido de manosa (Man)₉(GlcNAc)₂ hasta (Man)₅(GlcNAc)₂ (Tabla 1).

TABLA 1

Valores m/z de iones (M + Na)⁺ de N-glicanos típicos encontrados en *S. commune* tipo silvestre

	<u>N-glicanos</u>	<u>m/z</u>
	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	1257,4
	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	1419,5
	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	1581,5
	(Mali) ₈ (GlcNAc) ₂	1743,6
	(Mali) ₉ (GlcNAc) ₂	1905,6

ES 2 338 360 T3

TABLA 2

Valores m/z de iones (M + Na)⁺ de N-glicanos típicos encontrados en *S. commune* transgénicos

5	<u>N-glicanos</u>	<u>m/z</u>
	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	1257,4
10	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	1419,5
	GlcNAc(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	1460,4
	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	1581,5
15	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂	1743,6
	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	1905,6

20 Dos transformantes - 2 y 12 - mostraron la presencia de una cantidad pequeña, pero significativa, de un producto con un m/z de 1460,5 que es GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂ (Figuras 1 y 2). Estos datos demuestran que GnT-I se expresa y se activa en *S. commune* y que una fracción detectable del aceptador de GnT-I endógeno (Man)₅(GlcNAc)₂(Man5) ha sido convertida a GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂(GnM5). Ya que sólo los dos transformantes con el nivel más alto de mRNA de GnT-I contenían el nuevo híbrido de N-glicano (Figura 3), es concebible que el posterior aumento del nivel de expresión conducirá a mayores niveles de GnM5.

Referencias

- 30 **Bakker H, Lommen A, Jordi W, Stiekema W, Bosch D (1999)** "An Arabidopsis thaliana cDNA complements the N-acetylglucosaminyltransferase I deficiency of CHO Lec1 cells". *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 829-32.
- 35 **Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, Potgieter TI, Nett JH, Hamilton SR, Stadheim TA, Miele RG, Bobrowicz B, Mitchell T, Rausch S, Renfer E, Wildt S (2004)** "Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose". *Glycobiology* **14**: 757-66.
- 40 **Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU (2003)**. "Use of combinatorial genetic libraries to humanize N- linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 **100**: 5022-7.
- Church GM, Gilbert W (1984)** "Genomic sequencing". *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:1991-5.
- 45 **Dons JJM, De Vries OMH, Wessels JGH (1979)** "Characterisation of the genome of the basidiomycete *Schizophyllum commune*". *Biochim Biophys Acta* **563**:100-112.
- Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischniewski H, Wildt S, Gerngross TU (2003)**. "Production of complex human glycoproteins in yeast". *Science* **301**: 1244-6.
- 50 **Kalsner I, Hintz W, Reid LS, Schachter H (1995)** "Insertion into *Aspergillus nidulans* of functional UDP-GlcNAc: alpha 3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyl-transferase I, the enzyme catalysing the first committed step from oligomannose to hybrid and complex N-glycans". *Glycoconj J*. **12**: 360-70
- 55 **Lugones LG, Scholtmeijer K, Klootwijk R, Wessels JG (1999)**. "Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*". *Mol Microbiol* **32**: 681-9
- 60 **Ma B, Mayfield MB, Gold MH (2001)** "The green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete Chrysosporium*". *Appl Environ Microbiol* **67**: 948-55.
- Maras M, De Bruyn A, Schraml J, Herdewijn P, Claeysens M, Fiers W, Contreras R (1997)**. "Structural characterization of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolase I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUTC 30". *Eur J Biochem* **245**: 617-25.
- 65 **Maras M, De Bruyn A, Verweken W, Uusitalo J, Penttila M, Busson R, Herdewijn P, Contreras R (1999)**. "In vivo synthesis of complex N-glycans by expression of human N-acetylglucosaminyltransferase I in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*". *FEBS Lett* **452**: 365-70.

ES 2 338 360 T3

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). “Molecular cloning: a laboratory manual”, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*. N.Y.

5 **Scholtmeijer K, Wosten HA, Springer J, Wessels JG (2001)**. “Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*”. *Appl Environ Microbiol* **67**: 481-3.

10 **Schuren FH, Wessels JG (1994)**. “Highly-efficient transformation of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* to phleomycin resistance”. *Curr Genet* **26**:179-83.

15 **Schuren FH, Wessels JG (1998)**. “Expression of heterologous genes in *Schizophyllum commune* is often hampered by the formation of truncated transcripts”. *Curr Genet* **33**: 151-6.

20 **Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R (2004)**. “*In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*”. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2639-46.

25 **Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, Altmann F (2001)**. “Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha,3-linked fucose and xylose substitutions”. *Glycobiology*: 261-74.

30 **Yoshida S, Suzuki M, Yamano S, Takeuchi M, Ikenaga H, Kioka N, Sakai H, Komano T (1999)**. “Expression and characterization of rat UDP-N- acetylglucosamine: alpha-3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Glycobiology* **9**: 53-8.

35

40

45

50

55

60

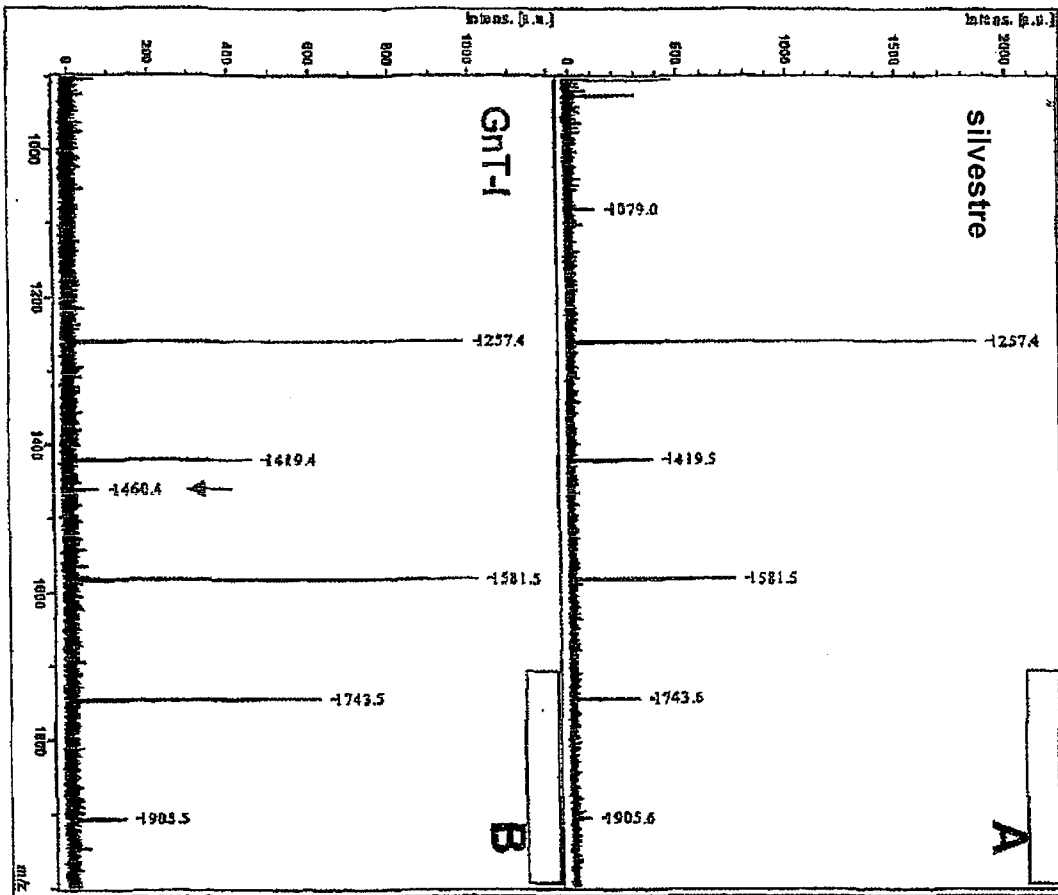
65

ES 2 338 360 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una glicoproteína en una célula huésped recombinante, que comprende permitir la expresión de dicha glicoproteína en un huésped de basidiomiceto provisto con actividad de N-acetilglucosamina: α -3-D-manosida β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT-I; CE 2.4.1.101).
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho basidiomiceto se selecciona a partir del grupo que consiste en *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Agrocybe aegerita*, *Coprinus cinereus*, *Lentinus edodes*, *Lepista nuda*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Hypsizygos tessulatus*, *Pholiota nameko*, *Boletus edulis*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus*, *Volvariella volvacea*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis*, *Auricularia auricular*, *Lyophyllum descastes*, *Naematoloma sublaterium*, *Stropharia rugoso-annulata* y *Cordyceps sinense*.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que dicho basidiomiceto no tiene esporas.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho basidiomiceto se proporciona con un gen mamífero que codifica la actividad de GnT-I.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, en el que el gen mamífero es un gen humano.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha glicoproteína es una proteína heteróloga.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en el que dicha glicoproteína es una hormona, un anticuerpo, una citoquina o una enzima.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la modificación adicional de dicha glicoproteína con al menos una transferasa y/o una manosidasa.
- 30 9. El método según la reivindicación 8, en el que dicha al menos una transferasa y/o manosidasa se selecciona entre el grupo que consiste en GlcNAc-transferasa II, III, IV, V, VI, α -manosidasa II, α -manosidasa III, galactosiltransferasa, sialiltransferasa.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos una de las etapas de modificación adicionales se realiza intracelularmente en dicho basidiomiceto.
11. El método según la reivindicación 9 ó 10, en el que al menos una de las etapas de modificación adicionales se realiza *in vitro*.
- 40 12. El método para expresar una enzima GnT-1 heteróloga en un basidiomiceto, que comprende proporcionar dicho basidiomiceto con un constructo de ácido nucleico que codifica dicha enzima y permite la expresión de dichos constructos en dicho basidiomiceto.
- 45 13. El constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia del promotor que permite la expresión en un basidiomiceto, preferiblemente un promotor de *gpd*, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la actividad de GnT-1, y que comprende opcionalmente además una secuencia de terminación de la transcripción.
- 50 14. El ácido nucleico según la reivindicación 13, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la actividad de GnT-1 es el gen humano de GnT-1.
15. Una célula huésped de basidiomiceto recombinante que comprende la actividad de GnT-I.
- 55 16. Una célula huésped de basidiomiceto recombinante según la reivindicación 15 que expresa a la GnT-1 humana.
17. La célula huésped de basidiomiceto que comprende un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14.
- 60 18. El uso de un basidiomiceto que comprende actividad de GnT-I como un huésped para la producción de una proteína mamífera N-glicosilada heteróloga.
19. El uso según la reivindicación 18, en el que dicho basidiomiceto expresa a la GnT-1 humana.
- 65 20. El uso según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicho basidiomiceto comprende una célula huésped de basidiomiceto según la reivindicación 15 ó 16.

Figura 1



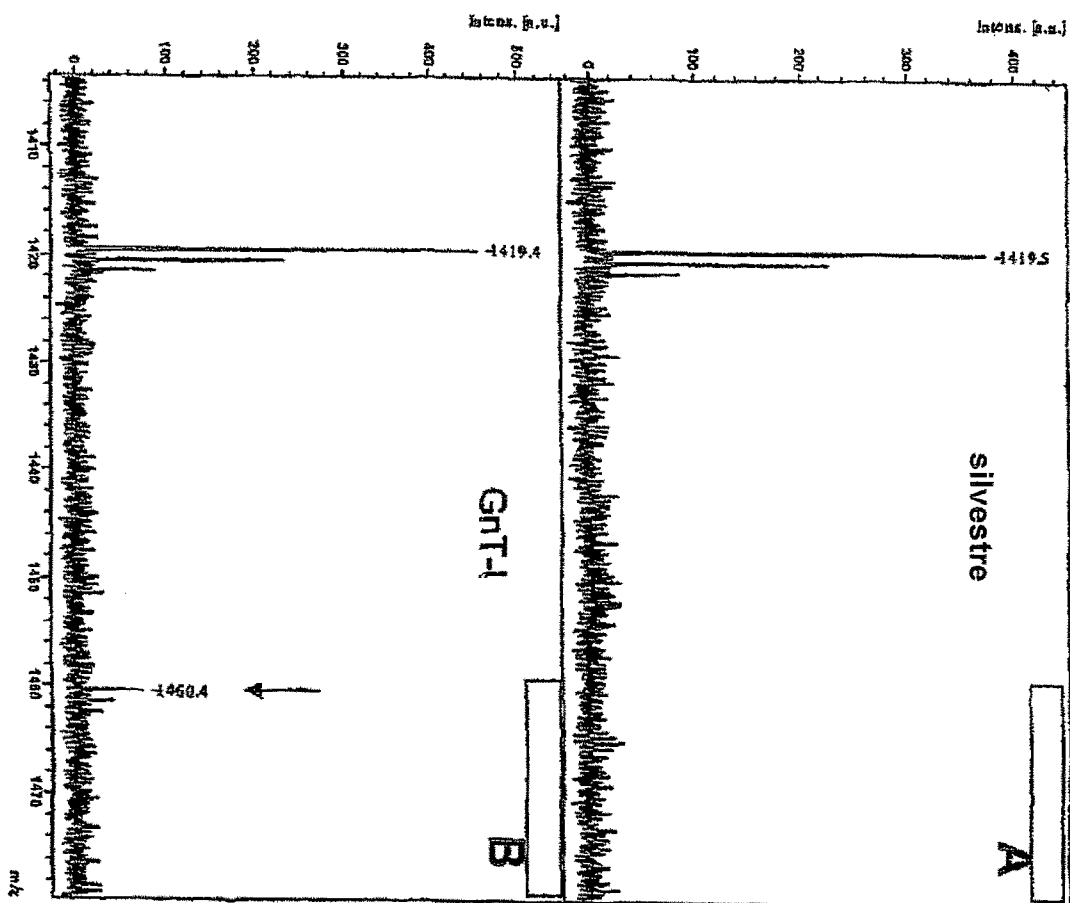
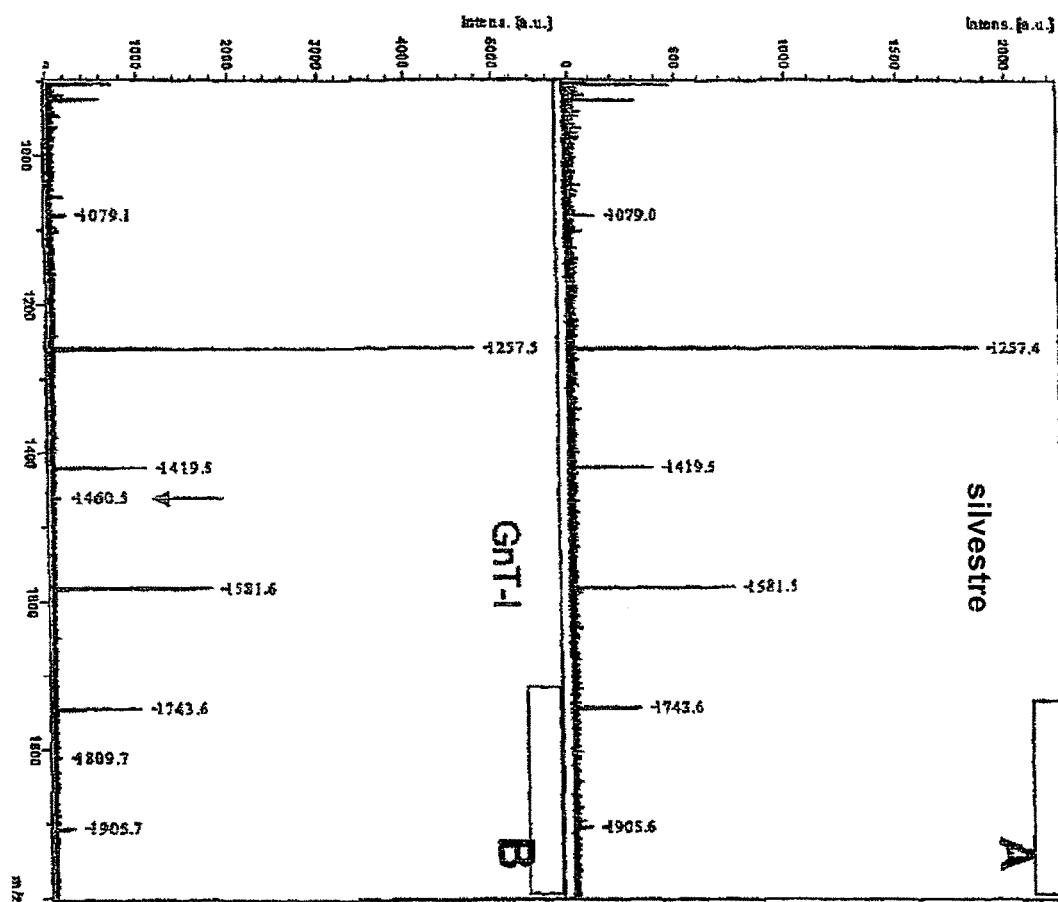
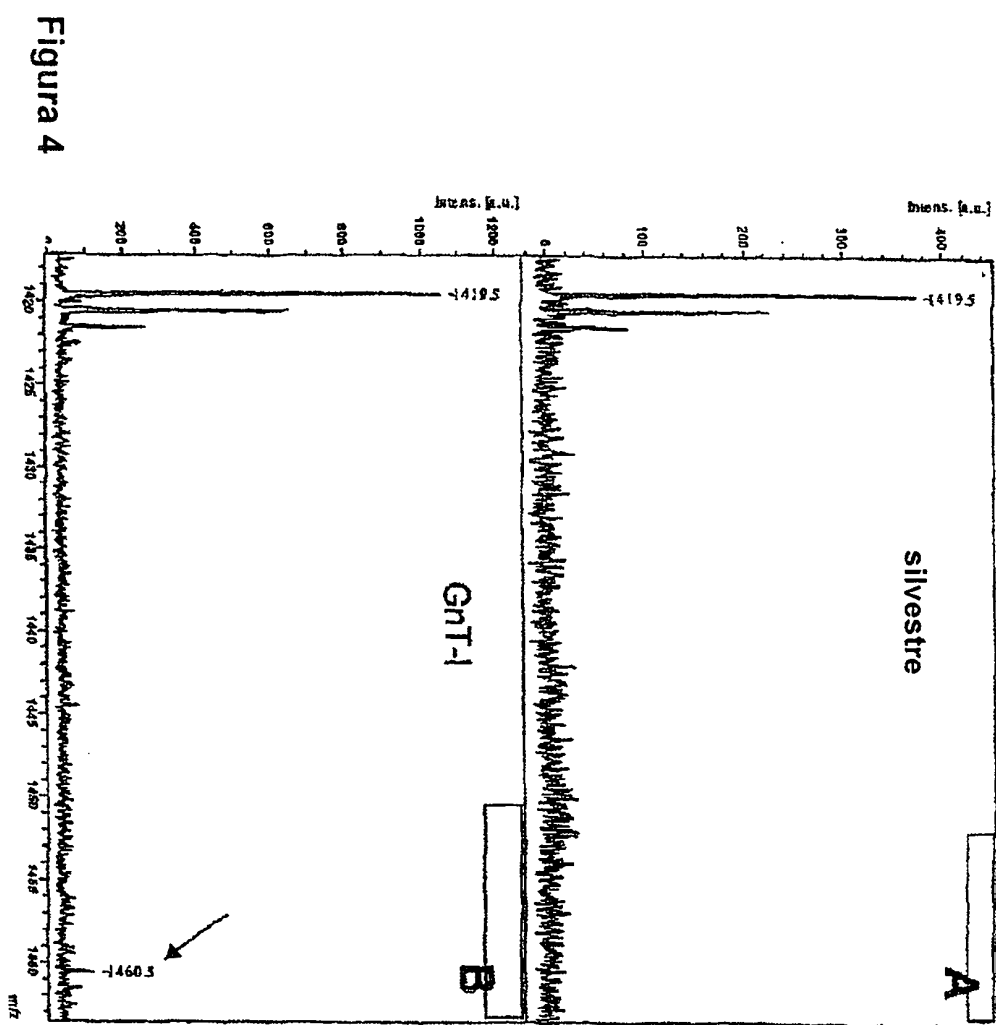


Figura 2

Figura 3





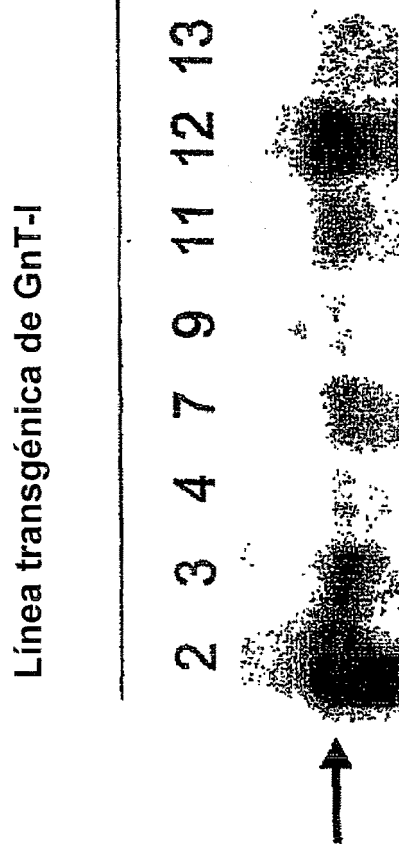


Figura 5

Fragmento de *SalI/EcoRI* que comprende el promotor de *gpd* de *Schizophyllum commune*, el cDNA que codifica la GnT-I humana y el terminador:

GTGACGCGCACCCAGCCTATCCGCGCGGTGGGACCCAAATAAGCGCGCCCGCCGCGCCCGTCCGGCGA
 GCGGTGTGTATCTAGAAAGACTGCGAGCGCACTCGGAAAGTTGGTTAGAAAGGGGAACACCATCGCGGACG
 GCCAGTGTCTTGGGGTCCAGCTGACGTGATTTGTTCAATCTGACGCTGTGGCATGTAAAGAACGTCTCGGG
 ATCCGAGGGTGGCGGAGAGCCTCTTCGGGTGAGATAGTAACGTACTCCGAAGCCCGGAGGGGTTAGGATGAG
 AGGTAGACAGGGTCCGAGCCAGGTGCGAAGGACTCCGAAGGACTGTTCTCGAGCGCACACTGCAATTGCGCG
 CATGGATAGAAAGCTGTCGCCCTCGAGGGGACTCGAACAGGGCTGTGTGGGCCCGACCGGACTGGCTGGG
 CATTTGCAGATGCGCGCAGTCCAGGCCCGCCGATGTGTTTCATCCGTTTGTCAAGTATCGATCGGATCTTCGGG
 CGTGGTATAAAAGCGCGCGCCGCTCCCTCTTCCAGCACTCCATCCAGAGCACTTCCCTCTCCCATC
 GCATCCCATCACATAATGCCATCACCACTGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGCTTGTGCTGTGGGGCGCTATCCTCTT
 TGTGGCCTGGAATGBCCTGTGCTCTCTTCTGACGGCGCCAGCACCTGCGAGGCCACCTCAGTCAAGCGCTCT
 OGATGGGACCCCGCCAGCTCACCGGGAAAGTATTCGCCCTGGCCCAAGACCCGAGGTGGAGCTGGAGCGGCAG
 CGTGGCTGCTGCAGCAGATCGGGATGCCCTGTGAGCCAGCGGGGAGGTGCCACCCGCGCTCCGCGGCGG
 AGCCGCTGTGCTGTGACCCCGCGCGGCTGATCCCATCCTGTGTCATCGCTGTGACCGCAGCACTGTTTCGG
 CGCTGCCGGAAGCTGTGCAATATCGCCCTCGCTGAGCTTCCCATCATCCTGTAGCCAGGACTGCGGGAC
 GAGGAGCGCCAGGCCATCGCCTCTAGGCAAGCGGTACGACATCGGCAAGCCCGACCTGAGCAGCATTC
 GGTCCGCGGACCCAGTCCAGGCTACTACAAGATCGCCCGCACTACCGCTGGCCCTGGCCAGGCTTCTCGAGTACTTT
 TCCGCAAGTTCCCTCCCGCGCTGTGTGTGAGGATGACTGAGGTGAGGCGCGGACTTCTCGAGTACTTTT
 GGGCCAGCTATCCGCTGTAAGCGCGGACCCCTCCCTGTGTGTGTGCTCGCCCTGGAATGACAACGGGAAGGACG
 ATGTTGAGCGCAGCGCTGAGCTGCTACCGACCGACTTTTCCCTGCGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
 GCTCGGCTGAGCTGAGCCCAAGTGGCCAAAGCCTTCTGGACGACTGATCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GACCAGCAGCTCAAGTTTATCAAGCTGAACAGCAGTGTGTGCACCTCACCCAGCTGAGCTGTCTTACCTGACGCGGG
 AGGCTATGACCGAGATTTCTCGCCCGCTACGGTGTCTCCCGAGCTCCAGGTGGAGAAAGTGAAGGACCAATGACC
 GGAAGGCTGGGGAGTCCGGGTCCAGTATACGGCAGGACAGCTCAAGGCTTCCGCAAGGCTGGGCTGGGCTG
 ATGATGACCTAAGTCCGGGTCCGAGAGCTGCTACCGGGTATGTCACCTCCAGCTGGATCCGCAAGTGAACGCGCC
 CACCTGGCGCCCGCAGCTGGAGGGCTATGATCTAGCTGGAATGACACTGGATCCGCAAGTGAACGCGCC
 TATCGTGGGATATTCGGCGACGGAGCCTGGGCAATCTGAGCCCTGTTACTGCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTC
 GATGTCATAGGGTCCGACAAAGTGCCTTCTGCTACATCCAGGCTTCCAGGCTTCCCTGATATGAACATTG
 TTGTTGTTTCTCTATCCGCTCAGTACGCGCCAGCGGATGATGTTGACTTCCGCGCGGAGTCCAGTCCAGT
 TGACGACATGGCGAACCTAAGTAAAGGCTGAGTCTGAGTAAAGCACTCCACTTACGGCGAGGATCCAGTCCAGT
 CATGAATGAAGCCTCAGTCCCGAAGTAAAGGGGTACAAAAGGAGGGTGAAGGTGACGTTTTCTTACCATCCTTCCA
 CCTCCAGACCCACCATGCGGGAAATTC

Figura 6