

LEVADURA DE INGENIERÍA GLICOLÓGICA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere al campo de los medios y métodos de producción de glicoproteínas. Más específicamente, la presente invención proporciona una nueva cepa de levadura con un gen Och1 mutante que resulta en propiedades de N-glicosilación modificadas de dicha cepa. Más concretamente, dicho gen mutante Och1 comprende una secuencia que codifica para una proteína OCH1 mutante en la que se elimina un aminoácido cerca del sitio catalítico, correspondiente a la posición 151 de la

10 proteína OCH1 de la cepa metilotrofa de tipo salvaje *Pichia pastoris*. Más específicamente, el uso de dicha cepa de levadura mutante para la expresión recombinante de glicoproteínas da como resultado estructuras de N-glicanos más homogéneas similares a las de los mamíferos en dichas glicoproteínas producidas heterológamente.

15 INTRODUCCIÓN

La fabricación de proteínas terapéuticas o productos biológicos, en general, requiere un huésped de producción capaz de proporcionar una estructura proteica similar a la forma de proteína humana, mientras que las modificaciones postraduccionales, como los cambios en la N-glicosilación con respecto a la proteína humana de tipo salvaje, a menudo se asocian con efectos adversos (por ejemplo, Dicker y

20 Strasser, Expert Opin Biol Ther, 2015. 15(10): p. 1501-16). Además de los productos biofarmacéuticos, la producción de una serie de enzimas, especialmente para el sector de alimentos y piensos, también puede beneficiarse de la producción a gran escala de cepas huésped alternativas modificadas con glicol.

La producción de glicoproteínas en un sistema (convencional) de mamíferos puede permitir un

25 producto robusto y estable similar al ser humano, aunque las cepas de levadura, como la *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*) se están convirtiendo en un huésped más preferido para la producción de productos biofarmacéuticos porque los huéspedes de levadura proporcionan modificaciones postraduccionales y secreción de proteínas, y como microbio, muestran un crecimiento más rápido a una alta densidad celular en medios químicamente definidos. Desafortunadamente, la vía de

30 glicosilación de la levadura produce glicoproteínas modificadas con glicanos oligosacáridos con alto contenido de manosa específicos de la levadura en lugar de glicanos complejos de mamíferos, que

pueden ser inmunogénicos y conducir a una eliminación rápida. Se han realizado diferentes esfuerzos para modificar la maquinaria de N-glicosilación de la levadura para producir proteínas que transportan N-glicanos similares a los humanos.

Una de las principales estrategias es la inactivación del gen Och1, que codifica la α -1,6-manosiltransferasa de Golgi, encargada de transferir la primera manosa α -1,6-ligada necesaria para una mayor hipermanosilación en la levadura. La inactivación del gen OCH1 da como resultado glicoproteínas que portan la mayoría de los glicanos Man8GlcNAc2, pero también suele dar lugar a células con un crecimiento celular reducido, una síntesis de la pared celular deteriorada y una mayor sensibilidad a la temperatura. Para superar el efecto adverso sobre la viabilidad de la levadura, diferentes esfuerzos de ingeniería han dado como resultado previamente una serie de alelos Och1 modificados (Figura 1). En la literatura se han descrito varias cepas modificadas genéticamente capaces de producir glicosilación de tipo humano, aunque todavía hay margen de mejora, ya que todavía se detectan N- y/o O-glicanos de tipo levadura, aunque sean poco abundantes (Jacobs, et al. Nat Protoc. 4 (2009) 58–70; Nett, et al. Yeast. 28 (2011) 237–252). Por lo tanto, es necesario mejorar el patrón de N-glicosilación de la levadura, para obtener una glicoproteína más adecuada para fines terapéuticos, preservando al mismo tiempo un fácil manejo y escalado.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención revela una nueva cepa de levadura deficiente en la actividad catalítica de OCH1, en la que el alelo Och1 tiene una delección de nucleótidos de 3 pares de bases, lo que da como resultado una proteína mutante OCH1 con una delección del ácido glutámico en la posición 151 de la OCH1 de tipo salvaje como se presenta en la SEQ ID NO:1, denominada OCH1_E151del en el presente documento. Dicha mutación de delección se encuentra cerca del sitio activo, por lo que la actividad catalítica se ve afectada de tal manera que la hipermanosilación de los N-glicanos Man8GlcNAc2 se puede prevenir utilizando esta cepa para la producción de glicoproteínas. Si bien a menudo se observa que la inactivación de OCH1 tiene efectos adversos sobre el crecimiento y la viabilidad de la levadura, la cepa de levadura mutante descrita en el presente documento solo mostró una gravedad del retraso del crecimiento y la sensibilidad a la temperatura que de alguna manera se atenuó pero fue muy cercana al crecimiento de la levadura de tipo salvaje, proporcionando así una alternativa válida como huésped para la fabricación de glicoproteínas con estructuras de N-glicano similares a las de los mamíferos.

El primer aspecto de la invención se refiere a una cepa de levadura, que comprende un gen Och1 mutante, con una secuencia que codifica para una proteína mutante OCH1 α -1,6-manosiltransferasa

que carece del aminoácido en la posición 151 del tipo salvaje OCH1 de SEQ ID NO:1, que en este caso es una delección de un ácido glutámico, o con una secuencia que codifica para una proteína mutante OCH1 α -1,6-manosiltransferasa que carece del aminoácido correspondiente de un homólogo OCH1 de tipo salvaje de SEQ ID NO:1, en la que dicha cepa es deficiente en la actividad de la α -1,6-manosiltransferasa OCH1 y/o produce N-glicanos sustancialmente homogéneos. En una realización alternativa, dicha cepa de levadura comprende una mutación en el gen Och1 de tipo salvaje, con una secuencia que codifica para una proteína mutante OCH1 α -1,6-manosiltransferasa que carece del aminoácido en la posición 151 del tipo salvaje OCH1 de SEQ ID NO:1, o del aminoácido correspondiente de un homólogo OCH1 de tipo salvaje de SEQ ID NO:1, en el que dicha proteína mutante OCH1 es catalíticamente inactiva y/o produce N-glicanos sustancialmente homogéneos. En una realización adicional, dicha cepa de levadura comprende un gen Och1 mutante cuya secuencia codifica para SEQ ID NO:2, o para una proteína OCH1 homóloga con al menos un 90 % de identidad de la misma, que contiene la mutación de delección correspondiente en la posición 151 de SEQ ID NO:1, o de un homólogo OCH1 de tipo salvaje de la misma.

En una realización específica, dicha cepa de levadura comprende dicho gen Och1 mutante, en el que dicho gen Och1 mutante está presente en un cromosoma del genoma de la levadura. Más específicamente, dicho gen Och1 mutante puede reemplazar al gen o alelo Och1 de tipo salvaje de dicha cepa de levadura en su locus Och1 de tipo silvestre en el genoma de dicha cepa de levadura.

En una realización alternativa, dicha cepa de levadura comprende un gen Och1 mutante o una secuencia codificante que se expresa a partir de un vector o plásmido obtenido mediante la transformación de dicha cepa de levadura, lo que proporciona una cepa de levadura recombinante, y en la que el tipo salvaje o el alelo endógeno Och1 en el cromosoma del genoma de la levadura se interrumpe, lo que da como resultado una cepa de levadura mutante que es deficiente en el tipo salvaje OCH1 α -1, Actividad de la 6-manosiltransferasa.

En una realización adicional, dicha cepa de levadura como se describe en este documento produce estructuras homogéneas de N-glicanos en las glicoproteínas producidas recombinantemente, y/o más específicamente, en donde la forma de N-glicano Man8GlcNAc2 presenta la mayoría de las N-glicosilaciones.

En realizaciones específicas adicionales, dicha cepa de levadura mutante como se describe en este documento es una levadura metilotrofa, o más específicamente es una *cepa de S. cerevisiae* o una cepa de *Pichia*, incluso más preferiblemente *Komagataella phaffii*, o *Pichia pastoris*, aún más específicamente, *Pichia pastoris* NRRL Y-14430.

En una realización adicional, dicha levadura, tal como se describe en el presente documento, puede comprender una molécula de ácido nucleico heterólogo o plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica y es capaz de expresar una glicoproteína heteróloga.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a kits para fabricar glicoproteínas con N-glicanos sustancialmente homogéneos, siendo Man₈GlcNac₂ la forma predominante de N-glicano, comprendiendo dichos kits la cepa de levadura como se describe en el presente documento, y opcionalmente otros componentes, tales como medios, plásmidos, requisitos de producción y/o un manual de instrucciones.

Otro aspecto se refiere a un método de fabricación para la producción recombinante de glicoproteínas de las cuales la mayoría no está hipermanosilada en el aparato de Golgi de las células de levadura cuando se cultivan, que comprende las etapas de

- a. transformar un plásmido, vector o molécula de nucleótido capaz de expresar de forma recombinante una glicoproteína codificada por el mismo en células de la cepa de levadura descrita en este documento, y
- b. el crecimiento de las células de levadura transformadas para producir dicha glicoproteína de forma recombinante,
- c. y opcionalmente, aislar dicha glicoproteína del cultivo de levadura, en el que dicha glicoproteína producida comprende predominantemente N-glicanos Man₈GlcNac₂ en el (los) sitio(s) de N-glicosilación.

Finalmente, la invención proporciona realizaciones para el uso de la cepa de levadura mutante Och1 descrita en este documento, para la obtención de glicoproteínas deficientes en N-glicanos hipermanosilados, es decir, que contienen N-glicanos Man₈GlcNac₂ en la mayoría de su(s) sitio(s) N-glicosilado(s).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras descritas son solo esquemáticas y no son limitativas. En las figuras, el tamaño de algunos de los elementos puede ser exagerado y no dibujado a escala con fines ilustrativos.

Figura 1. Resumen de las diferentes estrategias para inactivar el gen OCH1 en levaduras. Arriba, locus OCH1 WT: cola citoplasmática (aminoácido M1-Y21), ancla de membrana (F22-S44) y dominio catalítico (S45-D404). Krainer et al. (Scientific Reports. 3 (2013) srep03279) describieron una inactivación completa del gen OCH1 (OCH1KO_Krainer). En la estrategia GlycoSwitch, la actividad de OCH1 se agota

mediante la inactivación del plásmido pGLycoSwitchM5, que se produce corriente abajo de la alanina 155 y produce inadvertidamente un Och1p catalíticamente activo truncado en el extremo N (OCH1_GSMan5; Contreras et al., EP 1 294 910 B1). La cepa SuperMan5 (Research Corp Inc) está truncada en la secuencia N-terminal necesaria para dirigir el Och1p al aparato de Golgi, mientras expresa un dominio catalítico sustancialmente idéntico al de la proteína OCH1 de tipo salvaje. La OCH1_E151del tiene una única delección de aminoácido (E151), que hace que el Och1p sea catalíticamente inactivo. La OCH1_fullKO tiene una gran delección que comienza 83 pb antes de la secuencia codificante, por lo que no se espera ninguna transcripción del gen OCH1.

Figura 2. Inserción de ARNm de OCH1 en el plásmido pPpT4_pHTXhsCas9 utilizado para la generación de mutantes de OCH1. A la izquierda, confirmación por PCR de la inserción de la guía de ARN de OCH1; y a la derecha, digestión con BglI. La línea 1 contiene el plásmido digerido y la línea 2 el plásmido sin tratamiento.

Figura 3. Confirmación por PCR de las mutaciones de OCH1. A. Amplificación utilizando los cebadores 5 y 6 con un tamaño esperado de amplicón de 715 pb. B. Amplificación utilizando los cebadores 3 y 4 con un tamaño esperado de amplicón de 1150 pb. wt: cepa de *Pichia pastoris* de tipo salvaje NRRL Y-11430; 1: mutante OCH1_1; 2: mutante OCH1_2; 3: mutante OCH1_3; 4: mutante OCH1_4; Δ: mutante ΔOCH1.

Figura 4. Efecto del sorbitol sobre la sensibilidad a la temperatura de mutantes OCH1. Resultados de cultivos de 3 días a 30°C y 37°C en placas YPD (A) y placas YPD con sorbitol (YPDS) (B). Se realizó una dilución seriada de 10 veces a partir de una DO600 de 2,0.

Figura 5. Análisis de las N-glicosilaciones de cepas NRRL Y-11430 de *P. pastoris*. A. Resultados obtenidos con muestras de cultivos de la cepa WT (NRRL Y-11430). B. Resultados obtenidos con las cepas mutantes OCH1_1 y OCH1_2, así como ΔOCH1. Se utilizaron como referencia maltodextrina y N-glicanos de la ARNasa B bovina.

Figura 6. Digestión de glicoproteínas producidas por cepas de *P. pastoris* NRRL Y-11430 con α-1,2-manosidasa y mannosidasa Jack Beam. Resultados de la electroforesis capilar del conjunto de proteínas producidas por la cepa de tipo salvaje (NRRL Y-11430) e imágenes representativas de las cepas mutantes ΔOCH1 y OCH1_1.

Figura 7. Diferencias entre las cepas mutantes WT y OCH1. (A) Las cepas de *Pichia* WT y OCH1_fullKO se cultivaron en cultivos líquidos por separado y luego se mezclaron en una proporción de 1:1 basada en el OD600 antes de la siembra. Las placas se incubaron durante 60 horas a 30°C. La cepa WT NRRL Y11430 tiene colonias más grandes de morfología suave y cremosa. (B) El OCH1_fullKO tiene una morfología arrugada y arenosa y las colonias crecen más lentamente. (C) *Pichia* sobrenadante de

OCH1_E151del y OCH1fullKO que expresa M2eVHH-Fc. El sobrenadante del OCH1fullKO contiene muchas más proteínas de células de *Pichia* en comparación con la cepa OCH1_E151del, lo que indica lisis celular.

Figura 8. Curvas de crecimiento de las dos cepas mutantes OCH1 comparadas con la cepa NRRL Y-

5 **11430 WT.** (A) se realizaron curvas de crecimiento exponencial en medio BMGY en matraces de agitación. Cada cepa se cultivó por triplicado (excepto OCH1_fullKO que se cultivó por duplicado) y el crecimiento se evaluó midiendo OD600nm. Los puntos de datos son la media de tres réplicas de medición. La curva se ajustó utilizando el paquete Grofit R, utilizando un modelo matemático de ajuste de Gompertz. (B) Las tasas de crecimiento se calcularon como la pendiente máxima del ajuste de la spline (μ). Las barras de error representan errores estándar.

Figura 9. Perfil de N-glicosilación de las dos cepas mutantes OCH1. (A) Comparación del perfil de N-glicosilación de (III) las cepas OCH1_fullKO y (IV) OCH1_E15del. (B) Los glicanos del OCH1_fullKO (III) se trataron con (IV) α 1,2 manosidasa y (V) ccMan5 y CIP. Los paneles (I) y (II) son RNasaB y Dextrano respectivamente.

15 **Figura 10. Actividad GALNS de los mutantes NRRL Y-11430 WT y OCH1.** Resultados de cultivos a escala de 2 mL. Los resultados se muestran como media $\pm$ DE, n=3.

Figura 11. Caracterización del perfil de N-glicosilación de hprGALNS producidos en la cepa *P. pastoris* NRRL Y-11430 Δ OCH1. Los N-glicanos, procedentes de la enzima purificada, se analizaron por electroforesis capilar antes y después de la digestión con CcGH92_4 y/o CcGH92_5.

20 **Figura 12. Diferencias entre la NRRL Y-11430 (tipo salvaje) y dos cepas mutantes OCH1.** (A) *Pichia* NRRL Y-11430, OCH1_E151del y OCH1_fullKO cepas en placas. (B) *Pichia* NRRL Y-11430 y OCH1_fullKO cepas se cultivaron en cultivos líquidos por separado y luego se mezclaron en una proporción de 1:1 basada en el OD600 antes de la siembra. Las placas se incubaron durante 60 horas a 30 °C. La cepa NRRL Y11430 tiene colonias más grandes de morfología suave y cremosa. El OCH1_fullKO tiene una morfología arrugada y arenosa y las colonias crecen más lentamente, mientras que el OCH1_E151del es indistinguible del NRRL Y-11430.

Figura 13. Espectros de masas de la M2eVHH-Fc producida por *Pichia* digerida con FabRICATOR y (A) α 1,2 manosidasa o (B) Jack Bean α 1,2/3/6 manosidasa. (A)Pico 2 M2eVHH-bisagra, Pico 1 M2eVHH-bisagra menos glicina, Pico 3 M2eVHH-Fc + 2x manosas, Pico 4 Fc aglicosilados, Pico 5 Fc + Man5GlcNAc2glicanos, Pico 6 Fc + Man5-8GlcNAc2glicanos. **(B)** Pico 2 M2eVHH bisagra, Pico 1 M2eVHH bisagra menos glicina, Pico 4 Fc aglicosilados, Pico 5 Fc + ManGlcNAc2glicanos, Pico 6 Fc +ManGlcNAc2 + 2xO-manosas, Pico 7 Fc + Man3-5GlcNAc2glicanos.

Figura 14. La administración terapéutica de M2eVHH-Fc restringe la replicación del virus de la influenza en ratones. (A) Morbilidad expresada como % de la pérdida de peso corporal. (B) % de supervivencia de los ratones con gripe.

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de proteínas OCH1 de *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En negrita subrayada, se indica el aminoácido en la posición 151 (Glu, E) de *Pichia pastoris* OCH1, así como el aminoácido correspondiente en *S. cerevisiae* OCH1 (Isoleucina, I). OCH1-*S.cerevisiae* (AC: YGL038C, SEQ ID NO: 15) es la secuencia de *S. cerevisiae*, OCH1-*Pichia pastoris* corresponde a SEQ ID NO:1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertas figuras, pero la invención no se limita a ellas, sino solo a las reivindicaciones. Los signos de referencia en las reivindicaciones no se interpretarán como una limitación del alcance. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los aspectos o ventajas pueden lograrse de acuerdo con cualquier realización particular de la invención. Así, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede incorporarse o llevarse a cabo de una manera que logre u optimice una ventaja o grupo de ventajas, tal como se enseña en el presente documento, sin lograr necesariamente otros aspectos o ventajas como se pueden enseñar o sugerir en el presente documento. La invención, tanto en cuanto a la organización como al método de operación, junto con sus características y ventajas, puede entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con las figuras adjuntas. Los aspectos y ventajas de la invención serán evidentes y dilucidados con referencia a la(s) realización(es) descrita(s) a continuación. La referencia a lo largo de esta descripción a "una realización" o "una modalidad" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrito en relación con la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases 'en una realización' o 'en una realización' en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización, sino que pueden.

Definiciones

Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se refiere a un sustantivo singular, por ejemplo, "un" o "una", "el", esto incluye un plural de ese sustantivo a menos que se indique específicamente otra cosa. Cuando se utiliza el término "comprende" en la presente descripción y reivindicaciones, no

excluye otros elementos o etapas. Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en este documento son capaces de operar en secuencias distintas a las descritas o ilustradas en este documento. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar en la comprensión de la invención. A menos que se defina específicamente en este documento, todos los términos utilizados en este documento tienen el mismo significado que tendrían para alguien experto en el arte de la presente invención. Los profesionales se dirigen especialmente a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, Nueva York (2012); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Suplemento 114), John Wiley & Sons, Nueva York (2016), para definiciones y términos del arte. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende alguien con habilidades ordinarias en la materia (por ejemplo, en biología molecular, bioquímica y biología estructural).

"Secuencia de nucleótidos", "secuencia de ADN" o "molécula(s) de ácido nucleico", tal como se utilizan en este documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término se refiere solo a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, este término incluye ADN bicatenario y monocatenario, y ARN. También incluye tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo. La "secuencia codificante" es una secuencia de nucleótidos, que se transcribe en ARNm y/o se traduce en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio de traslación en el extremo 5' y un codón de fin de traslación en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, entre otros, ARN mensajero (ARNm), ADNc, secuencias de nucleótidos recombinantes o ADN genómico, mientras que los intrones también pueden estar presentes en determinadas circunstancias. El término "gen", tal como se utiliza aquí, incluye tanto la región promotora del gen como la secuencia codificante. Se refiere tanto a la secuencia genómica (incluidos los posibles intrones) como al ADNc derivado del mensajero empalmado, unido operativamente a una secuencia promotora. La "región promotora de un gen", tal como se usa aquí, se refiere a una unidad funcional de secuencia de ADN que, cuando se une de manera operativa a una secuencia codificante y posiblemente se coloca en las condiciones inductoras adecuadas, es suficiente para promover la transcripción de dicha secuencia codificante. Un "alelo" es una de dos o más versiones o variantes de un gen, en una ubicación o locus genómico determinado.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. Por lo tanto, estos términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un aminoácido sintético no natural, como un análogo químico de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales. Este término también incluye las modificaciones postraduccionales del polipéptido, como la glicosilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación y la acetilación, entre otras conocidas en la técnica. Sobre la base de la secuencia de aminoácidos y las modificaciones, la masa o el peso atómico o molecular de un polipéptido se expresa en (kilo)dalton ((k)Da). Por "aislado" o "purificado" se entiende el material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, una "proteína aislada", "molécula aislada de ácido nucleico", se refiere a una proteína, o molécula de ácido nucleico, que ha sido purificada a partir de las moléculas que la flanquean en un estado natural, o en su huésped de producción, por ejemplo, otras proteínas de secreción o que residen en ER/Golgi o moléculas de ácido nucleico celularmente presentes, identificadas y divulgadas en este documento, que se han eliminado de las moléculas presentes en la muestra o mezcla. o levadura o entorno celular, como un huésped de producción, que son adyacentes a dicho material, mediante el uso de los detergentes, u otros agentes, y/o medios de purificación como se describe en este documento, y como se conoce en la técnica. Una molécula o composición aislada de proteína o ácido nucleico puede generarse por síntesis química seguida de tratamientos adicionales o puede generarse por producción recombinante o por purificación a partir de una muestra compleja.

Los "homólogos" de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en relación con la proteína no modificada en cuestión y que tienen una actividad biológica y funcional similar, o en el caso de un homólogo mutante, una deficiencia similar en una determinada actividad, como la proteína no modificada de la que se derivan. El término "identidad de aminoácidos", tal como se utiliza en este documento, se refiere a la medida en que las secuencias son idénticas sobre una base de aminoácido por aminoácido durante una ventana de comparación. Por lo tanto, se calcula un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas de manera óptima durante la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácidos idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met, también indicado en un código de una letra en este documento) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia. Un

aminoácido "correspondiente", como se menciona en este documento, está destinado a proporcionar el aminoácido de una proteína homóloga que corresponde a la misma posición (y función) del aminoácido de un tipo salvaje o proteína de referencia según lo determinado por la alineación de una o más secuencias de proteínas utilizando una herramienta de alineación por pares o múltiple, según lo conozca la persona experta. Teóricamente, cuando por ejemplo dos secuencias de proteínas están alineadas, los aminoácidos que son estructural y funcionalmente similares se corresponderán en su posición en la alineación. Una "sustitución", o "mutación", o "variante", tal como se utiliza en el presente documento, resulta de la sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de una proteína parental o de referencia o un fragmento de la misma. De manera similar, un mutante de delección, tal como se usa en este documento, se refiere a la proteína resultante o molécula de ácido nucleico en la que se han eliminado uno o más aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de una secuencia parental o de referencia, o un fragmento de la misma. Se entiende que una proteína, o un fragmento de la misma, puede tener sustituciones conservadoras de aminoácidos que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la actividad de la proteína.

El término "tipo salvaje" se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente natural. Un gen de tipo salvaje es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se diseña arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen. Por el contrario, el término "modificado", "mutante" o "variante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia (por ejemplo, optimizado para codones), modificaciones postraduccionales y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen de tipo natural o el producto génico. Se observa que los mutantes que ocurren naturalmente se pueden aislar; Estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas en comparación con el gen de tipo salvaje o el producto génico.

Descripción detallada

La presente invención se basa en el hallazgo fortuito de un gen Och1 de alfa-1,6-manosiltransferasa con delección de 3 pb que da lugar a una secuencia proteica alterada de la secuencia de *aminoácidos OCH1 NRRL Y-14430 de Pichia pastoris* (SEQ ID NO:1) cerca de su sitio catalítico, específicamente una delección del ácido glutámico en la posición 151, lo que da como resultado la proteína OCH1 mutante correspondiente a SEQ ID NO:2, como se describe en este documento. La presencia de dicho mutante genómico *Och1*, introducido utilizando una estrategia de edición CRISPR/Cas, reveló que proporciona una cepa de levadura que permite la producción recombinante de glicoproteínas con N-glicanos

predominantemente Man₈GlcNac₂ y, por lo tanto, deficiente en la hipermanosilación que normalmente ocurre en la cepa con Och1 de tipo salvaje, con un crecimiento y características fenotípicas cercanas a la cepa de tipo salvaje. Por lo tanto, la presente invención proporciona un novedoso sistema huésped de levadura de ingeniería, más específicamente *Pichia pastoris* NRRL Y-14430 OCH1_E151del como se denomina en este documento, adecuado para la fabricación estable y eficiente de proteínas terapéuticas o biofármacos, como anticuerpos, o por ejemplo fusiones VHH-Fc, como se ejemplifica en este documento, así como enzimas u otras clases de proteínas para las que los huéspedes de producción de levadura mediante ingeniería glicológica pueden ser ventajosos.

La levadura como huésped para la producción de proteínas recombinantes

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas fáciles de cultivar y, por lo tanto, uno de los organismos modelo más importantes para la biología molecular y la genética. El genoma de la levadura de panadería *S. cerevisiae* fue el primer genoma eucariota en ser secuenciado en 1996. Mientras tanto, muchas otras levaduras comenzaron a ser investigadas. La presente invención se refiere específicamente a una cepa de levadura modificada con glicol, en la que la presencia de un gen mutante Och1 afecta a la vía de N-glicosilación. La proteína OCH1 mutante descrita en este documento para *Pichia pastoris* también puede obtenerse en el ámbito de la presente invención en otras especies de levadura, ya que la región cercana al sitio catalítico de la enzima OCH1 está relativamente conservada, como se muestra por ejemplo para *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *Sch. Pombe* OCH1 en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos OCH1 mostradas en la Figura 4 de Barney-Verdier et al. (Microbiology (2004), 150, 2185–2195). *Pichia pastoris* pertenece a las levaduras metilótropas, lo que proporciona otras ventajas. Las levaduras metilótropas (pertenecientes a los géneros *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*) son capaces de metabolizar compuestos monocarbonados como el metanol y el formaldehído (Pawel, et al., Biodegradation 12, pp: 169-177, 2001; Negruta et al., Romanian Biotechnological Letters Vol. 15, No.4, p5369, 2010), y aparecen en la naturaleza en particular en moldes, frutas y otros productos vegetales, exudados de árboles y sus cortezas (Craveri et al. Examen taxonómico y caracterización de una levadura que utiliza metanol, Antonie van Leeuwenhoek 42, pp: 533-540, 1976). Las levaduras metilótropas son organismos negativos para Crabtree que no producen etanol en condiciones anaeróbicas, por lo tanto, pueden crecer hasta densidades celulares extremadamente altas, lo que a menudo se traduce en un alto rendimiento del producto. Además, pueden secretar eficientemente proteínas de alto peso molecular, que en *S. cerevisiae*, serían retenidas en el espacio periplásmico. Las cepas de levadura metilótropa que pueden modificarse con los métodos actuales incluyen, entre otras, levaduras capaces de crecer en metanol, como las levaduras de los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis* y *Pichia*. Una lista de especies que son ejemplares de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony (1982). La bioquímica de

los metilotrofos, 269. *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia anomala*, *Hansenula polymorpha* y *Candida boidinii* son ejemplos de levaduras metilotrofas útiles en la práctica de la presente invención. Las levaduras metilotroficas preferidas son del género *Pichia*. Especialmente preferidas son las cepas de *Pichia pastoris* GS115 (NRRL Y-15851); GS190 (NRRL Y-18014) divulgado en la patente de EE. UU. No. 4,818,700; PPF1 (NRRL Y-18017) divulgado en la patente de EE. UU. n.º 4.812.405; PPY120H y yGC4; así como las cepas derivadas de los mismos.

En particular, *Pichia pastoris*, que recientemente fue reclasificada como *Komagataella phaffii* [1], pero que en lo sucesivo todavía se denomina coloquialmente *Pichia*, es ahora uno de los huéspedes preferidos del sector biotecnológico para la producción de proteínas recombinantes. *Pichia pastoris* despertó el interés de ser utilizada como una fuente barata de proteína unicelular para la alimentación animal, debido a su capacidad de crecer a densidades celulares extremadamente altas (130-150 peso de celda seca/l) utilizando metanol como su única fuente de carbono y energía metabólica [2], y su potencial de convertirse en un organismo excelente para la expresión de proteínas heterólogas [3], también se hizo evidente a partir de desarrollos posteriores, como un sistema comercial de expresión de *Pichia* (Invitrogen Corporation (EE. UU.)), que actualmente se utiliza en todo el mundo [4]. La cepa original de *Pichia* se depositó como una deposición de patente, en dos entradas de la colección de cultivos, NRRL Y-11430 y CBS7435 [5]. La cepa GS115 comúnmente utilizada es una cepa auxotrófica *his4* derivada de CBS7435 por mutagénesis aleatoria con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).

La vía de utilización de metanol (MUT) de *P. pastoris* y otras levaduras metilotrofas ha sido profundamente caracterizada y revisada [6]. La primera parte de la vía MUT tiene lugar en orgánulos especializados llamados peroxisomas que pueden ocupar el 80% del espacio citoplasmático durante la inducción de metanol. El primer paso en la vía MUT es catalizado por la alcohol oxidasa que oxida el metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es desintoxicado por una catalasa (CAT), mientras que el formaldehído puede oxidarse a dióxido de carbono en la vía disimilante o asimilarse a través de la vía de asimilación C1. En la vía disimilante, el formaldehído reacciona con el glutatión (GS), sobre el cual se oxida mediante dos reacciones consecutivas al CO₂, lo que resulta en la regeneración de GSH y la producción de NADH. En la vía de asimilación, las transcetolasas DAS1 y DAS2 condensan formaldehído con xilulosa-5-fosfato para formar dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP), que luego se exportan al citosol donde se metabolizan aún más durante las reacciones del ciclo de gluconeogénesis y pentosa fosfato, produciendo una producción de 1 mol de GAP por cada 3 moles de metanol que ingresan a la vía de asimilación. En general, la vía MUT es reprimida por la glucosa, el glicerol y el etanol e inducida por el metanol. En *P. pastoris* hay dos genes de alcohol oxidasa, *AOX1* y *AOX2*, de los cuales *AOX1* es el principal contribuyente a la MUT. Un knock-out del gen *AOX1* da como resultado una cepa con un

fenotipo de crecimiento lento en el metanol, llamada MutS (utilización lenta del metanol), mientras que un knock-out de *AOX1* y *AOX2* da como resultado una cepa con el fenotipo Mut⁻, que no puede crecer en el metanol [7].

La proteína alcohol oxidasa 1 (AOX1p) puede constituir hasta el 35% de la proteína soluble en condiciones de alimentación con metanol. Su promotor estrictamente regulado (PAOX1) se ha utilizado con éxito como un fuerte promotor inducible para la expresión de proteínas recombinantes y se estableció la primera producción a escala industrial de hidroxinitrilo liasa con un rendimiento extraordinario de 20 g/l [3,8,9].

Producción de glicoproteínas en levaduras

Como las levaduras son eucariotas, pueden realizar modificaciones postraduccionales, incluida la glicosilación. La glicosilación de proteínas puede tener un fuerte impacto en el plegamiento, la estabilidad y la actividad de las proteínas y, por lo tanto, es un atributo crítico para la producción de productos biofarmacéuticos, donde influye en la farmacocinética, la farmacodinámica y las propiedades inmunogénicas del fármaco. En los eucariotas se producen dos tipos principales de glicosilación: la N-glicosilación y la O-glicosilación. La N-glicosilación ocurre en la asparagina en la secuencia de consenso N-X-S/T (donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina), mientras que no hay una secuencia de consenso para la O-glicosilación, que probablemente sea impulsada principalmente por la conformación de proteínas y ocurra en los residuos de Ser/Thr. La vía de N-glicosilación de levadura produce glicoproteínas modificadas con glicanos oligosacáridos con alto contenido de manosa en lugar de glicanos de tipo complejo de mamíferos. Al igual que otros eucariotas, *P. pastoris* realiza una vía de glicosilación compleja que comienza en el retículo endoplásmico con la síntesis de un oligosacárido ligado a lípidos mediante la adición escalonada de monosacáridos activados por nucleótidos en el lado del citosol de la membrana del RE que luego se translocará al lumen del RE, donde se logra la extensión final para obtener un Glc3Man8GlcNAc2 final que finalmente se transferirá a la cadena polipeptídica. Posteriormente, la proteína se transfiere al aparato de Golgi, donde se producen nuevas modificaciones de la cadena de glicanos [14,15]. La maquinaria específica para tales modificaciones explica las diferencias observadas entre los organismos eucariotas [15]. En los eucariotas superiores, el Man8GlcNAc2 se procesa posteriormente a Man5GlcNAc2 por la Mannosidasa I residente de Golgi, y se añade la primera α 1,2 GlcNAc, seguida de la eliminación de 2 manosas por la Mannosidasa II y se decora con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) adicional, galactosas (Gal), ácidos siálicos (Sia) y fucosas. En la levadura, el Man8GlcNAc2 es el sustrato de la α 1,6 manosiltransferasa OCH1, que inicia la elongación de la cadena de manosa enlazada con α 1,6 [18]. La adición de la rama α 1,6 es necesaria para crear el sustrato de las α 1,2 manosiltransferasas de acción descendente. A

diferencia de las células humanas, que sintetizan glicanos complejos mediante la adición de diferentes monosacáridos y ácido siálico, la levadura glicosila sus proteínas con carbohidratos con alto contenido de manosa, y *P. pastoris* en particular, expresa principalmente glucosiltransferasas involucradas en la síntesis de glicanos de tipo oligmanosa [16, 17]. Por lo tanto, al igual que otras levaduras, en *P. pastoris* la actividad de la proteína OCH1, una α -1,6-manosiltransferasa, es importante para la adición de una manosa por enlaces α -1,6 [14-16]. Luego, diferentes manosiltransferasas extenderán la cadena α -1,6, que será sustrato para las α -1,2-manosiltransferasas que residen en medial y trans-Golgi. Sin embargo, a diferencia de otras levaduras como *S. cerevisiae*, se ha informado que *P. pastoris* carece de varias de estas enzimas, por lo que muestra glicanos más cortos sin adición terminal de residuos de α -1,3-manosa [14, 15], lo que hace que esta última sea el huésped preferido para la expresión de proteínas recombinantes. Además, *P. pastoris* no es capaz de transferir residuos de manosa α 1-3 al glicano, lo que representa una ventaja debido a la inmunogenicidad de dicha estructura. Además, la facilidad de manipulación genética con herramientas ya establecidas para el organismo modelo *S. cerevisiae* hizo que *Pichia* se convirtiera en uno de los huéspedes preferidos para la expresión de proteínas recombinantes. A principios de la década de 2000, *Pichia* obtuvo el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) para la producción farmacéutica, después de lo cual la FDA aprobó en 2009 el primer producto biofarmacéutico recombinante producido por *Pichia*, ecallantide (Kalbitor®), un inhibidor plasmático de la calicreína, para el tratamiento del angioedema hereditario y en la prevención de la pérdida de sangre en la cirugía cardiotorácica [10]. Hoy en día, hay más de 70 productos biofarmacéuticos producidos por *Pichia* en el mercado o en etapa avanzada de desarrollo [11].

Junto a los productos biofarmacéuticos, *Pichia* se utiliza para la producción de una serie de enzimas especialmente para el sector de alimentos y piensos, como la fitasa, la lipasa, la mananasa y la xilankasa. [12]. Recientemente, *Pichia* se utilizó para la producción a gran escala de leghemoglobina, la proteína hemo de la soja, un ingrediente esencial de la hamburguesa Impossible sin carne [13].

Ingeniería glicológica OCH1

Para prevenir la hipermanosilación y obtener una glicosilación más homogénea de la proteína recombinante, principalmente con estructura Man8GlcNAc2, el *gen OCH1* puede ser eliminado. Esta ausencia de hipermanosilación es favorable para la caracterización de proteínas y los procesos de purificación posteriores. Desafortunadamente, la *cepa och1-* muestra un fenotipo deteriorado, que incluye un crecimiento lento, una forma anormal de la colonia y sensibilidad a la temperatura, debido a los rearrreglos de los componentes de la pared celular [19,20]. Debido a que este es el primer paso hacia la humanización de los glicanos de levadura y en general se utilizan para obtener glicoproteínas

glicosiladas homogéneas, se han buscado soluciones para rescatar el defecto de crecimiento de la cepa *och1*- (Figura 1). En la estrategia GlycoSwitch, la disrupción del gen *OCH1* se obtiene a través de una estrategia de knockin, que también facilita la generación de la cepa debido a la eficiencia particularmente baja de la recombinación doble homóloga en este locus. La construcción está diseñada para expresar una proteína OCH1 no catalíticamente activa (Met1-Ala155) y una segunda copia sin promotor con codones de parada en el marco aguas arriba del ORF, y al mismo tiempo golpea, en el segundo paso de la humanización de glicanos, el *T. reesei* retenido por RE α -1,2-manosidasa-HDEL, que da como resultado glicoproteínas secretadas decoradas principalmente con Man5GlcNAc2. Sin embargo, cuando se dispuso de la secuenciación del genoma, se descubrió que esta cepa de GlycoSwitchM5 tenía una alteración en el diseño del vector knock-in: la segunda copia del ORF OCH1 era de tal naturaleza que aún se podía formar un producto truncado de N términos. Probablemente debido a la presencia de esta baja cantidad de Och1p truncado, se mitiga la pérdida de vitalidad de la deformación asociada con el knock-out completo de OCH1. Contrariamente a lo observado en la deformación de knock-out completo descrita por Krainer *et al.*, esta cepa de glicoingeniería muestra un tiempo de duplicación similar al de la cepa de tipo salvaje, pero con una densidad celular algo menor en la fase estacionaria [21]. La cepa SuperMan5 disponible comercialmente tiene una delección adicional del dominio citoplasmático N-terminal OCH1 que mejora la estabilidad de la cepa de glicoingeniería [22]. Pekarsky *et al.* realizaron una comparación fisiológica y morfológica de la cepa *och1-Man8GlcNAc2* obtenida con el knock-out completo de la ORF, y la cepa SuperMan5 [23]. Las dos cepas de glicoingeniería mostraron rasgos morfológicos similares, caracterizadas por aglomeración celular, en la que las células en el interior del aglomerado eran menos viables, en comparación con una cepa de tipo salvaje. Sin embargo, el *och1*⁻ mostró una reducción del crecimiento y la productividad tanto en los matraces de agitación como en una fermentación de alta densidad celular en comparación con el SuperMan5. Curiosamente, ambas cepas de glicoingeniería mostraron una mejor conversión del sustrato a biomasa, lo que posiblemente condujo a una mayor productividad para la cepa SuperMan5 en comparación con la cepa de tipo salvaje. La aptitud reducida de la *deformación och1*⁻ no puede atribuirse al comportamiento de aglomeración, sino más bien a algún tipo de estrés, probablemente detección de estrés en la pared celular, que puede diferir en las dos cepas debido a las diferentes estrategias de knock-out adoptadas (knock-in vs. knock-out) [23].

En un primer aspecto de la invención, se describe una cepa de levadura, que comprende un gen mutante de la alfa-1,6-manosiltransferasa Och1, caracterizado porque dicho gen mutante Och1 codifica la proteína mutante OCH1 α -1,6-manosiltransferasa que comprende una delección del aminoácido en la posición 151 del tipo salvaje OCH1 de SEQ ID NO:1, o un gen Och1 codifica el α - Proteína mutante de la 1,6-manosiltransferasa que comprende una delección del aminoácido

correspondiente de un homólogo OCH1 de tipo salvaje de SEQ ID NO:1, tras el alineamiento de las secuencias OCH1 de tipo salvaje de la misma, en la que dicha cepa es deficiente en la actividad de la α -1,6-manosiltransferasa OCH1. Por lo tanto, la cepa de levadura mutante Och1 a la que se hace referencia en el presente documento tiene poca o ninguna actividad catalítica de OCH1 α -1,6-manosiltransferasa, lo que significa que la actividad no es detectable o es inferior al 50 %, o menos del 40 %, o menos del 30 %, o menos del 20 %, o menos del 10 %, o incluso menos del 5 %, o menos del 3 %, o menos del 1 % de la actividad, según lo determinado para la cepa con α Actividad -1,6-manosiltransferasa del tipo salvaje Och1. Por lo tanto, dicha cepa es deficiente en la actividad de la OCH1 α -1,6-manosiltransferasa, donde deficiente en este documento se refiere a que la actividad enzimática no es detectable o es inferior al 50%, o menos del 40% o menos del 30% o menos del 20% o menos del 10% o incluso menos del 5% o menos del 3% o menos del 1% de la actividad determinada para la cepa con α Actividad -1,6-manosiltransferasa del tipo salvaje Och1. Por lo tanto, la producción de una glicoproteína en dicha cepa de levadura da como resultado glicoproteínas con una estructura N-glicanos sustancialmente homogénea, preferiblemente predominantemente con una identidad Man8GlcNAc2. Con sustancialmente homogéneo en este documento refiriéndose a la observación de que la mayoría de las glicoproteínas (heterológamente expresadas) producidas en dicha cepa de levadura como se describe en este documento contienen N-glicanos de dicha estructura Man8GlcNAc2, donde mayoría significa que al menos el 70% o preferiblemente al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95% o más preferiblemente al menos el 97%, o el 99% de dichas glicoproteínas contiene dicha estructura de N-glicanos, según lo determinado en el perfil de glicosilación, cuya metodología es conocida por la persona experta, y como se ejemplifica en este documento.

En una realización específica, la cepa de levadura descrita en este documento comprende una secuencia del gen Och1 mutante, que codifica para la proteína OCH1 mutante de SEQ ID NO:2, que corresponde a la proteína OCH1 de *Pichia pastoris* NRRL Y-14430 según lo definido por SEQ ID NO:1, pero con una delección del ácido glutámico en la posición 151 de SEQ ID NO:1, dando como resultado el ID de SEQ Nº:2. Una realización alternativa, en la que la cepa de levadura puede ser de una identidad diferente a la de *Pichia pastoris*, se refiere a dicha cepa que comprende una secuencia del gen Och1 mutante, que codifica para la proteína OCH1 mutante mutante de la secuencia de una proteína OCH1 mutante homóloga con al menos un 90 % de identidad a SEQ ID NO:2, en la que el residuo de la forma de la proteína OCH1 no mutada o de tipo salvaje de dicha secuencia de proteína OCH1 de dicha cepa de levadura es diferente de *Pichia pastoris* al alinearse con SEQ ID NO:1, se elimina en la posición 151 en dicha proteína OCH1 mutante con al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO:2. Más específicamente, dicha proteína mutante homóloga OCH1 puede tener al menos un 95% de identidad

con SEQ ID NO:2, un 97% de identidad o un 99% de identidad con SEQ ID NO:2. Una realización específica se refiere a una cepa de *S. cerevisiae* que comprende una secuencia del gen Och1 mutante, que codifica para la proteína OCH1 mutante que corresponde a la proteína de SEQ ID NO:15 en la que se elimina la isoleucina(I) en la posición 155, que es el aminoácido correspondiente de Glu151 en SEQ ID NO:1 (véase también la Figura 15).

En otras realizaciones específicas, la cepa de levadura descrita en este documento comprende dicho gen Och1 mutante como parte de un cromosoma, es decir, si el mutante está integrado en el genoma o es un mutante o variante genómica, defectuoso en la actividad de OCH1. Más preferiblemente, el gen Och1 mutante aquí puede reemplazar al gen Och1 endógeno o de tipo salvaje en el locus Och1 de dicha cepa de levadura.

Alternativamente, también se incorpora aquí que la cepa de levadura descrita puede comprender el gen mutante Och1 que comprende dicha delección E151, o la mutación correspondiente, que está presente en la célula de levadura en un plásmido o secuencia de ADN que no está integrada en el genoma, y en la que el gen Och1 nativo o endógeno en el cromosoma ha sido interrumpido. por lo que dicha cepa es deficiente en la actividad de la α -1,6-manosiltransferasa OCH1 de tipo salvaje.

Las cepas de levadura descritas en este documento también incluyen aquellas cepas de levadura que han sido modificadas genéticamente para expresar una o más glicoproteínas heterólogas de interés. La glicosilación de las glicoproteínas heterólogas expresadas a partir de estas cepas previamente modificadas puede reducirse mediante la transformación de dichas cepas, utilizando protocolos de transformación de levadura conocidos por la persona experta. Una molécula de ácido nucleico, vector o plásmido, puede introducirse en las células de una cepa de levadura utilizando métodos conocidos, como la técnica del esferoplasto, descrita por Cregg et al. 1985, o el sistema de transformación de levadura de cloruro de litio a _cell entero, Ito et al. Agric. Biol. Chem. 48:_341, modificado para su uso en Pichia como se describe en EP 312,934. Otros métodos publicados útiles para la transformación de los plásmidos o vectores lineales incluyen la patente de EE. UU. No. 4,929,555; Hinnen et al._ Proc. Nat. Acad Sci. USA 75:_1929 (1978);_ Ito et al. J. Bacteriol. 153:_163 (1983); Patente de EE. UU. No. 4,879,231; Sreekrishna y cols. Gen 59:_115 (1987). También se pueden utilizar procedimientos de electroporación y PEG1000 transformación de células completas. Métodos de Cregg y Russel en Biología Molecular: Protocolos de Pichia, Capítulo 3, Humana Press, Totowa, N.J., pp. 27-39 (1998). Las células de levadura transformadas pueden seleccionarse mediante el uso de técnicas apropiadas que incluyen, entre otras, el cultivo de células auxotróficas después de la transformación en ausencia del producto bioquímico requerido (debido a la auxotrofia de la célula), la selección y detección de un nuevo fenotipo, o el cultivo en presencia de un antibiótico que es tóxico para la levadura en ausencia

de un gen de resistencia contenido en los transformantes. Los transformantes también pueden seleccionarse y/o verificarse mediante la integración del casete de expresión en el genoma, que puede evaluarse, por ejemplo, mediante análisis de PCR o secuenciación.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se relaciona con un método para producir recombinantemente una glicoproteína con glicosilación reducida, más específicamente en el que la mayoría de sus N-glicanos son Man₈GlcNac₂, en levadura, que comprende los pasos de fabricación de una levadura transgénica que expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una glicoproteína heteróloga en la que dicha levadura comprende el gen mutante Oh1 para codificar el mutante Och1 como se describe en este documento, careciendo de la Glu en la posición 151 en comparación con SEQ ID NO:1, e incubando dichas células de levadura transgénica para expresar la glicoproteína de forma recombinante, y opcionalmente, aislar dicha glicoproteína de la levadura cultivada.

Alternativamente, se utiliza una cepa de levadura que comprende el gen mutante Och1 como se ha descrito y que ya ha sido modificado genéticamente para expresar una glicoproteína, en el método descrito en este documento. Alternativamente, en la realización en la que la cepa de levadura no expresa una glicoproteína de interés, y el gen de tipo salvaje Och1 está alterado, pero aún no contiene el gen mutante Och1 como se describe aquí, una cepa de levadura puede transformarse, ya sea consecutiva o simultáneamente, con una secuencia de nucleótidos capaz de expresar entonces glicoproteína e introducir el plásmido o vector o molécula de ácido nucleico que comprende el gen Och1 mutante.

"Una glicoproteína", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína que, en las levaduras, está glicosilada en uno o más residuos de asparaginas o en uno o más residuos de serina o treonina, o en ambas asparaginas y residuos de serina o treonina. El término "glicosilación reducida" se refiere a un tamaño reducido de la fracción de carbohidratos en la glicoproteína, particularmente con menos residuos de manosa, cuando la glicoproteína se expresa en una cepa de levadura que ha sido modificada como se describe en este documento, en comparación con una cepa de tipo salvaje no modificada de la levadura metilotrofa. De acuerdo con la presente invención, la producción de una glicoproteína de interés con glicosilación reducida puede lograrse de varias maneras. Una secuencia de nucleótidos capaz de expresar una glicoproteína puede introducirse en una cepa de levadura que ha sido previamente modificada de acuerdo con la presente invención, es decir, una cepa mutante OCH1_E151del transformada con uno o más de los vectores y capaz de producir glicoproteínas con glicosilación reducida.

Las glicoproteínas producidas se pueden purificar por métodos convencionales. Los protocolos de purificación pueden determinarse por la naturaleza de la proteína específica que se va a purificar. Tal

determinación está dentro del nivel ordinario de habilidad en el arte. Por ejemplo, el medio de cultivo celular se separa de las células y la proteína secretada por las células se puede aislar del medio mediante técnicas de aislamiento rutinarias como la precipitación, la inmunoadsorción, el fraccionamiento o una variedad de métodos cromatográficos.

- 5 Debe entenderse que aunque se han discutido en este documento realizaciones particulares, configuraciones específicas, composiciones, así como materiales y/o moléculas, para métodos, composiciones y productos de acuerdo con la divulgación, se pueden realizar varios cambios o modificaciones en la forma y el detalle sin apartarse del alcance de esta invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor realizaciones particulares, y no deben considerarse
- 10 limitantes de la aplicación. La aplicación está limitada únicamente por las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Introducción

La inactivación del gen OCH1 es el primer paso hacia la humanización de los glicanos de la levadura y da como resultado glicoproteínas que portan una mayoría de glicanos Man₈GlcNAc₂. Además de la

15 disminución de la heterogeneidad de los glicanos, la eliminación completa de Och1p da como resultado células con un crecimiento celular reducido, una síntesis de la pared celular deteriorada y una mayor sensibilidad a la temperatura (Krainer, et al., Scientific Reports. 3 (2013) srep03279). En la estrategia GlycoSwitch, en lugar de una eliminación, la interrupción del gen OCH1 se logra mediante la integración de la manosidasa-I retenida en el RE de T. reesei, lo que da como resultado la expresión de un Och1p

20 catalíticamente inactivo (Met1-Ala155) y seguida inadvertidamente por la producción de un Och1p catalíticamente activo truncado en el extremo N (OCH1_GSMan5) (**Figura 1**). La cepa GlycoSwitchM5 muestra un tiempo de duplicación similar al de la cepa WT, pero aún así presenta una densidad celular reducida en la fase estacionaria (Jacobs et al., Nat Protoc. 4 (2009) 58–70; Contreras et al., EP1294910B1). Se generó un mutante con estabilidad mejorada de la cepa GlycoSwitchM5 eliminando

25 la copia anterior del locus diseñado, mientras se dejaba la copia posterior con la alteración fortuita del extremo N (**Figura 1**, SuperMan5) (Gehlsen y Chappell, EP2912162B1- Research Corp Technologies, Inc.). Este mutante tiene una estabilidad genómica aumentada y produce N-glicanos homogéneos durante generaciones después de rondas de congelación y descongelación y después de transformaciones posteriores.

30 **Ejemplo 1. Edición CRISPR/Cas del gen OCH1 en la cepa Pichia de tipo salvaje NRRL Y-14430.**

Para generar nuevos mutantes OCH1 de Pichia pastoris, se utilizó el casete CRISPR/Cas9 presente en el plásmido pPpT4_pHTXhsCas9 (Figura 2A) (obtenido de Weninger, et al., J Biotechnol, 2016. 235: p. 139-

149). La inserción del ARN guía (SEQ ID NO:10) en el plásmido pPpT4_pHTXhsCas9 se confirmó mediante la amplificación de un fragmento de 500 pb (**Figura 2B**). El análisis de restricción confirmó la integridad del plásmido como se muestra en la **Figura 2C** por la presencia de una banda alrededor de 8 kb. Después de la transformación de *Pichia pastoris* NRRL Y-11430 con pPpT4_pHTXhsCas9-OCH1-gRNA3, el cribado de clones realizado por PCR y secuenciación condujo a la identificación de varios mutantes. Uno de ellos consistió en una gran delección evidenciada por la amplificación de fragmentos más pequeños de los esperados (aproximadamente 715pb y 1150pb para los primers 5-6 (SEQ ID NO:5-6) y 3-4 (SEQ ID NO:3-4), respectivamente, llamados Δ OCH1 o **OCH1_full KO**) (**Figura 3**). Δ OCH1 tiene una gran delección de 537 pb, que comienza 83 pb aguas arriba de la secuencia codificante de OCH1 y trunca los primeros 151 aminoácidos de Och1p, lo que abole completamente la expresión de la proteína (**Figura 1, OCH1_full KO**). Los otros mutantes presentaron pequeñas delecciones que fueron identificadas por secuenciación: dos de ellas condujeron a pequeños cambios en la proteína (OCH1_1 y OCH1_2). Las mutaciones del clon OCH1_1 (denominado **OCH1_E151del**) se localizaron cerca del sitio activo (posiciones 183-185) e implicaron una delección de un aminoácido ácido glutámico (E151) con carga negativa que. Para el mutante OCH1_2, se identificó una delección de los aminoácidos 150P, 151E y 152V, que se encuentran alrededor de la misma posición de la mutación obtenida en el clon OCH1_1.

La caracterización se realizó inicialmente mediante la verificación de su tasa de crecimiento, sensibilidad a la temperatura y perfiles de glicanos. En cuanto al crecimiento celular, se observó que las cepas mutantes presentaron un crecimiento lento en comparación con la cepa de tipo salvaje. Además, se observó un aumento en la sensibilidad a la temperatura en las cepas mutantes, que se rescató mediante la adición de Sorbitol 1M al medio (**Figura 4**).

Aunque todos los mutantes OCH1 obtenidos mostraron las características fenotípicas mencionadas anteriormente, la gravedad del retraso en el crecimiento y la sensibilidad a la temperatura parecieron correlacionarse con la mutación específica. En este sentido, el mutante con mayor delección (Δ OCH1) presentó el fenotipo más deteriorado, mientras que la delección de un solo aminoácido (OCH1_1 o **OCH1_E151del**) mostró un fenotipo de crecimiento atenuado, por lo que fue menos severamente deteriorado (**Figura 4**). Según el fenotipo de OCH1_E151del, la delección de un solo aminoácido parece ser importante para la actividad de la enzima. Una situación similar se observó para OCH1_2 mutante, que mostró una delección de los aminoácidos 150P, 151E y 152V, que se encuentran alrededor de la misma posición de la mutación obtenida en el clon OCH1_1. Sin embargo, es evidente que OCH1_2 mostraron una sensibilidad a la temperatura más severa y una menor recuperación después del tratamiento con sorbitol que la observada para OCH1_1 mutante, lo que demuestra la importancia para la actividad enzimática de los tres aminoácidos eliminados (**Figura 4**).

El análisis de glicanos mostró diferencias en el patrón de N-glicosilación entre *P. pastoris* NRRL Y-11430 WT y las cepas mutadas. En el primero, el pico principal correspondió a glicoformas de manosa 9 (M9), con pequeñas cantidades de glicoformas M8. Por el contrario, los mutantes OCH1 mostraron un cambio de M9 a M8 como glicoformo principal (**Figura 5**). La caracterización adicional de los glicanos se realizó mediante digestión de N glicanos utilizando las enzimas α -1-2-manosidasa y α -1-2,3,6 manosidasa (Jack Bean Mannosidasa, JBM). Como se observa en **la Figura 6**, los N-glicanos observados en las cepas mutantes se redujeron a M5 después del tratamiento con α -1-2-manosidasa, mientras que el tratamiento con JBM condujo a un pico único correspondiente a la estructura básica de N-glicanos (GlcNAc- GlcNAc-Man) (**Figura 6**) En contraste, después del tratamiento con α -1-2-manosidasa, los N-glicanos de manosa alta de *P. pastoris* La cepa NRRL Y-11430 WT se redujo a M9, mientras que el tratamiento con JBM condujo a un pico único similar al observado para las cepas mutantes (**Figura 6**).

Se seleccionaron dos mutantes para su posterior análisis y expresión de proteínas recombinantes, en función de su sensibilidad a la temperatura, morfología celular y perfil de glicosilación: **OCH1_1 (OCH1_E151del)** y **Δ OCH1 (OCH1_full KO)** (**Figura 1**). Los genotipos de las dos cepas knock-out se confirmaron mediante secuenciación de ILLUMINA y no se encontraron otras mutaciones que pudieran ser causantes del fenotipo observado.

Curiosamente, cuando se observan con más detalle, estos dos mutantes muestran características morfológicas diferentes. La OCH1_E151del tiene una morfología de colonia lisa, casi indistinguible de la cepa de tipo salvaje, mientras que la delección completa de OCH1 tiene una morfología de colonia arrugada (**Figura 7, 12**). Sin embargo, ambas cepas tienen una tasa de crecimiento específico más lenta en los matraces de batido en comparación con la cepa parental de tipo salvaje NRRL Y-11430 (**Figura 8**).

Ejemplo 2. Expresión recombinante de un anticuerpo en las cepas mutantes OCH1 de Pichia pastoris.

Los anticuerpos están emergiendo como terapias antivirales efectivas contra infecciones virales altamente virulentas, pero las tecnologías de fabricación actuales son extremadamente complejas, requieren mucho tiempo y grandes inversiones. La levadura metilótrofa *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*) es uno de los huéspedes preferidos para la producción de productos biofarmacéuticos. Un obstáculo que impide que *Pichia* fabrique fármacos que contengan Fc es que la vía de glicosilación de la levadura produce glicoproteínas modificadas con glicanos oligosacáridos con alto contenido de manosa específicos de la levadura en lugar de glicanos complejos de mamíferos, que pueden ser inmunogénicos y conducir a una eliminación rápida. En la literatura se han reportado varias cepas de glicoingeniería capaces de producir glicosilación de tipo humano, como también se proporciona en este documento. Alternativamente, se puede extirpar el sitio de glicosilación, lo que da como resultado un

anticuerpo privado de una función efectora activa (Drug Approval Package: VYEPTI, (s.f.). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/761119Orig1s000TOC.cfm (consultado el 2 de septiembre de 2021)). El segundo obstáculo es que la maquinaria de secreción de proteínas para IgG es menos eficiente que en las células de mamíferos. Una de las razones que hacen que la fabricación de anticuerpos sea compleja es el hecho de que son proteínas hetero-multiméricas, y dos genes necesitan ser transcritos, traducidos y plegados en una estructura cuaternaria para tener una molécula funcional. Los anticuerpos de cadena pesada están formados por dos cadenas simples idénticas que se expresan a partir de un solo gen, por lo que la expresión recombinante de anticuerpos de cadena pesada es más fácil. Recientemente, se ha utilizado el constructo de fusión entre los VHH y el Fc humano para aumentar la avidez y prolongar su vida media. Estas proteínas de fusión carecen del dominio CH1 de los anticuerpos, que es notoriamente conocido por ser el dominio de plegamiento lento de los anticuerpos, por lo que mantienen la capacidad de unión, la funcionalidad efectora y la vida media prolongada en un solo formato de gen (Feige, et al. Mol. Cell. 34 (2009) 569-579; Godakova, et al. Toxinas (Basilea). 11 (2019) 464; Schepens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 13, EAB17826 (2021) 24). Para abordar ambos obstáculos, utilizamos las dos cepas mutantes *OCH1* seleccionadas para transformar con el plásmido de expresión para una construcción de anticuerpo VHH-Fc en este documento.

Los virus de la gripe A son virus respiratorios con una alta tasa de mutación que circulan en muchas especies de sangre caliente y, por lo tanto, se consideran una importante amenaza para la salud pública de nuestro tiempo. El ectodominio de la proteína de la matriz 2 (M2e) está altamente conservado entre los diferentes subtipos de influenza A, por lo que se considera un buen objetivo para una vacuna o terapia ampliamente protectora (Saelens, The Journal of Infectious Diseases. 219 (2019) S68–S74). Los VHH específicos de la influenza M2e generados previamente se utilizaron como proteína VHH-Fc para la producción de anticuerpos en mutantes *OCH1* de *Pichia pastoris* modificados con glicoingeniería, bajo el control del promotor AOX1 y fusionados con la señal de secreción Ost1. Se observaron niveles más altos de proteínas de la célula huésped en el medio durante la expresión de proteínas recombinantes en la cepa *OCH1_fullKO* en comparación con la *OCH1_E151del*, probablemente debido a un mayor estrés celular y, en consecuencia, a la lisis celular (**Figura 7C**).

El perfil de glicosilación de la M2eVHH-Fc secretada se analizó mediante electroforesis capilar y ambos mutantes mostraron el perfil de glicosilación típico de la mutación *OCH1* knock-out, siendo la mayoría de los glicanos $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (**Figura 9A**). Sin embargo, aparecieron picos más pequeños a la derecha del pico principal, que probablemente sean el resultado de la actividad de otras manosiltransferasas residentes en el Golgi sobre el sustrato no natural $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Además, en la mutación *OCH1_fullKO* se observaron algunos picos de alta intensidad a la izquierda del pico principal Man_8 (**Figura 9A**). Después de la digestión con α 1-2 manosidasa de *Cellulosimicrobium cellulans* (CcMan5) y fosfatasa

alcalina intestinal de ternera (CIP), estos picos se movieron a la derecha de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, lo que los identifica como glicanos fosforilados que migran más rápido que los glicanos sin carga debido a las cargas negativas adicionales de los grupos fosfato (**Figura 9B**). Como las fosfomanosiltransferasas se regulan positivamente en condiciones de estrés de la pared celular [30], los niveles más altos de fosforilación producidos por la cepa OCH1_fullKO confirman que este mutante tiene un defecto de integridad de la pared celular. Aparte de los glicanos fosforilados, el perfil de glicosilación de los dos mutantes OCH1 es idéntico (**Figura 9A panel IV** y **Figura 9B panel V**), lo que significa que no es necesario un knock-out completo del gen OCH1 para obtener el perfil de glicosilación deseado y el mutante OCH1_E151del debe ser catalíticamente inactivo, con poca o ninguna actividad residual de $\alpha 1,6$ -manosiltransferasa.

Después de la purificación, la proteína M2eVHH-Fc se analizó en LC-MS después de la digestión con la enzima FabRICATOR (Genovis » FabRICATOR Enzyme, (s.f.). <https://www.genovis.com/products/igg-proteases/fabricator/fabricator-enzyme/> (consultado el 4 de noviembre de 2021)), que se escinde en el dominio CH2 justo debajo de la región de bisagra. Esto da como resultado dos fragmentos de proteína sobre TCEP y reducción de ácido yodoacético del enlace S-S de la bisagra, el más pequeño a 15,642.53 Da correspondiente a la bisagra VHH + hIgG y el más grande de 23,872.05 Da correspondiente a los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 Fc humana (calculados como masas monoisotópicas en ExPASy). El sitio de N-glicosilación de Fc está ocupado en > 95 % del M2eVHH-Fc y transporta principalmente glicano $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, con una minoría de especies de manosa superiores, confirmando lo detectado en la electroforesis capilar de los N-glicanos del medio de cultivo que contiene M2eVHH-Fc (**Figura 9**). Para investigar la naturaleza de los glicanos ligados a proteínas, incubamos la proteína purificada con $\alpha 1,2$ manosidasa y con $\alpha 1,2/3/6$ manosidasa de frijol jack antes del análisis. El tratamiento nocturno con $\alpha 1,2$ manosidasa resultó en un pico principal en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (**Figura 13**) y picos más pequeños en masas moleculares más altas (**Figura 13**), en consonancia con lo observado en la electroforesis capilar y el conocimiento previo de que el perfil glicosilado de Pichia OCH1 contiene glicanos modificados por otras $\alpha 1,6$ manosiltransferasas en el Golgi de Pichia (**Figura 9**). La digestión con $\alpha 1,2/3/6$ manosidasa de frijol canavalia pudo eliminar las modificaciones de O-manosa en la bisagra VHH, lo que demuestra que no había β -manosa presente (**Figura 13B**). La O-glicosilación en la parte de la bisagra VHH se redujo y solo se observaron especies con 2 hexosas.

La unión de M2eVHH-Fc purificado a diferentes variantes del péptido M2e se evaluó mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Se investigaron los péptidos de la M2e de la gripe A/humana consensuada (H3N2), A/porcinos/Bélgica/1998 (H1N1) y A/porcinos/Ontario/2001 (H3N1) (SEQ ID NO:12-14). Como era de esperarse, de manera similar al M2eVHH monovalente (M2e-VHH-23m (De Vlieger, et al., (2019) Front. Immunol. Vol10, Art2920), la fusión VHH-Fc puede unirse al péptido

M2 de consenso humano (datos no mostrados), expresado por la mayoría de las cepas humanas H3N2, pero no a los virus de la influenza porcina que circulan actualmente, ya que el epítipo M2eVHH se extiende más allá de los aminoácidos N-término 8 universalmente conservados de M2e.

En un experimento de prueba de concepto, se probó la eficacia del M2eVHH-Fc producido por *Pichia* en la cepa OCH1-E151del para proteger a los ratones en un modelo de desafío contra la gripe. A los ratones BALB/c se les administró por vía intranasal 20 µg de M2eVHH-Fc. El excipiente PBS y el antiGFP-Fc sirvieron como controles negativos, y la IgG2a mAb65 específica de ratón M2e como control positivo. Cuatro horas después de la administración de los anticuerpos, los ratones se infectaron con 2 x DL50 del virus de la influenza A/X47 H3N2. Se controló el peso corporal durante 14 días. Los ratones que recibieron M2eVHH-Fc y mAb65 mostraron una disminución máxima en el peso corporal del 15% y 5% en el día 7 respectivamente, y todos los ratones que recibieron tratamiento con anticuerpos sobrevivieron (**Figura 14**). El M2eVHH-Fc producido por *Pichia* demostró ser protector, aunque en menor medida que el mAb65. La diferencia en la potencia puede atribuirse a la diferencia en la afinidad por M2e, menor afinidad de la IgG humana Fc en el M2eVHH-Fc a los ratones FcγRs y/o un aclaramiento más rápido debido a la glicosilación con alto contenido de manosa de la *molécula producida por Pichia*. Cabe destacar que las moléculas de VHH-Fc tienen aproximadamente la mitad del tamaño de un anticuerpo de longitud completa, por lo tanto, se administró aproximadamente el doble de moléculas para M2eVHH-Fc en comparación con mAbs65. Los resultados fueron suficientes para validar *el comportamiento in vivo* del formato VHH-Fc hecho con levadura y avanzamos con el objetivo principal de esta tesis, es *decir*, establecer y explorar tecnologías para mejorar la fabricación de VHH-Fc en *Pichia*.

Pichia pastoris OCH1_E151del puede producir M2eVHH-Fc correctamente plegado que protege a los ratones desafiados con el virus de la influenza A tras la administración intranasal. En conclusión, la *cepa mutante de Pichia pastoris* NRRL Y-14430 OCH1_E151del muestra un bajo estrés en la pared celular similar al observado en las cepas GlycoSwitchM8 utilizadas anteriormente, por lo que puede aplicarse como una cepa alternativa para la producción recombinante de anticuerpos terapéuticos o proteínas para las que se desea un perfil de glicanos similar al humano.

Ejemplo 3. Producción recombinante de GALNS en *Pichia pastoris* OCH1_151del mutante.

La N-acetilgalactosamina-6-sufato sulfatasa (GALNS) es una glicoproteína lisosomal encargada de hidrolizar los enlaces éster de sulfato de queratán sulfato y condroitina-6-sulfato. El GALNS humano está compuesto por 522 aminoácidos y presenta dos sitios de N-glicosilación (N178 y N397) (Mosquera, A., et al., Process Biochemistry, 2012. 47(12): págs. 2097-2102). Informes anteriores han sugerido que esta enzima se sintetiza como precursor, que luego madura a péptidos de 40 y 15 kDa unidos a través

de enlaces disulfuro para formar monómeros de 60 kDa y homodímeros de 120 kDa (Bielicki y Hopwood, Biochem J, 1991. 279 (Pt 2): págs. 515-20; Masue, et al., J Biochem, 1991. 110(6): págs. 965-70). En los seres humanos, la deficiencia de GALNS causa el síndrome de Morquio A o mucopolisacaridosis tipo IVA (OMIM #253000), una enfermedad humana caracterizada por una

5 condrodisplasia grave, insuficiencia de la válvula cardíaca, compromiso pulmonar, pérdida de audición y visión, y rasgos faciales toscos (Montano, et al., J. Inherit Metab Dis, 2007. **30**(2): págs. 165-74). El GALNS recombinante ha sido el principal enfoque terapéutico para esta enfermedad (Hendriksz, et al., J Inherit Metab Dis, 2014. **37**(6): p. 979-90), y actualmente existe una terapia de reemplazo enzimático (ERT) producida en células CHO (elosulfasa alfa), que fue aprobada en 2014 para uso humano (Sanford,

10 y Lo, Drugs, 2014. 74(6): p. 713-8). Sin embargo, se ha observado que las proteínas recombinantes producidas en las células CHO presentan un patrón de N-glicosilación altamente heterogéneo que difiere del observado en la proteína nativa y puede limitar su efecto terapéutico (Jin, et al., J Biol Chem, 2018. 293(15): págs. 5572-5584; Wang, et al., J Biosci Bioeng, 2015. 119(6):p. 657-60). La enzima GALNS humana se ha producido en microorganismos como *E. coli* y *Pichia pastoris*, obteniendo una enzima

15 activa en ambos sistemas, pero mostrando la importancia de las N-glicosilaciones en la estabilidad de las proteínas y la absorción celular (Rodríguez, et al., J Ind Microbiol Biotechnol, 2010. **37**(11): págs. 1193-201; Reyes, et al. Sci Rep, 2017. **7**(1): pág. 5844). Aunque se reportaron hallazgos prometedores hacia el uso de un GALNS recombinante producido en *P. pastoris* para una ERT de Morquio A, esta enzima mostró glicoformas heterogéneas con un tipo de glicano principal correspondiente a 9 residuos

20 de manosa (M9), que es superior a las glicoformas presentes en la enzima producida en las células CHO (BisP-Man7 y BisP-Man6) (EMA: Informe de evaluación. Vimizin® (elosulfasa alfa): http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002779/WC500169242.pdf). Dado que, en general, los cambios en la N-glicosilación con respecto a la proteína humana de tipo salvaje se han asociado con efectos

25 adversos (Dicker y Strasser, Expert Opin Biol Ther, 2015. 15(10): p. 1501-16), es necesario mejorar el patrón de N-glicosilación de *P. pastoris*, para obtener una proteína más adecuada para fines terapéuticos y preservar su fácil manejo y escalado. Entonces, para este propósito, transformamos las cepas mutantes *OCH1* descritas en este documento. Para expresar GALNS humana recombinante se utilizó el vector de expresión AGZ-H para transformar las cepas mutantes NRRL Y-11430 Δ OCH1 y

30 OCH1_1 de *P. pastoris*. El vector se construyó utilizando clonación modular. La presencia del gen GALNS en las construcciones generadas se confirmó mediante amplificación por PCR y análisis de restricción y la expresión se confirmó para las cepas transformadas. No se observaron diferencias significativas en la actividad de GALNS entre los mutantes OCH1 y las cepas de tipo salvaje (**Figura 10**). Todos los clones

mostraron una actividad enzimática de alrededor de 0,3 U/mL. Estos resultados sugieren que las N-glicosilaciones no son relevantes para la actividad de la enzima.

El análisis detallado del perfil de N-glicosilación purificado de hprGALNS de *los mutantes OCH1 NRRL Y-11430 de P. pastoris* (**Figura 5B**) mostró principalmente la presencia de glicanos M8 similares a las N-glicoformas que se encuentran en las proteínas producidas en células de mamíferos (Clerc, Fet al., Glycoconj J, 2016. 33(3): págs. 309-43; Lalonde, y Durocher, J Biotechnol, 2017. 251: págs. 128-140).

En general, estos resultados sugieren que las cepas de *Pichia pastoris deficientes en OCH1* ofrecen un fácil manejo y plataformas adecuadas para producir enzimas lisosomales recombinantes similares a las humanas.

10 Material y métodos.

Generación de mutantes OCH1.

La cepa silvestre *P. pastoris* (sin. *Komagataella phaffi*) NRRL Y-11430 fue modificada genéticamente para obtener mutantes OCH1 utilizando CRISPR/Cas9 siguiendo el protocolo descrito por Weninger, A., et al. (J Biotechnol, 2016. 235: p. 139-149). Para este propósito, el plásmido pPpT4_pHTX, que contiene el ARNm de OCH1, fue utilizado para transformar la cepa *P. pastoris* NRRL Y-11430. Las levaduras transformantes fueron seleccionadas utilizando medio YPD (extracto de levadura 1% p/v; peptona 2% p/v; dextrosa 2%) suplementado con zeocina 100 µg/mL (R25001). Los clones mutantes fueron seleccionados por PCR utilizando dos conjuntos independientes de cebadores (cebadores SEQ ID NOs: 3-6) y secuenciación.

20 *Eliminación de plásmidos CRISPR/Cas9 de mutantes OCH1 de P. pastoris.*

Después de la confirmación, los plásmidos CRISPR/Cas9 se eliminaron (curaron) de los mutantes OCH1 mediante rayas en placas YPD sin zeocina. Después de 48 h de incubación a 30 °C, las colonias de cada mutante se seleccionaron y cultivaron en medio YPD durante 48 h a 28 °C, y se volvieron a estirar en placas de agar YPD sin zeocina. Para confirmar el curado del plásmido, las colonias de la placa YPD se volvieron a colocar en una placa de agar YPD suplementada con zeocina 100 µg/mL. Después de esta propagación, los mutantes OCH1 pudieron crecer en medios YPD, pero no crecieron en medios suplementados con zeocina.

Cepas y medios.

Se utilizaron *Escherichia coli* (*E. coli*) MC1061 o DH5α para las manipulaciones estándar de biología molecular. Los cultivos de *E. coli* se cultivaron en caldo LB (0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 0,5% de NaCl con o sin agar al 2%) a 37°C. Los cultivos líquidos se cultivan bajo agitación continua a

250 rpm en un agitador-incubador. Se seleccionaron cepas en 50 µg/mL de los antibióticos apropiados: carbenicilina (Duchefa Biochemie), kanamicina (Sigma Aldrich), zeocina® (Life Technologies), higromicina (Duchefa Biochemie) o nourseotricina (Werner BioAgents).

Los cultivos de levadura se cultivaron en YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de D-glucosa con o sin agar al 2%) y se seleccionaron con 100 µg/ml de Zeocina®, o 100 µg/ml de Zeocina® y 500 µg/ml de G418 (InvivoGen) a 28 °C en una incubadora agitadora (250 rpm) o estática a 30 °C. Los transformantes se seleccionaron utilizando la combinación adecuada de antibióticos: 100 µg/mL de Blasticidina S-HCl (Sigma-Aldrich), 100 µg/mL de Zeocina®, 500 µg/mL de Geneticina/G418 (Life Technologies), 300 µg/mL de Higromicina B y 100 µg/mL de Nourseotricina.

10 *Caracterización fenotípica de mutantes OCH1.*

El fenotipo de *los mutantes OCH1* se caracterizó por la morfología de la colonia y la sensibilidad a la temperatura en las placas YPD. La morfología de las colonias se evaluó con aumento macroscópico y estereoscópico de 4X. Además, la evaluación microscópica se realizó mediante observación directa (aumento de 100x) de muestras tomadas de cultivos líquidos en medio YPD a escala de 10 mL. La sensibilidad a la temperatura se determinó como la capacidad de crecer a 30 y 37°C después de 72 h de incubación. Además, para caracterizar aún más el defecto de la pared celular en *los mutantes OCH1*, se realizó un ensayo de rescate mediante cultivo en placas YPD suplementadas con sorbitol 1M (Popolo, et al., Med Mycol, 2001. 39 Supl. 1: p. 111-21).

20 *Construcción de plásmidos del vector de expresión M2eVHH-Fc mediante clonación modular basada en Golden Gate.*

El vector se generó utilizando una versión adaptada del kit de herramientas de clonación modular de levadura basado en el ensamblaje Golden Gate (Vanluchene, disertación, Universidad de Gante, 2020. <http://hdl.handle.net/1854/LU-8684279>; Lee, et al., ACS Synth. Biol. 4 (2015): 975–986). La secuencia codificante de la señal de secreción se diseñó como parte 3a, el VHH como parte 3b, la IgG1 humana bisagra-IgG1 Fc humana como parte 4a. Todas las secuencias fueron optimizadas para la expresión en *P. pastoris* utilizando el algoritmo propietario de IDT y ordenados como gBlocks en IDT (Integrated DNA Technologies BVBA, Lovaina, Bélgica). Cada secuencia de codificación estaba flanqueada por voladizos únicos específicos de la parte ascendente y descendente generados por Bsal. Los bloques g se insertaron en un vector de entrada universal a través de un ensamblaje BsmBI que dio como resultado diferentes plásmidos "parciales", que contienen un casete de resistencia al cloranfenicol. Los plásmidos parciales se ensamblaron en plásmidos de expresión a través de un ensamblaje Golden Gate Bsal. El plásmido de expresión consistió en el ensamblaje de 8 partes: Part_1 conector de ensamblaje izquierdo, Part_2 promotor Part_3 secuencia de codificación (posible de dividir en Part3a y 3b), Part_4 (posible

de dividir en Part4a y 4b) terminador, conector de ensamblaje Part_5 derecho, Part_6 y Part_7 miscelánea (generalmente *Pichia* casete de antibióticos) y Part_8 *E. coli* marcador y origen de replicación. El vector de entrada y el vector Part_8 contienen un casete de abandono RFP o GFP para el cribado rojo o verde/blanco. Cada parte se utiliza en una cantidad equimolar (20 fmol) y se mezcla con la ADN ligasa T4 y la enzima BsmBI o BsaI en una reacción de 20 µl en 1x tampón T4 ADN ligasa. A 25-50 ciclos de digestión (42 °C durante 2 minutos) y ligadura (16 °C durante 5 minutos) les sigue una etapa final de digestión (60 °C durante 10 minutos). La reacción de ensamblaje se transforma en *E. coli* y la selección de plásmidos de expresión correctamente ensamblados se realiza en LB suplementado con antibiótico. Todas las partes y plásmidos de expresión fueron verificados en secuencia.

10 *Transformación de Pichia pastoris*

Para la transformación con plásmido de expresión, las cepas de *Pichia pastoris* se transformaron de acuerdo con el protocolo de transformación de acetato de litio-DTT descrito por Wu y Letchworth (BioTechniques, 36 (2004) 152–154). Brevemente, las células competentes de *Pichia pastoris* se prepararon mediante incubación en 100 mM de LiAc, 10 mM de DTT, 0,6 M de sorbitol y 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Las células competentes se lavaron en 1 M de sorbitol antes de la transformación por electroporación (1,5 kV, 25 µF, 200 Ω) con 1-2 µg de ADN linealizado. Los transformantes se seleccionaron en agar YPD suplementado con antibióticos a 30 °C durante al menos 48 horas.

Expresión y purificación de proteínas en Pichia pastoris

Para la detección de la expresión a pequeña escala, se inocularon colonias individuales de *P. pastoris* en 2 ml de BMGY en un bloque de 24 pocillos profundos. Las células se cultivaron en una incubadora con agitación (28 °C, 250 rpm) en BMGY (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 100 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄, 1,34 % de YNB, 1 % de glicerol, pH 6) durante 48 horas, luego se indujo la expresión de la proteína cambiando el medio a BMMY (misma composición que BMY pero con 1 % de metanol reemplazando el 1 % de glicerol). El cambio a BMMY se realizó recolectando la biomasa a 1500 g, 4 °C durante 10 minutos y resuspendiéndola en BMMY. Se añadió metanol al medio cada 8-10 horas a una concentración final del 1 % y, después de 48 horas, el medio se recolectó mediante centrifugación a 1500 g, 4 °C durante 5 minutos. Los niveles de expresión de proteínas se evaluaron en SDS-PAGE teñido con Coomassie del sobrenadante crudo. El sobrenadante crudo se utilizó inmediatamente para fines analíticos o se almacenó a -20 °C.

Para la purificación de proteínas, se diluyó un cultivo de *P. pastoris* mantenido durante la noche en 125 ml de BMGY hasta 0,1 OD₆₀₀ en matraces de agitación con deflectores de 2 litros. Después de 48 horas, se cambió el medio a BMMY para inducir la expresión de proteínas y se mantuvo la inducción durante otras 48 horas añadiendo metanol a una concentración final del 1 % cada 8-10 horas. El medio de cultivo

se recogió por centrifugación a 1.500 g, 4 °C durante 15 minutos y se filtró sobre un filtro de tapa de botella de 0,22 µm (Millipore) antes de cargarlo en una columna HiTrap MabSelect SuRe de 5 ml (GE Healthcare), equilibrada con NaCl 1,5 M, EDTA 0,5 M, L-histidina 50 mM, pH 7. La columna se eluyó con L-arginina 100 mM, acetato 100 mM, NaCl 125 mM, pH 3,5. Las fracciones recolectadas se neutralizaron a pH 6,5 con 1 M Tris-HCl pH 9. Las fracciones de elución que contenían la proteína de interés (evaluación en SDS-PAGE) se agruparon, se inyectaron en una columna de exclusión por tamaño HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE-Healthcare) y se eluyeron con 25 mM L-His, 125 mM NaCl, pH 6. Después de la determinación espectroscópica de la concentración de proteína (absorbancia a 280 nm menos el blanco de tampón), la proteína purificada se concentró utilizando columnas de centrifugación Amicon 10 kDa MWCO si fue necesario, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Análisis de N-glicosilación de M2e-VHH-Fc por electroforesis capilar

Los N-glicanos en las proteínas secretadas se analizaron mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo asistido por secuenciador de ADN (DSA-FACE) (Laukens, et al., A. Castilho (Ed.), Glyco-Engineering: Methods and Protocols, Springer, Nueva York, NY, 2015: pp. 103-122; Callewaert, et al. Glycobiology (Glicobiología). 11 (2001) 275–281). Al final de la fase de producción, las células se cosechan por centrifugación y se mezcla un volumen de sobrenadante con dos volúmenes de tampón de carboximetilación de reducción (urea 8M, Tris 360 mM a pH 8,6, EDTA 3,2 mM) y las muestras se desnaturalizan a 50 °C durante 1 hora. Las muestras se inmovilizaron en fluoruro de polivinilidenino (PVDF) en una placa multipantalla de 96 pocillos (Millipore) y se redujeron con TDT. Los grupos tiol libres se bloquean con ácido yodoacético y la membrana con polivinilpirrolidona al 1 %. Los N-glicanos son liberados por PNGaseF en tris-acetato de 10 mM a 37 °C (producido internamente). Los glicanos liberados se marcaron durante la noche a 37 °C mediante amidación reductora con trisulfonato de aminopireno (APTS) 10 mM en ácido cítrico y NaCNBH₃ 1M en dimetilsulfóxido (DMSO). El exceso de APTS se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño sobre una resina Sephadex G10 (GE Healthcare) y los glicanos marcados se analizaron en un secuenciador de ADN capilar ABI 3130 (Applied Biosystems). Se incluyeron como referencia los N-glicanos de la RNasa B del páncreas bovino (Man5-9GlcNAc2) y una escalera de dextrano formada por residuos de glucosa ligados a α-1,6 (unidades de glucosa). Los datos se analizaron con el software Genemapper (Applied Biosystems). El tratamiento con exoglucosidasa se realizó en glicanos marcados con *Hypocrea jecorina* α-1,2-manosidasa (producida en nuestro laboratorio, 0,33 µg por digesto) α-1,2/3/6 Jack Bean manosidasa (producida internamente, 19 mU por digesto) y *Streptococcus pneumoniae* β-NAcetilhexosaminidasa (Prozyme, 4 mU por digestión) durante la noche a 37 °C en acetato de sodio 20 mM (pH 5,2).

Unión in vitro por ELISA

Las placas de microtitulación (F96 Maxisorp, Nunc) se recubrieron durante la noche a 37 °C con 100 ng de péptidos M2e (SEQ ID Nos:12-14). Después del lavado, con PBS suplementado con 0,05% Tween-20 (PBST), las placas se bloquearon durante 1 h con leche al 5% en PBS, después de lo cual se lavaron
5 nuevamente 3 veces con PBS y una vez con PBST. Se añadieron diluciones seriadas del VHH-Fc y se detectaron las proteínas unidas anticuerpo anti-His de ratón (1:3000) y anti-HRP de ratón (1:5000). Después del lavado con PBST, se añadieron 50 µl de sustrato de TMB (tetrametilbencidina, BD OptETA) a cada pocillo. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 1M, después de lo cual se midió la absorbancia a 450 nM con un lector de absorbancia de microplacas iMark (Bio Rad). El valor
10 de EC50 se estimó utilizando la ecuación de enlace Binding-Saturation 'one-site total' en GraphPad Prism.

Experimento de desafío en ratones

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de Charles River (Charles River Wiga, Sulzfeld, Alemania). Los animales se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos y en un entorno de temperatura
15 controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 h; se les proporcionó comida y agua ad libitum. La instalación para animales funciona con el número de licencia del gobierno flamenco LA1400536. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Ética Institucional sobre Animales de Experimentación (solicitud ética EC2018-012). Para el tratamiento intranasal y la infección, los ratones fueron anestesiados con isoflurano. Cuatro horas después de la administración intranasal de 20 µg de
20 VHH23-Fc, GBP-Fc (fusión Fc del nanocuerpo de control GBP), 20 µg del anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón específico de M2e (control positivo) o ratones con PBS se infectaron con 2xLD50 del virus de la influenza A/X47 (H3N2). Se controló la pérdida de peso corporal durante 14 días. Los ratones que perdieron más del 25 % de su peso corporal inicial fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Las diferencias en la pérdida de peso corporal se analizaron mediante ANOVA de 2 vías. Las diferencias
25 en la supervivencia se evaluaron mediante una prueba de Log-rank (Mantel-Cox). El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 9.1.

Técnicas analíticas de proteínas

Las proteínas se analizaron en geles Tris-Glycine SDS-PAGE al 12% o GenScript ExpressPlus™ PAGE Gel, 4-20%. Las muestras se mezclaron con colorante de carga Laemmli (200 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 40%
30 glicerol, 10% SDS, 0,8% azul de bromofenol con o sin 30 mM de DTT) y se desnaturalizaron con calor a 98 °C durante 10 minutos. Para la visualización, los geles se tiñeron con Coomassie (0,1% Coomassie, 40% metanol, 10% ácido acético) durante 1 hora y se decoloraron (40% metanol, 10% ácido acético) durante 4-6 horas.

Cuando fue necesario, las muestras se precipitaron antes del análisis utilizando el protocolo DOC-TCA. Brevemente, se mezcló 1 ml de sobrenadante de cultivo con 100 µl de ácido Na-desoxicólico (DOC, 5 mg/mL) y 110 µl de ácido tricloroacético (TCA) saturado (p/v). Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad y el pellet se lava con acetona seguido de etanol al 70% y se vuelve a suspender en PBS después de ser secado. El contenido proteico de los lisados se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce).

La desglicosilación de proteínas con PNGaseF (New England Biolabs) se realizó siguiendo el protocolo NEB. Las proteínas purificadas con DOC-TCA se desnaturalizaron en tampón de desnaturalización de glicoproteínas (0,5% SDS, 40 mM DTT) durante 5 minutos a 98 °C, luego se suplementaron con 1 % de NP-40 y 50 mM de fosfato de sodio pH 7,5 y 7,6 IUM mU PNGaseF (producido internamente). Las muestras se analizaron en SDS-PAGE después de la incubación nocturna a 37 °C.

En el caso de las muestras de Western blot de GALNS, los extractos de proteínas crudas de cultivos de 100 mL se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) SDS en condiciones reductoras. Las muestras se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Bioscience, Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos). El GALNS recombinante fue reconocido con un anticuerpo α-His (6X His Tag Antibody Dylight™ 800 Conjugated. Rockland 200-345-382).

Para la espectrometría de masas de proteínas intactas, la proteína M2eVHH-Fc purificada (10 µg) se trató previamente con 10 U de la enzima FabRICATOR (Genovis) a 37 °C durante 2 h y luego se redujo con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 10 mM) durante 30 min a 37 °C. La proteína reducida se separó en un sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) conectado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific). En resumen, se inyectaron aproximadamente 8 µg de proteína en una columna Zorbax 300SB-C18 (5 µm, 300Å, 1x250mm IDxL; Agilent Technologies) y se separaron mediante un gradiente de 30 min desde el 5% hasta el 80% de disolvente B a un caudal de 100 µl/min (disolvente A: 0,1% de ácido fórmico y 0,05% de ácido trifluoroacético en agua; disolvente B: 0,1% de ácido fórmico y 0,05% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo). La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C. Las proteínas eluidoras se rociaron directamente en el espectrómetro de masas con una fuente ESI utilizando los siguientes parámetros: voltaje de pulverización de 4,2 kV, disociación inducida por la superficie de 30 V, temperatura capilar de 325 °C, voltaje capilar de 35 V y un caudal de gas de vaina de 7 (unidades arbitrarias). El espectrómetro de masas funcionó en modo MS1 utilizando el analizador orbitrap a una resolución de 100.000 (a m/z 400) y un rango de masas de 600-4000 m/z, en modo de perfil. Los espectros MS resultantes se deconvolutaron con el software BioPharma Finder™3.0 (Thermo Fischer Scientific)

utilizando el algoritmo de deconvolución Xtract (espectros resueltos isotópicamente). Los espectros deconvolutados se anotaron manualmente.

Producción de GALNS recombinante humano

La secuencia utilizada para la expresión de GALNS fue optimizada para codón para *Pichia pastoris* como se describió anteriormente (Espejo-Mojica, et al., Universitas Scientiarum, 2016. 21: págs. 195-217). Los vectores de expresión AGZ-H portadores de un ADNc de GALNS sin His-tag N-terminal se transformaron en *mutantes OCH1 curados* para expresar la proteína GALNS humana recombinante (hprGALNS). Los transformantes se seleccionaron utilizando placas de YPD suplementadas con zeocina 100 µg/mL. La transformación se confirmó mediante PCR utilizando cebadores específicos de GALNS (cebadores 7 y 8; SEQ ID NOs: 7-8), mientras que la expresión de hprGALNS fue seguida por Western blot utilizando un anticuerpo α-His (6X His Tag Antibody Dylight™ 800 Conjugado. Rockland 200-345-382). Además, se confirmó la inserción de casetes de expresión mediante amplificación con cebadores (Primers 7 y 9; SEQ ID NOs: 7 y 9) para el gen AOX1.

Caracterización del crecimiento celular

Un clon de *P. pastoris* NRRL Y-11430 y un clon de *P. pastoris* NRRLY-11430-ΔOCH1 se cultivaron por triplicado en 60 mL de medio YPD hasta alcanzar 1.2 O.D. a 28°C y 200 RPM. Las células se cosecharon por centrifugación (4000 RPM 20 min a 4 °C) y el pellet se resuspendió en 100 mL de medio BMGY y se cultivó durante 30 h a 30 °C y 200 RPM. Finalmente, las células se recuperaron y resuspendieron en 100 mL de medio BMMY, y se cultivaron durante 96 h a 30 °C y 250 RPM. Se añadió metanol cada 24 h para mantener una concentración final del 0,5%. Las alícuotas se tomaron cada 24 h y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las alícuotas se centrifugaron y se midió la actividad de GALNS en el sobrenadante.

Cultivos de matraces de agitación para la producción de GALNS y análisis de actividad

Los *P. pastoris* Y-11430-ΔOCH1-GALNS se cultivaron a una escala de 100 mL. Para ello, las células se cultivaron en 100 mL de medio YPD durante 24h a 28 °C y 250 RPM. Las células se recolectaron por centrifugación (4000 RPM 20 min a 4 °C) y el pellet se resuspendió en 100 mL de medio BMGY y se cultivó durante 48 h a 30 °C y 250 RPM. Finalmente, las células se recuperaron y resuspendieron en 100 mL de medio BMMY, y se cultivaron durante 96 h a 30 °C y 250 RPM. Se añadió metanol cada 24 h para mantener una concentración final del 0,5%. Las alícuotas se tomaron cada 24 h y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las alícuotas se centrifugaron y se midió la actividad de GALNS en el sobrenadante.

Actividad enzimática

La actividad de GALNS se ensayó utilizando el sustrato 4-metilumbeliferol-β-d-galactopiranosido-6-sulfato (Toronto Chemicals Research, North York, ON, Canadá), siguiendo un protocolo previamente

informado (van Diggelen, et al., Clin Chim Acta, 1990. 187(2): págs. 131-9). Brevemente, se incubaron 10 µL de la muestra y 20 µL de solución de sustrato de 2mM (pH=4,3) a 37°C durante 17 horas, tras lo cual se añadió a la mezcla β-galactosidasa (de *Aspergillus oryzae*) (SIGMA ALDRICH G5160-25KU, Japón), y se incubó a 37°C por 2 horas más. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 0,17M de tampón de carbonato de sodio pH 9,8 que contenía 0,24M de glicina. La fluorescencia se midió en un fluorómetro de módulo utilizando 360 nm como longitud de onda de excitación y 415 nm como longitud de onda de emisión. Las lecturas de fluorescencia se compararon con la fluorescencia medida de una solución estándar que contenía 1 nM de 4-metilumbeliferona. Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza 1 nmol de sustrato por hora. La actividad específica de GALNS se expresó como U mg⁻¹ de proteína, según lo determinado por el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo).

Análisis de N-glicanos y digestión de exoglicosidasas de proteínas GALNS

Los mutantes *OCH1* se cultivaron en 2 mL de medio YPD en 24 placas de pocillos de escritura y se cultivaron a 28 °C y 200 RPM hasta un OD₆₀₀ de 1.5. Los clones productores de hprGALNS se cultivaron en 2 mL de medio BMGY (extracto de levadura 1% p/v; peptona 2% p/v; fosfato de potasio 100 mM pH 6.0; base nitrogenada de levadura 1.34%; biotina 4 × 10⁻⁵%; glicerol 1%), y cultivado durante 24 h a 28 °C y 200 RPM. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 2500 RPM 10 minutos a 4 °C, se retiró el medio y las células se resuspendieron en medio BMMY (fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; levadura base nitrogenada 1.34%; biotina 4 × 10⁻⁵%; metanol 0.5%), y se cultivaron durante 24 h a 28 °C y 200 RPM. Para el análisis de N-glicanos, las muestras se marcaron con ácido 8-aminopireno-1.3.6-trisulfónico (APTS) de acuerdo con un protocolo publicado (Laroy, et al. Nat Protoc, 2006. 1(1): págs. 397-405). Luego, los glicanos ligados a N se prepararon mediante transferencia en una placa de 96 pocillos con placas de membrana de PVDF (Millipore, Bedford, Reino Unido) y se analizaron mediante electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) utilizando un secuenciador de ADN ABI 3130, como se informó previamente (Laroy et al.). La ARNasa B y el dextrano se utilizaron como patrones de referencia.

Para caracterizar aún más la estructura de N-glicanos, las muestras de proteínas se digirieron utilizando α 1-2 manosidasa, α1-2,3,6 manosidasa (Jack Bean Mannosidasa, JBM) y CcGH92_4 y CcGH92_5 manosidasas de *C. cellulans*, previamente producidas por el grupo Callewaert en el centro de biotecnología médica VIB-UGENT (Tiels, et al., Nat Biotechnol, 2012. 30(12): p. 1225-31). Después de la digestión, las muestras se analizaron a través de CE-LIF como se describió anteriormente.

Las diferencias entre los grupos se analizaron para determinar su significación estadística mediante el uso de ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró significativo un nivel de error del 5 % ($p < 0,05$). Todos los análisis se realizaron con GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE. UU.). Todos los resultados se muestran como media $\pm$ DE.

Listado de secuencias

>SEQ ID NO:1: *Komagataella phaffii* (cepa NRRL Y-11430) 'Secuencia OCH1 de la manosiltransferasa del aparato cis-Golgi' (404 aminoácidos)

MAKADGSLLYNPHNPPRRYYFYMAIFAVSVICVLGPSQQLSSPKIDYDPLTLRSLDLKTLEAPSQLSPGTVEDNLRR
QLEFHFYPYRSYEPFPQHIWQTWKVSPSDSSFPKNFKDLGESWLQRSPNYDHFVIPDDAAWELIHHEYERVPEVLEAF
HLLPEPILKADFFRYLILFARGGLYADMDTMLLKPIESWLTFNETIGGVKNNAGLVIGIEADPDRPDWHDWYARRIQF
CQWAIQSKRGHPALRELIVRVVSTTLRKEKSGYLN MVEGKDRGSDVMDWTGPGIFTDTLFDYMTNVNTTGHSGQ
GIGAGSAYYNALSLEERDALSARPNGEMLKEKVPKYAQQVVLWEQFTNLRSPKLIDDILILPITSFSPGIGHSGAGDL
NHHLAYIRHTFEGSWKD

>SEQ ID NO:2: OCH1_E151del secuencia de aminoácidos (403 aminoácidos)

MAKADGSLLYNPHNPPRRYYFYMAIFAVSVICVLGPSQQLSSPKIDYDPLTLRSLDLKTLEAPSQLSPGTVEDNLRR
QLEFHFYPYRSYEPFPQHIWQTWKVSPSDSSFPKNFKDLGESWLQRSPNYDHFVIPDDAAWELIHHEYERVPEVLEAFH
LLPEPILKADFFRYLILFARGGLYADMDTMLLKPIESWLTFNETIGGVKNNAGLVIGIEADPDRPDWHDWYARRIQFC
QWAIQSKRGHPALRELIVRVVSTTLRKEKSGYLN MVEGKDRGSDVMDWTGPGIFTDTLFDYMTNVNTTGHSGQGI
GAGSAYYNALSLEERDALSARPNGEMLKEKVPKYAQQVVLWEQFTNLRSPKLIDDILILPITSFSPGIGHSGAGDLN
HHLAYIRHTFEGSWKD

>SEQ ID N°:3: OCH1gene_p Cebador directo 3

TTC AAA AGA AGG TCG CCT GGT

>SEQ ID N°:4: OCH1gene_p Cebador inverso 4

AGT CAG CCA CGA TTC TAT TGG T

>SEQ ID NO:5: Gen OCH1 Cebador directo 5

TCTCTCTGGAACATTCTCTATCG

>SEQ ID NO:6: gen OCH1 Cebador inverso 6

AGTCAGCCACGATTCTATTGGT

>SEQ ID N°:7: pAOX1_Fw Cebador directo 7

GACTGGTTCCAATTGACAAGC

REFERENCIAS

- [1] C.P. Kurtzman, Las cepas biotecnológicas de *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* son *Komagataella phaffii*, según se determinó a partir del análisis de secuencias multigénicas, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1435–1435.
- 5 [2] G.H. Wegner, Aplicaciones emergentes de las levaduras metilotróficas, *FEMS Microbiology Reviews.* 7 (1990) 279–283.
- [3] J.M. Cregg, K.J. Barringer, A.Y. Hessler, K.R. Madden, *Pichia pastoris* como sistema huésped para transformaciones, *Molecular and Cellular Biology.* 5 (1985) 3376–3385.
- [4] J.L. Cereghino, J.M. Cregg, Expresión de proteínas heterólogas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews.* 24 (2000) 45–66.
- 10 [5] S. Braun-Galleani, J.A. Dias, A.Y. Coughlan, A.P. Ryan, K.P. Byrne, K.H. Wolfe, Diversidad genómica y recombinación meiótica entre aislados de la levadura biotecnológica *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), *Microbial Cell Factories.* 18 (2019) 211.
- [6] F.S. Hartner, A. Glieder, Regulación de los genes de la vía de utilización de metanol en levaduras, *Microbial Cell Factories.* 5 (2006) 39.
- 15 [7] J.M. Cregg, K.R. Madden, K.J. Barringer, G.P. Thill, C.A. Stillman, Caracterización funcional de los dos genes de la alcohol oxidasa de la levadura *Pichia pastoris*, *Molecular and Cellular Biology.* 9 (1989) 1316–1323.
- [8] S.B. Ellis, P.F. Brust, P.J. Koutz, A.F. Waters, M.M. Harpold, T.R. Gingeras, Aislamiento de la alcohol oxidasa y otros dos genes regulables por metanol de la levadura *Pichia pastoris*, *Molecular and Cellular Biology.* 5 (1985) 1111–1121.
- 20 [9] M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, R. Bona, K. Rumbold, J. Lückl, H. Griengl, S.D. Kohlwein, H. Schwab, Expresión intracelular de alto nivel de hidroxinitrilo liasa del árbol de caucho tropical *Hevea brasiliensis* en huéspedes microbianos, *Protein Expr Purif.* 11 (1997) 61–71.
- 25 [10] Kalbitor (ecallantide) FDA Approval History, *Drugs.Com.* (sin fecha). <https://www.drugs.com/history/kalbitor.html> (consultado el 28 de septiembre de 2021).
- [11] Productos producidos con *Pichia* en el mercado | Plataforma de expresión de proteínas de *Pichia pastoris*: expresión de proteínas eucariotas, (2012).
- [12] S.C. Spohner, H. Müller, H. Quitmann, P. Czermak, Expresión de enzimas para su uso en la industria de alimentos y piensos con *Pichia pastoris*, *Journal of Biotechnology.* 202 (2015) 118–134.
- 30 [13] La carne sin carne supera en ventas a la carne de res, *Nature Biotechnology.* 37 (2019) 1250–1250.
- [14] Aebi, M., Glicosilación de proteínas ligadas a N en el RE. *Biochim Biophys Acta*, (2013). 1833(11): p. 2430-7.
- [15] Delic, M., et al., La vía secretora: exploración de la diversidad de levaduras. *FEMS Microbiol Rev*,

(2013). 37(6): p. 872-914.

[16] Laukens, B., C. De Visscher y N. Callewaert, Ingeniería de levadura para producir glicoproteínas humanas: ¿dónde estamos ahora? *Future Microbiol*, (2015). 10(1): p. 21-34.

[17] Choi, B.K., et al., Uso de bibliotecas genéticas combinatorias para humanizar la glicosilación ligada a N

en la levadura *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2003). 100(9): pág. 5022-7.

[18] Nakayama et al., OCH1 codifica una nueva manosiltransferasa unida a la membrana: elongación de la cadena externa de oligosacáridos ligados a asparagina., *EMBO Journal*. 11 (1992) 2511–2519.

[19] T. Nagasu, Y. Shimma, Y. Nakanishi, J. Kuromitsu, K. Iwama, K. Nakayama, K. Suzuki, Y. Jigami, Aislamiento de nuevos mutantes sensibles a la temperatura de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en elongación de la cadena externa de manosa, *Yeast*. 8 (1992) 535–547.

[20] F.W. Krainer, C. Gmeiner, L. Neutsch, M. Windwarder, R. Pletzenauer, C. Herwig, F. Altmann, A. Glieder, O. Spadiut, La eliminación de una manosiltransferasa endógena aumenta la homogeneidad de las glicoproteínas producidas en *Pichia pastoris*, *Scientific Reports*. 3 (2013) srep03279.

[21] W. Vervecken, V. Kaigorodov, N. Callewaert, S. Geysens, K. De Vusser, R. Contreras, Síntesis in vivo de N-glucanos híbridos de tipo similar a los de los mamíferos en *Pichia pastoris*, *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2004) 2639–2646.

[22] B. Laukens, C.D. Wachter, N. Callewaert, Ingeniería de la vía de N-glucosilación de *Pichia pastoris* utilizando la tecnología GlycoSwitch, en: *Glyco-Engineering*, Humana Press, Nueva York, NY, 2015: págs. 103–122.

[23] A. Pekarsky, L. Veiter, V. Rajamanickam, C. Herwig, C. Grünwald-Gruber, F. Altmann, O. Spadiut, Producción de una peroxidasa recombinante en diferentes cepas de *Pichia pastoris* modificadas mediante glicoingeniería: una comparación morfológica y fisiológica, *Microbial Cell Factories*. 17 (2018) 183.