

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 494**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2006 E 06844853 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1957637**

54 Título: **Células huésped mejoradas y métodos de cultivo**

30 Prioridad:

08.12.2005 US 749076 P

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**AMGEN, INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

CROWELL, CHRISTOPHER, K.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 434 494 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células huésped mejoradas y métodos de cultivo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a células huésped mejoradas y a métodos de cultivo que mejoran la producción de glicoproteínas.

Antecedentes de la invención

10 Son altamente deseables métodos de aumento de la producción de proteína huésped recombinante en la industria farmacéutica y en el laboratorio de muchas maneras, incluyendo ahorros de costes, ahorros de tiempo y capacidad de fabricación. El tratamiento con butirato de sodio ha sido un método de aumento de la producción de proteína en cultivo celular en procedimientos biofarmacéuticos comerciales. Sin embargo, el beneficio derivado del aumento de los rendimientos de proteína algunas veces se compensa por los efectos secundarios tóxicos del butirato de sodio.

15 El butirato de sodio es un ácido graso de cadena corta que inhibe la enzima histona desacetilasa (HDAC) responsable del mantenimiento de la estructura de la cromatina en el núcleo de las células (Davie, J. Nutrition 133: 2485S-2493S, 2003). La pérdida de actividad da como resultado una alteración en la regulación transcripcional de genes a través del proceso de acetilación y desacetilación normal de las histonas (Prasad *et al.*, In Vitro 12: 125-132, 1976). Se ha mostrado que el cambio en la regulación transcripcional aumenta la productividad específica de líneas celulares que producen proteínas recombinantes *in vitro*. Por ejemplo, se ha mostrado que el butirato de sodio aumenta la síntesis de hormona foliculoestimulante (FSH) recombinante secretada, activador del plasminógeno tisular (tPA), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO) en células de ovario de hámster chino (CHO) (Sung *et al.*, J. Biotechnology 112: 323-335, 2004; Hendrick *et al.* Cytotechnology 36: 71-83, 2001; Chung *et al.*, J. Microbiol. Biotechnol. 11, 1087-1092, 2001; Chotigeat *et al.*, Cytotechnology 15: 217-221, 1994; Chang *et al.*, Free Radical Research 30: 85-91, 1999). No está claro el mecanismo preciso responsable de estos aumentos. Se ha mostrado que el tratamiento con butirato de sodio aumenta transitoriamente los niveles de ARNm para proteína recombinante, dando como resultado aumentos en la biosíntesis de proteínas resultante (Yuan *et al.*, J. Biol. Chem. 260: 3778-3783, 1985).

20 Se han estudiado previamente los cambios en la expresión génica provocados por el butirato de sodio en líneas celulares implicadas en la investigación del cáncer de colon. Los estudios demostraron que el butirato de sodio altera la expresión de múltiples genes implicados en la progresión del ciclo celular, diferenciación, señalización por citocinas y apoptosis. Sin embargo, tales estudios se limitaban a un subconjunto relativamente pequeño de genes y no determinaron si los genes estaban implicados en la biosíntesis de proteínas. (Joseph *et al.*, Oncogene 23: 6304-6315, 2004; Tabuchi *et al.*, Biochem. Biophys. Research Comm. 293: 1287-1294, 2002; Iacomino *et al.*, Biochem. Biophys. Research Comm. 285: 1280-1289, 2001; Mariadason *et al.*, Cancer Res. 60: 4561-4572, 2000; Della Ragione *et al.*, FEBS Letters 499, 199-204, 2001).

35 La enzima alfa 1,2 manosidasa I (MAN1C1) es una enzima implicada en el procesamiento de oligosacáridos unidos en N a glicoproteínas que se ha descrito en Tremblay *et al.* (Glycobiology 8: 585-595, 1998) y Gonzalez *et al.* (J. Biol. Chem. 274: 21375-21386, 1999). La enzima cataliza la primera etapa de recorte de la manosa asociada con el procesamiento de estructuras oligosacáridas con alto contenido en manosa eliminando un azúcar manosa terminal del oligosacárido. La glicosilación N-terminal implica la adición y eliminación de diversos azúcares de monosacáridos en los compartimentos de tanto el retículo endoplasmático (RE) como el aparato de Golgi (Kornfeld *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 54: 631-664, 1985). En el RE, la glicosilación unida a N va acompañada por el plegamiento de las glicoproteínas nacientes para dar su estructura nativa a través de interacciones con chaperonas moleculares (Ellgaard *et al.*, Science 286: 1882-1888, 1999; Jakob *et al.*, J. Cell Biol. 142: 1223-1233, 1998). Este proceso se ha denominado control de calidad del RE, y si se bloquea el proceso debido a una proteína mal plegada, normalmente se produce el comienzo de la degradación asociada al RE, o ERAD, de la proteína (Ellgaard *et al.*, Curr. Opin. Cell Biol. 13: 431-437, 2001; Sifers, Science 299: 1330-1331, 2003; Oda *et al.*, Science 299: 1394-1397, 2003; Molinari *et al.*, Science 299: 1397-1400, 2003; Hurlley *et al.*, Ann. Rev. Cell Biol. 5: 277-307, 1989). Se ha mostrado que la eliminación de un azúcar manosa terminal desde Man₉ hasta Man₈ por la enzima alfa 1,2 manosidasa I (MAN1C1) afecta al comienzo de la respuesta de ERAD (Liu *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 5861-5867, 1999; Grinna *et al.* J. Biol. Chem. 255, 2255-2258, 1980).

50 En vista de la toxicidad de inductores de la producción de proteína tales como butirato de sodio, existe una necesidad de otros medios de aumento de la producción global de proteínas recombinantes en cultivo celular.

El documento WO 00/65070 A2 da a conocer un método para producir una glicoproteína en el que se cultivan células huésped que expresan dicha glicoproteína en presencia de un factor que modifica el estado de crecimiento en un cultivo celular, un catión de metal divalente o un componente plasmático. Se sugiere que las células huésped

deben expresar también enzimas que proporcionan las reacciones de modificación postraduccional apropiadas, entre otras alfa-1,2-manosidasa.

5 En el documento WO 2004/081201 A1, se da a conocer la expresión de una glucosidasa II mutante en combinación con alfa-1,2-manosidasa en *Trichoderma reesei*. La expresión de la glucosidasa II mutante aumenta la secreción de proteínas en las células. La expresión simultánea de alfa-1,2-manosidasa pretende proporcionar un perfil de glicosilación de tipo humano.

Ninguno de estos documentos da a conocer o sugiere que la sobreexpresión de alfa-1,2-manosidasa en una célula huésped aumente eficazmente la cantidad de una glicoproteína que se produce en dicha célula huésped.

Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a un método de aumento de la producción de una glicoproteína de interés en una célula huésped aislada que se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar dicha glicoproteína de interés, comprendiendo dicho método aumentar en dicha célula huésped la expresión de alfa 1,2-manosidasa (MAN1C1) que es nativa para dicha célula huésped.

15 En una realización preferida de la invención, la célula huésped usada en el método de la invención se transfecta con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para MAN1C1 operativamente unido a una secuencia de control de la expresión heteróloga. En otra realización preferida, la célula huésped comprende una secuencia de control de la expresión heteróloga que está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para MAN1C1.

20 En una realización preferida adicional, la célula huésped se ha transfectado con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para dicha glicoproteína de interés operativamente unido a una secuencia de control de la expresión heteróloga. En otra realización preferida, la célula huésped comprende una secuencia de control de la expresión heteróloga operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para dicha glicoproteína de interés.

25 El método de la invención puede usarse para producir cualquier glicoproteína o proteína de interés. Preferiblemente, la glicoproteína es una molécula estimulante de la eritropoyesis, tal como eritropoyetina o darbepoetina, o análogos, variantes o derivados de la misma. En una realización preferida de la invención, la glicoproteína es la eritropoyetina de SEQ ID NO:3 o la darbepoetina de SEQ ID NO:5.

En una realización preferida adicional de la invención, la célula huésped es una célula CHO, una célula humana, una célula BHK, una célula NS/0 o una célula HT-1080.

30 La presente invención puede usar células huésped modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar alfa 1,2 manosidasa (MAN1C1) y una glicoproteína o proteína de interés. Tales células huésped pueden comprender una secuencia de control de la expresión heteróloga operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para MAN1C1, y una secuencia de control de la expresión heteróloga operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para tal glicoproteína. Las células huésped pueden modificarse por ingeniería genética para sobreexpresar cualquiera de o tanto MAN1C1 como la glicoproteína de interés mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo transfección con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para la proteína, estando el
35 ácido nucleico operativamente unido a una secuencia de control de la expresión heteróloga, o transfección con una secuencia de control de la expresión que regula por incremento la expresión de proteína endógena.

40 Se contempla además que una célula huésped de este tipo exprese la proteína MAN1C1 a un nivel que aumenta la cantidad (pg/mg de proteína) o productividad específica (pg/célula/día) de tal glicoproteína producida. Las mejoras en tal producción de glicoproteína o productividad específica pueden ser, por ejemplo, de al menos 2 veces, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ó 20 veces o superiores.

45 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones a modo de ejemplo de la invención, se facilitan a modo de ilustración sólo, porque diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta la productividad específica de rHuBPO medida (Qp) a lo largo de un cultivo de 5 días en presencia de butirato de sodio.

50 La figura 2A muestra el efecto del tratamiento con ARNip de MAN1C1 sobre rHuEPO Qp en presencia de butirato de sodio a lo largo de un periodo de 5 días. La figura 2B presenta el cambio en veces en los niveles de ARNm de

MAN1C1 en células HT1080 tratadas con butirato de sodio o butirato de sodio más ARNip.

La figura 3 presenta los cambios en los niveles de ARNm de rHuEPO en células HT1080 tratadas con butirato de sodio en presencia y ausencia de ARNip dirigido contra MAN1C1.

5 La figura 4 presenta los cambios en la productividad específica de rHuEPO tras la transfección transitoria con cantidades variables de ADN de MAN1C1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para aumentar la producción recombinante de una proteína de interés en células huésped. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína de interés" es una proteína (distinta de MAN1C1) para la que se desea la producción recombinante de cantidades a granel de tal proteína.

10 La expresión de niveles superiores de MAN1C1 da como resultado mejoras en la productividad específica y/o producción de proteína de la proteína de interés.

15 La invención también contempla la mejora de la producción de proteína o el aumento de la productividad específica que implica el aumento de los niveles de actividad de MAN1C1 en células huésped a través de la introducción de inductores químicos que aumentan la producción de proteína MAN1C1, o inductores químicos que aumentan la actividad específica de la MAN1C1 expresada.

La invención contempla métodos en los que la productividad específica mejorada mide al menos 2 pg de glicoproteína/célula/día. En realizaciones a modo de ejemplo, la productividad específica mide al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 pg de glicoproteína/célula/día. Sin embargo, se contempla una productividad específica mayor, especialmente con el uso de inductores adicionales.

20 La presente invención determinó que un mecanismo mediante el cual el butirato de sodio aumenta la producción de proteína es a través de la regulación por incremento de la expresión de MAN1C1, un gen implicado en la glicosilación de proteínas. Los datos descritos en el presente documento muestran que altos niveles de expresión de MAN1C1 no alteran significativamente la glicosilación de glicoproteínas sino que aumentan inesperadamente la cantidad de proteína recombinante producida. Se mostró que la expresión de ARNm de MAN1C1 aumenta drásticamente cuando se tratan las células con butirato de sodio, hasta aproximadamente 10 veces superior a lo largo de un periodo de 24 horas y más de 40 veces a lo largo de un periodo de cinco días. El tratamiento de células huésped que expresan una proteína recombinante de interés con ARNip para reducir la expresión de proteína MAN1C1 redujo en un 50% el aumento inducido por butirato de sodio. Más específicamente, la presente invención proporciona un método de aumento de la producción de una glicoproteína de interés en células huésped que se han modificado por ingeniería genética para sobreexpresar dicha glicoproteína de interés, comprendiendo dicho método aumentar en dicha célula huésped la expresión de alfa 1,2-manosidasa (MAN1C1) que es nativa para dicha célula huésped.

35 Producción de la proteína de interés. Además, la sobreexpresión de MAN1C1 en ausencia de butirato de sodio dio como resultado un aumento de 2-3 veces en la producción de la proteína de interés. Por tanto, el aumento de la expresión de MAN1C1 contribuye al aumento en la productividad específica de la proteína de interés.

El término "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico de la invención que está libre de al menos un ácido nucleico contaminante con el que está asociado de manera natural. Un "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o ARN, que incluye opcionalmente bases artificiales o análogos de bases.

40 El término "identidad" (o "tanto por ciento idéntico") es una medida del tanto por ciento de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si hay alguno) abordada mediante un programa informático o modelo matemático particular (es decir, "algoritmos"). El término "similitud" es un concepto relacionado pero, en contraposición a "identidad", incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustituciones conservativas. La identidad y similitud de polipéptidos y moléculas de ácido nucleico relacionadas pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para proporcionar la coincidencia más larga entre las secuencias sometidas a prueba. Se describen métodos para determinar la identidad y similitud en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos a modo de ejemplo para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acids. Res. 12: 387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, citado anteriormente). También puede usarse el algoritmo de Smith-Waterman bien conocido para determinar la identidad. Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias

polipeptídicas incluyen los siguientes: algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970, matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992); penalización por huecos: 12, penalización por longitud de huecos: 4, umbral de similitud: 0. El programa GAP es útil con los parámetros anteriores (junto con ausencia de penalización para huecos de extremos). Los parámetros preferidos para comparaciones de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes: algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48 443-453, 1970; coincidencias con la matriz de comparación=+10, apareamiento erróneo=0, penalización por huecos: 50, penalización por longitud de huecos: 3. El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los expertos en la técnica pueden usar otros algoritmos, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc. a modo de ejemplo.

El término “operativamente unido” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la expresión de la secuencia de control dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

La frase “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, normalmente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no otras secuencias. La rigurosidad de la hibridación está determinada principalmente por la temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tales como formamida. Ejemplos de “condiciones altamente rigurosas” para hibridación y lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50% a 42°C. Véanse Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); (1989) y Anderson *et al.*, Nucleic acid Hybridisation: Hybridization: a practical approach, cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Limited, Oxford, Inglaterra (1999). Ejemplos de condiciones “moderadamente rigurosas” típicas son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 50-65°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 20% a 37-50°C. A modo de ejemplo, una condición “moderadamente rigurosa” de 50°C en ión sodio 0,015 M permitirá aproximadamente un 21% de apareamiento erróneo.

Los expertos en la técnica apreciarán que no hay ninguna distinción absoluta entre condiciones “altamente” y “moderadamente” rigurosas. Por ejemplo, a ión sodio 0,015 M (sin formamida), la temperatura de fusión de ADN largo perfectamente coincidente es de aproximadamente 71°C. Con un lavado a 65°C (a la misma fuerza iónica), esto permitiría aproximadamente un 6% de apareamiento erróneo. Para capturar secuencias relacionadas más distantes, un experto en la técnica puede simplemente reducir la temperatura o elevar la fuerza iónica.

El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) usada para transferir información codificante a una célula huésped.

El término “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para su uso en una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácido nucleico deseadas (“secuencias de control de la expresión”). Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores constitutivos o inducibles o regulables, potenciadores o una serie de sitios de unión a factores de transcripción. “Expresión” incluye, pero no se limita a, procesos que conducen a la producción de proteína tal como transcripción, traducción y corte y empalme del ARN, si están presentes intrones.

Una secuencia de control de la expresión “heteróloga” operativamente unida a un ácido nucleico se refiere a una secuencia de control de la expresión que está operativamente unida a un ácido nucleico (incluyendo un gen) que es diferente del gen al que la secuencia de control de la expresión está operativamente unida normalmente en su estado nativo.

El término “célula huésped” se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o que puede transformarse con una secuencia de ácido nucleico y luego expresar un gen de interés seleccionado. El término incluye la progenie de la célula original, ya sea la progenie idéntica o no en morfología o en constitución genética al antecesor original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

Tal como se usa en el presente documento, una célula huésped “modificada por ingeniería genética para sobreexpresar” una proteína (o un ácido nucleico que codifica para tal proteína) es una célula huésped, incluyendo un descendiente de la misma, que se ha alterado de una forma tal que se expresan niveles superiores a los normales de tal proteína, en comparación con la célula huésped no alterada. Por tanto, se incluye dentro de esta categoría la expresión de proteínas foráneas para la célula huésped, proteínas que no se expresan de manera natural por la célula huésped o proteínas expresadas de manera natural por la célula huésped a niveles relativamente bajos que aumentan tras la alteración de la célula huésped.

Los encabezamientos de secciones se usan en el presente documento para fines de organización sólo, y no debe interpretarse que limitan de ningún modo la materia descrita.

Aumento de la actividad alfa 1,2-manosidasa (MAN1C1)

La invención contempla que puede lograrse el aumento de los niveles de actividad alfa 1,2-manosidasa (MAN1C1) en células huésped durante la producción de una proteína de interés a través de cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo la adición de un inductor químico o a través de sobreexpresión de la enzima MAN1C1. La enzima MAN1C1 que la célula huésped sobreexpresa puede tener la misma secuencia que o una secuencia similar a MAN1C1 que es endógena, o nativa, para la célula huésped. Por tanto, puede sobreexpresarse MAN1C1 humana en células huésped humanas, puede sobreexpresarse MAN1C1 de CHO en células huésped CHO, y de manera similar puede sobreexpresarse enzima nativa que porta la función MAN1C1 en otras células huésped. Sin embargo, puede usarse cualquier enzima MAN1C1 que funcione del mismo modo en la célula huésped deseada, incluyendo un ortólogo, o un fragmento, variante, análogo o derivado biológicamente activo.

Tal como se usa en el presente documento, "análogo" se refiere a una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene inserciones, deleciones o sustituciones en relación con la secuencia original, aunque todavía mantiene sustancialmente la actividad biológica de la secuencia original, tal como se determina usando ensayos biológicos conocidos por un experto en la técnica. "Variantes" incluyen variantes alélicas que se producen de manera natural, variantes de corte y empalme o formas polimórficas de la secuencia original. Los "derivados" de polipéptidos variantes o análogos que se producen de manera natural incluyen los que se han modificado químicamente, por ejemplo, para unirse a polímeros solubles en agua (por ejemplo, polietilenglicol), radionúclidos u otros restos terapéuticos o de direccionamiento o de diagnóstico, cualquiera de los cuales puede unirse directa o indirectamente a través de ligadores.

"Biológicamente activo" con respecto a un polipéptido de MAN1C1 significa que el fragmento, variante, derivado o análogo del mismo conserva una actividad similar en la mejora de la productividad específica, por ejemplo tal como se mide como la cantidad de proteína de interés producida por célula al día, o conserva una actividad enzimática similar en la eliminación de manosa de un sustrato que contiene manosa adecuado. "Biológicamente activo" con respecto a un ácido nucleico de MAN1C1 significa que el ácido nucleico codifica para un polipéptido de MAN1C1 biológicamente activo de este tipo.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una MAN1C1 humana a modo de ejemplo se exponen en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Los nucleótidos 331 a 2223 del polinucleótido de SEQ ID NO: 1 codifican para el polipéptido de MAN1C1 de SEQ ID NO: 2. Las secuencias de nucleótidos y polipeptídicas para MAN1C1 humana (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, se identificaron por Tremblay *et al.* (J. Biol. Chem. 275: 31655-31660, 2000) y se proporcionan en el n.º de registro de Genbank: AF261655. Se identifican secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas a modo de ejemplo de otros ortólogos y variantes de MAN1C1 en los n.ºs de registro de Genbank AB209275 (SEQ ID NO: 12 y 13) y DV567987 (SEQ ID NO: 14).

El término "MAN1C1" tal como se usa en el presente documento se refiere a MAN1C1 humana (el polipéptido de SEQ ID NO: 2 codificado por el polinucleótido de SEQ. ID NO: 1), ortólogos de la misma, o un fragmento, variante, análogo o derivado biológicamente activo de la enzima humana u ortólogos. Los análogos a modo de ejemplo conservan el 65% o una identidad de aminoácidos superior con la secuencia original, o el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% o una identidad superior. Los fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos de al menos 25, 50, 75, 100 o más residuos de aminoácido de un polipéptido de MAN1C1. Otros fragmentos, variantes, análogos o derivados de MAN1C1 a modo de ejemplo incluyen los codificados por ácidos nucleicos que se hibridarían en condiciones alta o moderadamente rigurosas con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o cualquier otro ortólogo de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico de MAN1C1" o "polinucleótido de MAN1C1" se refiere a un ácido nucleico que codifica para cualquiera de los polipéptidos anteriores, incluyendo una secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, o ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos aproximadamente el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% idénticas a la misma, o ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones moderada o altamente rigurosas tal como se define en el presente documento con el complemento de SEQ ID NO: 1 o cualquier otro ortólogo de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

También se entiende que los ácidos nucleicos de MAN1C1 incluyen variantes alélicas o de corte y empalme de un ácido nucleico de MAN1C1 de SEQ ID NO: 1 o cualquier otro ortólogo, e incluyen secuencias de nucleótidos que son complementarias a cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores.

Cuando se ha identificado un gen que codifica para un polipéptido de MAN1C1 de una especie, puede usarse todo o una parte de ese gen como sonda o cebador para identificar genes correspondientes de otra especie (ortólogos, u "homólogos de especie") o genes relacionados de la misma especie (homólogos). Las sondas o los cebadores pueden usarse para el examen por hibridación o la amplificación por PCR de bibliotecas de ADN genómico o ADNc de diversas fuentes de tejido que se cree que expresan el gen de MAN1C1. Un experto habitual en la técnica puede

- determinar las condiciones apropiadas de rigurosidad de la hibridación. También pueden usarse técnicas bioinformáticas para identificar ortólogos, en las que se examinan colecciones de secuencias de diversas especies de mamíferos u otras para detectar secuencias de nucleótidos o polipeptídicas que presentan homología significativa con secuencias de MAN1C1 conocidas. También pueden identificarse ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de MAN1C1 mediante clonación de expresión que emplea la detección de clones positivos basándose en una propiedad de la proteína expresada. Normalmente, se examinan bibliotecas de ácido nucleico mediante la unión de un anticuerpo u otra pareja de unión (por ejemplo, receptor o ligando) a proteínas clonadas que se expresan y se presentan sobre la superficie de una célula huésped. El anticuerpo o pareja de unión se modifica con un marcador detectable para identificar las células que expresan el clon deseado.
- 5
- 10 Aunque la invención contempla principalmente que se sobreexpresará MAN1C1, es decir, se expresará en la célula huésped alterada a un nivel mayor que el normal en la célula huésped no alterada, la invención también contempla métodos para disminuir o inhibir la expresión de MAN1C1 en células, por ejemplo a través de la administración de ARNip o compuestos antisentido.

Inductores de la producción de proteína

- 15 La invención también contempla el uso de otros inductores conocidos de la producción de proteína en combinación con las células huésped que sobreexpresan MAN1C1 y otra proteína de interés, para aumentar adicionalmente la producción global de la proteína de interés. Los inductores conocidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes compuestos: N-acetil-L-cisteína, actinomicina D, 7-amino-, Bafilomicina A1, *Streptomyces griseus*, calfofina C, *Cladosporium cladosporioides*, camptotecina, *Camptotheca acuminata*, CAPE, 2-cloro-2'-desoxiadenosina, 5'-trifosfato de 2-cloro-2'-desoxiadenosina, sal de tetralitio, cicloheximida, ciclofosfamida monohidrata, ciclosporina, *Trichoderma polysporum*, daunorubicina, clorhidrato, dexametasona, doxorubicina, clorhidrato, (-)-galato de epigalocatequina, etopósido, fosfato de etopósido, ET-18-OCH3, 5-fluorouracilo, H-7, diclorhidrato, genisteína, 4-hidroxinonenal, 4-hidroxifenilretinamida, hidroxiourea, inhibidor de IL-1 β , (6)-S-nitroso-N-acetilpenicilamina, S-nitrosoglutatión, 12-miristato-13-acetato de forbol, puomicina, diclorhidrato, ácido 1-pirrolidincarboditioico, sal de amonio, quercetina, dihidratada, rapamicina, butirato de sodio, 4-fenilbutirato de sodio, D-eritro-esfingosina, N-acetil-, D-eritro-esfingosina, N-octanoil-, estaurosporina, *Streptomyces sp.*, sulindaco, tapsigargina, TRAIL, *E. coli*, tricostatina A, *Streptomyces sp.*, (6)-verapamilo, clorhidrato, veratridina, vitamina D3, 1 α , 25-dihidroxi- y succinato de vitamina E (VWR y Calbiochem).
- 20
- 25

- 30 La invención contempla además la identificación de otros productos químicos que mejoran la producción de proteína a través del aumento de la actividad de MAN1C1, por ejemplo mediante el aumento de la expresión de MAN1C1. Pueden determinarse aumentos en la actividad de MAN1C1 tal como se describe por Tremblay *et al.* (2000, citado anteriormente).

- Pueden determinarse aumentos en la expresión de MAN1C1 midiendo cantidades relativas de ARNm de MAN1C1 producido tal como se describe en el ejemplo 4 (usando el chip Affymetrix) o el ejemplo 5 (PCR cuantitativa), o proteína MAN1C1 producida mediante ELISA, HPLC o otros métodos conocidos en la técnica tal como se describe por Tremblay *et al.* (2000, citado anteriormente).
- 35

Proteínas de interés para producción recombinante

- 40 La proteína de interés recombinante que la célula huésped sobreexpresa puede ser cualquier polipéptido, o bien endógeno (nativo) o bien exógeno para la célula. Proteínas de interés a modo de ejemplo son glicoproteínas, incluyendo glicoproteínas secretadas. En realizaciones a modo de ejemplo, la glicoproteína de interés es una molécula estimulante de la eritropoyesis, descrita a continuación.

- 45 La cantidad de proteína de interés recombinante producida puede medirse como "productividad específica", que es la cantidad de proteína de interés producida por célula al día. La cantidad de proteína de interés recombinante producida también puede medirse mediante la cantidad de proteína de interés producida por cantidad de proteína celular. Se conocen bien en la técnica métodos de medición de la productividad específica o producción de proteína.

- 50 Las proteínas de interés recombinantes para las que puede aumentarse la expresión usando los materiales y métodos de la invención pueden ser cualquier polipéptido, o bien endógeno o bien exógeno para la célula. Proteínas de interés recombinantes a modo de ejemplo son glicoproteínas, especialmente glicoproteínas N-glicosiladas. Las glicoproteínas de interés a modo de ejemplo incluyen glicoproteínas secretadas tales como moléculas estimulantes de la eritropoyesis.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

El término "moléculas estimulantes de la eritropoyesis" tal como se usa en el presente documento incluye eritropoyetina humana (SEQ. ID NO.: 3) o una variante, derivado o análogo biológicamente activo de la misma,

incluyendo un derivado modificado químicamente de tal proteína o análogo. Los aminoácidos 1 a 165 de SEQ ID NO: 3 constituyen la proteína madura. Otra molécula estimulante de la eritropoyesis a modo de ejemplo es la darbepoetina (SEQ ID NO: 5). Los aminoácidos 1 a 165 de SEQ. ID NO: 5 constituyen la proteína madura. También se contemplan análogos de eritropoyetina (SEQ ID NO.: 3) o darbepoetina (SEQ. ID NO: 5), con el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad con SEQ. ID NO: 3 o SEQ. ID NO: 5, respectivamente, y que conservan todavía actividad eritropoyética.

Se describen secuencias a modo de ejemplo, la fabricación, purificación y el uso de eritropoyetina humana recombinante en varias publicaciones de patente, incluyendo pero sin limitarse a la patente estadounidense 4.703.008 concedida a Lin y Lai *et al.* patente estadounidense 4.667.016, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. La darbepoetina es un análogo de eritropoyetina hiperglicosilado que tiene cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de rHuEPO que proporcionan dos cadenas de hidrato de carbono adicionales. Más específicamente, la darbepoetina contiene dos cadenas de hidrato de carbono unidas en N adicionales en los residuos de aminoácido 30 y 88 de SEQ ID NO: 5. Se describen secuencias a modo de ejemplo, la fabricación, purificación y el uso de darbepoetina y otros análogos de eritropoyetina en varias publicaciones de patente, incluyendo Strickland *et al.*, 91/05867, Elliott *et al.*, documento WO 95/05465, Egrie *et al.*, documento WO 00/24893 y Egrie *et al.* documento WO 01/81405, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Los derivados de polipéptidos análogos o que se producen de manera natural incluyen los que se han modificado químicamente, por ejemplo, para unir polímeros solubles en agua (por ejemplo, pegilado), radionúclidos u otros restos terapéuticos o de direccionamiento o de diagnóstico.

El término "actividad eritropoyética" significa la actividad para estimular la eritropoyesis tal como se demuestra en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, el ensayo de ratón policitémico exhipóxico. Véase, por ejemplo, Cotes y Bangham, Nature 191:1065 (1961).

Otros polipéptidos de interés para los que puede aumentarse la producción recombinante usando los materiales y métodos de la invención incluyen citocinas, proteínas de tipo inmunoglobulina, anticuerpos y peptidocuerpos, y análogos, variantes o derivados de cualquiera de estas proteínas.

Las proteínas de interés a modo de ejemplo incluyen factor estimulante de las colonias de granulocitos (GCSF), factor de células madre, leptina, hormonas, citocinas, factores hematopoyéticos, factores de crecimiento, factores antiobesidad, factores tróficos, factores antiinflamatorios, receptores o receptores solubles, tales como un fragmento soluble de p80 TNF-R, enzimas y fusiones de Fc de cualquiera de los anteriores. Otros ejemplos incluyen insulina, gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), motilina, interferones (alfa, beta, gamma), interleucinas (IL-1 a IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión a factor de necrosis tumoral (TNF-bp) o receptor de TNF I o II, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico 3 (NT3), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento neurotrófico (NGF), factores de crecimiento óseos tales como osteoprotegerina (OPG), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de megacariocitos (MGDF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), trombopoyetina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PGDF), factores de crecimiento estimulantes de colonias (CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa (SOD), activador del plasminógeno tisular (TPA), urocinasa, estreptocinasa o calicreína, receptores o receptores solubles, enzimas, variantes, derivados o análogos incluyendo fusiones de Fc de cualquiera de estas proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), maxicuerpo y fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos), que comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anteriores siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Anticuerpos a modo de ejemplo son Herceptin® (trastuzumab), un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2); y Rituxan® (rituximab), un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico diseñado por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos. Otros anticuerpos a modo de ejemplo incluyen Avastin® (bevacizumab), Bexxar® (tositumomab), Campath® (alemtuzumab), Erbitux® (cetuximab), Humira® (adalimumab), Raptiva® (efalizumab), Remicade® (infliximab), ReoPro® (abciximab), Simulect® (basiliximab), Synagis® (palivizumab), Xolair® (omalizumab), Zenapax® (cacilizumab), Zevalin® (ibritumomab tiuxetan) o Milotarg® (gemtuzumab ozogamicina), receptores o receptores solubles, enzimas, variantes, derivados o análogos de cualquiera de estos anticuerpos.

Se describen en general peptidocuerpos, moléculas que comprenden un dominio Fc de anticuerpo unido a al menos un

péptido de unión a antígeno, en la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000. Las proteínas de tipo inmunoglobulina, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, contienen uno o más dominios de tipo inmunoglobulina que se pliegan en estructuras similares a partes de la región variable de anticuerpos.

Modificación por ingeniería genética de células huésped para sobreexpresar proteína

5 Pueden modificarse por ingeniería genética células huésped para sobreexpresar una proteína de una variedad de modos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a inserción de ácido nucleico exógeno que codifica para la proteína deseada, opcionalmente como parte de un vector de expresión, inserción de una secuencia de control de la expresión exógena de manera que provoca un aumento de la expresión del gen endógeno de la célula huésped que codifica para la proteína deseada, o activación de la(s) secuencia(s) de control de la expresión
10 endógena(s) de la célula huésped para aumentar la expresión de un gen endógeno que codifica para la proteína deseada.

Pueden prepararse cultivos de células huésped según cualquier método conocido en la técnica, y se conocen en la técnica métodos de crecimiento de tales células huésped y recuperación de proteína recombinante producida por las células, ya sea a partir de las células o del medio de cultivo. Tales métodos de cultivo pueden implicar la adición de
15 inductores químicos de la producción de proteína al medio de cultivo. Se describen a continuación células huésped y procedimientos a modo de ejemplo.

Puede insertarse un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de MAN1C1 en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. Los vectores de expresión pueden incluir opcionalmente un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una
20 secuencia que codifica para una secuencia señal o líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y/o un elemento de marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se comenta a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica para una "etiqueta", es decir, una secuencia oligonucleotídica ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica para el polipéptido de MAN1C1, la molécula de oligonucleótido codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus influenza) o myc para las que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la
25 detección o purificación por afinidad del polipéptido de MAN1C1 de la célula huésped.

Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se apreciará que el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Puede transferirse ácido nucleico a células huésped mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo a través de transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo de ligando-ADN), electroporación, microinyección de
35 ADN, fusión celular, DEAE-dextrano, cloruro de calcio, precipitación con fosfato de calcio, bombardeo de micropartículas, infección con vectores virales, lipofección, transfección o recombinación homóloga.

La invención también contempla el uso de recombinación homóloga u otros métodos de producción recombinantes utilizando elementos de control introducidos en células que ya contienen ADN que codifica para polipéptidos de MAN1C1. Por ejemplo, pueden usarse métodos de recombinación homóloga para modificar una célula que contiene un gen de MAN1C1 normalmente silencioso transcripcionalmente, o un gen subexpresado, y de ese modo producir una célula que expresa cantidades terapéuticamente eficaces de polipéptidos MAN1C1. La recombinación homóloga es una técnica originalmente desarrollada para seleccionar como diana genes para inducir o corregir mutaciones en genes transcripcionalmente activos (Kucherlapati, Prog. Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36: 301, 1989). La técnica básica se desarrolló como un método para introducir mutaciones específicas en regiones específicas del genoma de mamíferos (Thomas *et al.*, Cell 44: 419-428, 1986; Thomas *et al.*, Cell 51:503-512, 1987; Doetschman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8583-8587, 1988) o para corregir mutaciones específicas dentro de genes defectuosos (Doetschman *et al.*, Nature 330: 576-578, 1987). Se describen técnicas de recombinación homóloga a modo de ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.272.071 (documento EP 9193051, publicación EP n.º 505500; documento PCT/US90/07642, publicación internacional No. WO 91/09955).

A través de recombinación homóloga, la secuencia de ADN que va a insertarse en el genoma puede dirigirse a una región específica del gen de interés uniéndola a ADN de direccionamiento. El ADN de direccionamiento es una secuencia de nucleótidos que es complementaria (homóloga) a una región del ADN genómico. Pequeños trozos de ADN de direccionamiento que son complementarios a una región específica del genoma se ponen en contacto con la hebra original durante el proceso de replicación del ADN. Es una propiedad general del ADN que se ha insertado en una célula que se hibride, y por tanto, se recombine con otros trozos de ADN endógeno a través de regiones homólogas compartidas. Si esta hebra complementaria se une a un oligonucleótido que contiene una mutación o una secuencia diferente o un nucleótido adicional, también se incorpora en la hebra recién sintetizada como

resultado de la recombinación. Como resultado de la función de corrección de lectura, es posible que la nueva secuencia de ADN sirva como molde. Por tanto, el ADN transferido se incorpora en el genoma.

Unidas a estos trozos de ADN de direccionamiento hay regiones de ADN que pueden interactuar con o controlar la expresión de un polipéptido de MAN1C1, por ejemplo, secuencias flanqueantes. Por ejemplo, se inserta un promotor y/o elemento potenciador, o un elemento modulador de la transcripción exógeno, que incluye opcionalmente un intrón, en el genoma de la célula huésped prevista en proximidad y orientación suficientes para influir en la transcripción de ADN que codifica para el polipéptido de MAN1C1 deseado. El elemento de control controla una parte del ADN presente en el genoma de la célula huésped. Por tanto, la expresión de polipéptido de MAN1C1 puede lograrse no sólo mediante transfección de ADN que codifica para el propio gen de MAN1C1, sino en su lugar mediante el uso de ADN de direccionamiento (que contiene regiones de homología con el gen de interés endógeno) acoplado con segmentos reguladores de ADN que proporcionan a la secuencia génica endógena señales reconocibles para la transcripción de un polipéptido de MAN1C1.

En una realización a modo de ejemplo, se introduce ADN que incluye al menos una secuencia reguladora, un exón y un sitio donador de corte y empalme en el ADN cromosómica de una manera tal que se produce una nueva unidad de transcripción (en la que la secuencia reguladora, el exón y el sitio donador de corte y empalme presentes en el constructo de ADN están operativamente unidos al gen endógeno).

La sobreexpresión, tal como se describe en el presente documento, abarca la activación de un gen (o provocar que se exprese) que normalmente es silencioso (no se expresa) en la célula tal como se obtiene, así como el aumento de la expresión de un gen que no se expresa a niveles fisiológicamente significativos en la célula tal como se obtiene.

Se conocen en la técnica sistemas de recombinación específicos de sitio tales como Cre/loxP, FLP/FRT (Sauer, Curr. Opin. Biotechnol. 521-527, 1994; Sauer, Met Enzymol. 225: 890-900, 1993).

Un enfoque adicional para aumentar, o provocar, la expresión de polipéptido de MAN1C1 a partir del gen de MAN1C1 endógeno de una célula implica aumentar la expresión de factores de transcripción que regulan por incremento la expresión del gen y/o disminuir la expresión de represores transcripcionales que regulan por disminución la expresión del gen, de una manera que da como resultado la producción de polipéptido de MAN1C1 aumentada o *de novo* a partir del gen de MAN1C1 endógeno de la célula.

Por tanto, la invención contempla células huésped en las que se ha insertado ácido nucleico que codifica para MAN1C1, de manera opcional operativamente unido a una secuencia de control de la expresión, y opcionalmente como parte de un vector de expresión. La invención también contempla células huésped en las que se ha insertado una secuencia de control de la expresión heteróloga de una manera tal que se aumenta la expresión de MAN1C1, incluyendo células huésped en las que el gen de MAN1C1 nativo está operativamente unido a una secuencia de control de la expresión heteróloga.

Puede usarse cualquier célula huésped o huéspedes conocidos en la técnica para la producción de proteína recombinante, incluyendo células de levaduras, células vegetales, plantas, células de insectos y células de mamíferos, y animales transgénicos. Las células de levaduras a modo de ejemplo incluyen *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*, y *Saccharomyces* por ejemplo *S. cerevisiae*, así como *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *K. Zactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickeramii*, *K. waltii*, *K. drosophilorum*, *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *K. yarrowia*; *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Totipocladium*, *Aspergillus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Las células de insectos a modo de ejemplo incluyen *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*, y *Drosophila*. Las células de mamíferos a modo de ejemplo incluyen variedades de células CHO, BHK, HEK-293, NS0, YB2/3, SP2/0 y humanas tales como PER-C6 o HT1080, así como VERO, HeLa, COS, MDCK, NIH3T3, Jurkat, Saos, PC-12, HCT 116, L929, Ltk-, WI38, CV1, TM4, W138, Hep G2, MMT, una línea celular leucémica, célula madre embrionaria u óvulo fertilizado.

Métodos de cultivo y producción de polipéptido

La invención también proporciona métodos para cultivar, es decir, hacer crecer, células huésped en condiciones que aumentan la expresión de proteína MAN1C1 y dan como resultado un aumento de la productividad específica o producción de proteína de cualquiera de las proteínas de interés recombinantes descritas en el presente documento. Tales métodos pueden incluir además la etapa de recuperar la proteína de interés recombinante producida de las células huésped o el medio de cultivo.

Cuando la proteína de interés recombinante se secreta al medio, puede recogerse el medio periódicamente, de modo que pueden usarse las mismas células huésped a través de varios ciclos de recogida. En realizaciones a modo de ejemplo, se incuban células huésped que producen moléculas estimulantes de la eritropoyesis en tres

ciclos de recogida discontinuos diferenciados. Para cada ciclo, se recoge el medio y se reemplaza por medio nuevo que reemplaza al medio recogido. El primer ciclo puede ser, por ejemplo, de 8 días; el segundo ciclo, por ejemplo, de 7 días; y el tercer ciclo, por ejemplo, de 5 días de duración.

5 Se conocen en la técnica una variedad de sistemas de cultivo, incluyendo frascos T, frascos centrifugadores y agitadores, botellas rotatorias y biorreactores de tanque con agitación. El cultivo en botellas rotatorias se lleva a cabo generalmente sembrando células en botellas rotatorias que están parcialmente llenas (por ejemplo, hasta el 10-30% de su capacidad) con medio y haciéndolas rotar lentamente, permitiendo que las células se adhieran a los lados de las botellas y crezcan hasta la confluencia. Se recoge el medio celular decantando el sobrenadante, que se reemplaza por medio nuevo. También pueden cultivarse células dependientes de anclaje sobre un microportador, por ejemplo esferas poliméricas, que se mantienen en suspensión en biorreactores de tanque con agitación. Alternativamente, las células pueden hacerse crecer en una suspensión de células individuales.

15 Puede añadirse medio de cultivo en un procedimiento discontinuo, por ejemplo en el que se añade medio de cultivo una vez a las células en un único lote, o en un procedimiento de alimentación discontinua en el que se añaden periódicamente pequeños lotes de medio de cultivo. Puede recogerse el medio al final del cultivo o varias veces durante el cultivo. También se conocen en la técnica procedimientos de producción perfundidos de manera continua, e implican la alimentación continua de medio nuevo al cultivo, al mismo tiempo que se retira de manera continua el mismo volumen del reactor. Los cultivos perfundidos logran generalmente densidades celulares superiores que los cultivos discontinuos y pueden mantenerse durante semanas o meses con recogidas repetidas.

20 Las células huésped de la invención pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por el experto en la técnica. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Medios adecuados para cultivar células eucariotas son medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), medio esencial mínimo (MEM) y/o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), todos los cuales pueden complementarse con suero y/o factores de crecimiento tal como se indica por la línea celular particular que está cultivándose. Un medio adecuado para cultivos de insectos es el medio de Grace complementado con extracto de levaduras, hidrolizado de lactalbumina y/o suero de ternera fetal según sea necesario.

30 Normalmente, se añade un anticuerpo u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas como complemento para el medio. El compuesto que va a usarse estará dictado por el elemento de marcador seleccionable presente sobre el plásmido con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento de marcador seleccionable es resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina, geneticina y neomicina.

35 La cantidad de un polipéptido de MAN1C1 y la cantidad de proteína de interés recombinante deseada producida por una célula huésped pueden evaluarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de desplazamiento en gel de la unión a ADN. La invención también contempla que la productividad específica (expresada como pg/célula/día) de proteína de interés puede evaluarse usando métodos convencionales tal como se conoce en la técnica y tal como se describe en el presente documento.

40 Ejemplos

45 La presente invención se describe en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se ofrecen para ilustrar más completamente la invención, pero no debe interpretarse que limitan el alcance de la misma. Los ejemplos ilustran diversos métodos usados en la invención, tales como métodos de cultivo celular; cuantificación de HuEPO recombinante mediante RP-HPLC; análisis de la expresión génica usando chips Affymetrix; PCR en tiempo real cuantitativa de genes seleccionados; el uso de ARNip de MAN1C1; y clonación y expresión de MAN1C1. Los ejemplos también ilustran el efecto del butirato de sodio sobre la productividad específica de rHuEPO y la progresión del ciclo celular; el efecto del butirato de sodio sobre la expresión de MAN1C1; el efecto de ARN de interferencia pequeño (ARNip) de MAN1C1 sobre la productividad específica de rHuEPO; y el efecto de la sobreexpresión de MAN1C1 sobre la productividad específica de rHuEPO.

50 Las técnicas descritas en estos ejemplos representan técnicas descritas por los inventores que funcionan bien en la puesta en práctica de la invención, y como tales constituyen modos a modo de ejemplo para la puesta en práctica de la misma. Pueden hacerse muchos cambios en los métodos específicos que se dan a conocer y obtener todavía un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Tales variaciones están previstas como aspectos de la invención.

55 Ejemplo 1

Métodos de cultivo celular

Se usó una línea celular de fibrosarcoma de riñón humano, HT1080 (Rasheed *et al.*, Cancer 33. 1027-1033, 1974), transfectada con un plásmido para cDNA de EPO humana a lo largo de todos los experimentos descritos en los ejemplos expuestos a continuación. Se mantuvo una presión selectiva para la retención del plásmido transfectado con el antibiótico geneticina (Gibco). Se hicieron crecer las células como monocapas adheridas en frascos T ventilados (75 cm²) (Corning) a una densidad de inoculación de $2,1 \times 10^4$ células/cm² en un incubador humidificado con un 12% de CO₂ a 37°C. Se hicieron crecer las células durante 4-5 días en medio DMEM que contenía un 10% de suero complementado con 1X aminoácidos no esenciales, geneticina 5 mg/l y bicarbonato de sodio 1 5 g/l (todos de Gibco). Después de que las células alcanzaran la confluencia, se lavaron con PBS para eliminar el suero y se cambiaron a medio DMEM/F-12 1:1 libre de suero complementado con 1X aminoácidos no esenciales (Gibco), bicarbonato de sodio 1,5 g/l y glucosa 2 g/l durante un periodo de 5 a 7 días. Se trataron los cultivos experimentales con butirato de sodio 2 mM (Sigma) el mismo día que la adición de medio libre de suero.

Ejemplo 2

Cuantificación de HuEPO recombinante mediante RP-HPLC

Para determinar la cantidad de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) producida en medio de cultivo celular, se analizaron 200 µl de medio mediante HPLC de fase inversa. Se separaron las muestras sobre una columna de HPLC de estireno/divinilbenceno equipada con una precolumna (Polymer Labs) usando un gradiente lineal de desde el 30-65% de CH₃CN en TFA al 0,1% a lo largo de 17 minutos (Sigma). El tiempo de retención para rHuEPO expresada en cultivo celular era de aproximadamente 15,5 minutos y se correspondía con un patrón de rHuEPO purificada (Amgen Inc). Se cuantificaron las áreas de picos integradas de muestras desconocidas mediante comparación con una curva patrón de rHuEPO purificada.

Ejemplo 3

Análisis de la expresión génica usando el chip Affymetrix

Se estudió la expresión de genes en células HT1080 a lo largo de un periodo de 24 horas en presencia y ausencia de butirato de sodio usando microalineamientos de oligonucleótidos y el chip HU133A Affymetrix (Affymetrix). Se llevaron a cabo todos los experimentos según los protocolos de Affymetrix. Se analizaron un total de 24 chips, 12 de células tratadas con butirato de sodio y 12 controles. Se importaron en primer lugar los datos de expresión génica del software Affymetrix a GeneSpring® versión 6.0 y se normalizaron usando el procedimiento de normalización global del software. Los valores por debajo de 0,01 se fijaron a 0,01 y se dividió cada medición entre el percentil 50 de todas las mediciones para esa muestra. Entonces se dividió cada gen entre la mediana de sus mediciones en todas las muestras, y si la mediana de los valores sin procesar estaba por debajo de 10, entonces se dividió cada medición para ese gen entre 10. Entonces se agruparon los datos de muestras para cada chip por tipo de tratamiento (control o butirato de sodio) y por tiempo (3, 6, 12 y 24 horas). Se compararon los resultados de los datos de expresión con la lista de genes disponible públicamente de la alineamiento de ADNc del Consorcio para Glicómica funcional (chip génico GLYCOv2) para determinar genes presentes en cuatro categorías: degradación de glicanos, glicano transferasa, transporte de glicanos y nucleótidos de azúcar, tal como se define por la lista de genes del Consorcio.

Ejemplo 4

PCR en tiempo real cuantitativa de genes seleccionados

Se usó PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) con transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems Inc.) para verificar los cambios en la expresión de ARNm observados usando el chip Affymetrix. Se generaron sondas para MAN1C1 y rHuEPO usando el software Primer Express (Applied Biosystems Incorporated). MAN1C1: directo-GGA GCC CCA GAG CCA AGT (SEQ ID NO: 6); inverso-GCC AAG CAA ACT GCA TCA TCT (SEQ ID NO: 7); TaqMan-ECG AGC CCA GCG GGA GAA AAT CAX (E = 6-FAM; X = Tamra) (SEQ ID NO: 8). rHuEPO: directo-GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG AT (SEQ ID NO: 9); inverso-CCA GGC CCT GCC AGA CTT (SEQ ID NO: 10); TaqMan-EAG GTC GGG CAG CAG GCC GTX (E = 6-FAM; X = Tamra) (SEQ ID NO: 11). Se usó un instrumento ABI 7000 o 7900 (Applied Biosystems Inc.) para cada análisis con los siguientes parámetros de ciclación térmica; 1 ciclo a 50°C durante 30 min.; 1 ciclo a 95°C durante 10 min.; 40 ciclos a 94°C durante 15 s y 60°C durante 60 s. Se sometieron a ensayo muestras de ARN de al menos tres cultivos celulares independientes por triplicado para células tanto control como tratadas con butirato de sodio. Se normalizaron los valores de ciclo umbral (Ct) para todos los genes sometidos a prueba con respecto al gen de mantenimiento, GAPDH (Applied Biosystems Inc., parte n.º 4310884E), para corregir los errores en las concentraciones de ARN. Se notificaron los datos como o bien "cambio en veces" o bien "cambio en tanto por ciento" en los niveles de Ct para muestras tratadas con butirato de sodio en comparación con muestras control.

Ejemplo 5

ARNip de MAN1C1

Se hicieron crecer células HT1080 en matraces T ventilados de 75 cm² durante 4 días en medio DMEM que contenía un 10% de suero complementado con 1X aminoácidos no esenciales y bicarbonato de sodio 1,5 g/l (todos de Gibco).
 5 Después de que las células hubiesen alcanzado la confluencia, se lavaron 1X con PBS y entonces se trataron con o sin 50 µl de agente de transfección de amina siPORT™ más 60 µM de ARN inhibidor pequeño (ARNip) (Ambion) en 15 ml de medio DMEM que contenía un 10% de suero durante un periodo de 48 horas. Entonces se lavaron los cultivos con PBS para eliminar el suero y se cambiaron a 15 ml de medio DMEM:F12 libre de suero con o sin 50 µl de amina siPORT™ y ARNip 60 µM. Entonces se hicieron crecer los cultivos durante un periodo de 5 días en presencia y ausencia de butirato de sodio 2 mM. Se recogieron muestras de medios y se sometieron a ensayo los niveles de rHuEPO y ARNm en los días 1, 3 y 5 tras el cambio libre de suero.
 10

Ejemplo 6

Clonación y expresión de MAN1C1

Se usó un vector de entrada pENTR™221 que contenía la secuencia de ADNc de MAN1C1 (SEQ ID NO: 1) y sitios de recombinación *attL* flanqueantes (Invitrogen – ID de clon: IOH42767). Siguiendo el procedimiento de tecnología Gateway, se realizó la recombinación, usando LR Clonase™, de los dos sitios *attL* del clon de entrada con los dos *attR* del vector pcDNA3.1/nV5-DEST™ de destino, y se verificó mediante transformación de células competentes DH5α bajo selección con ampicilina. (El vector de destino contiene el gen *ccdB* que permite la selección negativa en la reacción de recombinación). La digestión con enzimas de restricción del vector de destino tras la recombinación y transformación con BamHI confirmó la reacción de recombinación apropiada (datos no mostrados). Se obtuvo una preparación de plásmido de ADN (~3 mg) usando el protocolo del fabricante par el kit de ADN de plásmido Giga Prep (Qiagen).
 15
 20

Se realizó la transfección de células HT1080 tal como sigue: Se inocularon frascos T (75 cm²) a 1,6 x 10⁶ células y se dejaron crecer durante de 4 a 5 días antes de la transfección. Se añadieron o bien 16, 32 o bien 64 µg de ADN de plásmido a 2 ml de medio DMEM:F12. Además, se añadieron 59 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a 2 ml separados de medio DMEM:F12 y se incubaron durante 5 minutos. Se combinaron entonces las dos mezclas de ADN y Lipofectamine y se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con 1X PBS de los frascos T, se añadió toda la mezcla (~4 ml) y se dejó incubar durante 2 horas en un incubador a 37°C/12% de CO₂. Se añadieron 11 ml adicionales de medio DMEM:F12 nuevo a cada matraz T, y se comenzó la toma de muestras 24 horas después.
 25
 30

Ejemplo 7

El butirato de sodio aumenta la productividad específica de rHuEPO y bloquea la progresión del ciclo celular

Se examinó el efecto que tiene el tratamiento con butirato de sodio sobre el ciclo celular de HT1080 y la productividad específica de rHuEPO. Las células tratadas con butirato de sodio (2 mM) aumentaron la productividad específica de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) aproximadamente cuatro veces en comparación con cultivos control (figura 1). Sin embargo, en lugar de que el butirato de sodio desplazase las células a la fase G0/G1, en la que otros investigadores han notificado que se maximiza la síntesis de proteínas (Kim *et al.*, Biotech. Bioeng. 71: 184, 2001), la población de células en las fases G0/G1, S y G2/M permaneció relativamente constante a lo largo de todos los 5 días de cultivo en comparación con cultivos control. Estas diferencias pueden deberse a los métodos de cultivos expuestos anteriormente, que permitieron que las células alcanzaran la confluencia antes de la adición del butirato de sodio, mientras que informes previos observaron los efectos en el ciclo celular sobre células en crecimiento exponencial en el momento de la adición del butirato de sodio. Por tanto, los datos del ciclo celular solos no pueden ser responsables de los aumentos en la productividad específica de que se midieron.
 35
 40

Ejemplo 8

45 El butirato de sodio aumenta la expresión de MAN1C1

Se usó HuEPO recombinante, producida en cultivos de HT1080, como glicoproteína modelo para estudiar los efectos del butirato de sodio sobre genes implicados en la glicosilación de proteínas. El tratamiento de células HT1080 con butirato de sodio 2 mM en cultivo dio como resultado numerosos cambios fenotípicos con respecto a conjuntos de nucleótidos de azúcar y las estructuras de oligosacáridos presentes sobre rHuEPO.

50 Para determinar si estos cambios fenotípicos estaban asociados con cambios genéticos, se estudió la expresión de

genes en células HT1080 a lo largo de un periodo de 24 horas en presencia y ausencia de butirato de sodio usando microalineamientos de oligonucleótidos y el chip HU133A Affymetrix (Affymetrix).

Se identificó una posible enzima limitativa de la velocidad, la enzima alfa 1,2 manosidasa I (MAN1C1), implicada en el procesamiento de oligosacáridos unidos en N a glicoproteínas. El cambio relativo en el ARNm de MAN1C1 inducido por el butirato de sodio se expone a continuación en la tabla 1. Este gen aumentó su expresión aproximadamente 10 veces a lo largo del transcurso de veinticuatro horas cuando se trataron las células con butirato de sodio (tabla 1). La validación posterior de la expresión de MAN1C1 mediante qRT-PCR para células HT1080 tratadas con butirato de sodio a lo largo de un periodo de cinco días mostró aumentos > 40 veces en comparación con cultivos control (tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los datos de qRT-PCR para el cambio en veces del ARNm de MAN1C1 de HT1080

Punto de tiempo (h) ^A	Cambio en veces ^B	Desviación estándar
3	8,7	± 21
6	38,7	± 9,5
12	36,0	± 4,6
24	53,3	± 144
72	42,2	± 3,8
120	7,8	± 3,6

A -Tiempo tras añadirse butirato de sodio al cultivo

B – Cambio en veces en comparación con células HT1080 no tratadas

Ejemplo 9

ARNde interferencia pequeño (ARNip) de MAN1C1 reduce la productividad específica de rHuEPO

Para determinar si existe un vínculo entre el efecto del butirato de sodio sobre los aumentos en la expresión de MAN1C1 y los aumentos en la productividad específica de rHuEPO, se trataron las células con ARN de interferencia pequeño (ARNip) contra MAN1C1 en presencia y ausencia de butirato de sodio. El tratamiento con ARNip no tuvo ningún impacto sobre la Qp de rHuEPO en condiciones control, pero disminuyó hasta un 50% de Qp de rHuEPO cuando se trataron las células con tanto butirato de sodio como el ARNip en comparación con butirato de sodio solo (figura 2A). Tal como se mostró anteriormente, el tratamiento con butirato de sodio aumenta los niveles de ARNm de MAN1C1 en comparación con cultivos control (figura 2B), sin embargo, células tratadas con tanto butirato de sodio como ARNip tenían una disminución de ~30% en los niveles de ARNm de MAN1C1 en comparación con células tratadas con butirato de sodio solo (figura 2B). Debe indicarse que los niveles de ARNm de MAN1C1 eran todavía superiores en las células tratadas con butirato de sodio y ARNip en comparación con los controles (figura 2B). Esto se correlacionaba con una Qp de rHuEPO que permanecía superior al control en tanto células tratadas con butirato de sodio solo como células tratadas con butirato de sodio y ARNip, aunque los niveles absolutos de Qp se redujeron (figura 2A).

Para garantizar que los cambios en las mediciones de productividad específica no estaban provocados por una disminución en los niveles de ARNm de rHuEPO debido a efectos inespecíficos del tratamiento con ARNip, se midieron los niveles de ARNm de rHuEPO a lo largo del mismo periodo de cinco días. Tal como se muestra en la figura 3, los niveles de ARNm de rHuEPO eran constantes en el día 1 y el día 5 en células tratadas con butirato de sodio (+/-) ARNip, y eran ligeramente superiores en el día 5 en comparación con cultivos control. Estos datos confirman que el tratamiento con ARNip para MAN1C1 no alteraban los niveles de expresión de rHuEPO reduciendo la abundancia de ARNm de rHuEPO.

Ejemplo 10

La sobreexpresión de MAN1C1 aumenta la productividad específica de rHuEPO

5 Para confirmar que MAN1C1 puede explicar el aumento en Q_p de rHuEPO QP, independientemente del tratamiento con butirato de sodio, se transfectaron células para que sobreexpresaran MAN1C1 en condiciones control. Tal como se observa en la tabla 2 (expuesta a continuación), cuando se transfectaron 16-64 μg de ADN de plásmido de MAN1C1 en las células, se midió un gran aumento (>1000 veces) en los niveles de ARNm de MAN1C1 en comparación con células no transfectadas (control).

10 La expresión transitoria de MAN1C1 en condiciones control (por ejemplo sin adición de butirato de sodio) dio como resultado un aumento de 2-3 veces en la productividad específica de rHuEPO dependiendo de la cantidad de ADN de plásmido transfectada (figura 4). Aunque el nivel de productividad de rHuEPO es inferior cuando se usa butirato de sodio solo, los datos confirman que el butirato de sodio aumenta la expresión de MAN1C1, que a su vez contribuye al aumento en la productividad específica de rHuEPO.

Tabla 2: Resumen del % de aumento en el ARNm de MAN1C1 tras la transfección en comparación con células no transfectadas. % de aumento de ARNm de MAN1C1 (n=2)^A

Muestra	Día 1	Día 3	Día 5
16 μg de ADN	1683%	1817%	2020%
32 μg de ADN	1776%	1828%	2149%
64 μg de ADN	1650%	1774%	2463%

^A – Se calculó el % de aumento mediante la diferencia en el ciclo a la que se produce la cuantificación absoluta (Ct –ciclo umbral) entre células no transfectadas frente a transfectadas.

15 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad, incluyendo pero sin limitarse a, el material relevante por el motivo citado, como si se indicase específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora como referencia. Aunque la invención anterior se ha descrito en algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, resultará fácilmente evidente para los expertos habituales en la técnica en vista de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse determinados cambios y modificaciones a
20 la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Crowell, Christopher K.

<120> Células huésped mejoradas y métodos de cultivo

<130> 01017/41657A

25 <150> Documento US 60/749.076

<151> 08-12-2005

<160> 14

<170> Patent In versión 3.3

<210> 1

30 <211> 2912

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 434 494 T3

aaggcgcggg	ccccggcgcg	gcggggaggg	ctcggccgga	ggggaggctg	ggcgcgcgcg	60
ccggtcgctg	cgggcccggg	ccccaaagccg	tgccgctccg	ctcgcccggg	cccagccgag	120
gccgctgcgc	ccccgcctcc	tcgcgggagg	actcgctcca	aactccctga	acttcgggga	180
cagtcccccg	aagcggcgaa	actctcaggg	ttggcaacce	tgcccagggg	ccccatccc	240
ggcgcgcgct	cgggacgccc	tcccctcacc	gcgccccgcg	agacacgtgc	ctggactccg	300
agggcttctg	gagccaaccg	ccgggccacg	atgctcatga	ggaaagtgcc	cggcttcgtc	360
ccggcctccc	cgtgggggct	gcggctgccg	cagaagttcc	tcttctctct	cttctctctg	420
ggcctggtca	ccctgtgctt	cggggccctc	ttcctgctgc	cccactctct	tcgcctcaag	480
cgcctcttcc	tggccccccg	gaccacagcag	cctgggtctgg	aagtgggtggc	tgaaatcgcc	540
ggccatgccc	cggcccgcga	gcaggagccg	cctccaacc	cggccccgcg	cgcgccggcc	600
ccgggcgagg	atgaccccag	cagctgggcc	agtccccgcc	gcaggaaagg	ggggctgcgg	660
cgcacccgcc	ccactggacc	ccgcgaggag	gccacggcgg	cccggggcaa	tagcatcccg	720
gcctccaggc	ccggggacga	gggcgtccct	ttccgctttg	acttcaacgc	attccggagc	780
cgtctccgcc	acccggtcct	gggaacgagg	gccgatgaga	gtcaggagcc	ccagagccaa	840
gtgcgagccc	agcgggagaa	aatcaaggag	atgatgcagt	ttgcttggca	gagctataag	900
cgttatgcaa	tggggaaaaa	cgaactccgt	ccactaacia	aagatggcta	cgagggtaac	960
atgttcggag	gcctcagcgg	ggcaacagtc	attgactccc	tcgataccct	ctacctcatg	1020
gagctgaagg	aggagtcca	ggaggccaag	gcctgggtgg	gagagagctt	ccacctgaac	1080
gtgagcggag	aagcatcctt	gtttgaggtg	aacatccgct	acatcggggg	actcctctca	1140
gccttctacc	tgacaggaga	agaggtgttc	cgaataaagg	ccatcaggct	gggagagaag	1200
ctcctgccgg	cgttcaacac	ccccacggga	atcccaaagg	gcgtgggtgag	cttcaaaagt	1260

ES 2 434 494 T3

gggaactggg gctgggccc agccggcagc agcagcatct tggcggagtt tggatccctg 1320
 cacttggaat tcttacacct cactgaactc tctggcaacc aggtcttcgc tgaaaaggtc 1380
 aggaacatcc gcaaggctct caggaagatc gaaaagccct ttggcctcta cccaacttc 1440
 ctgagcccag tgagtgggaa ctgggtgcaa caccatgtct cagttggagg actcggggac 1500
 agtttttatg aatatttgat caaatcctgg ttgatgtcgg gcaagacaga tatggaggct 1560
 aaaaatatgt actacgaagc cttggaggcg atagagacct acttgctgaa tgtctctccc 1620
 ggggggctga cctacattgc cgagtggcga ggggggattc tggaccacaa gatggggcac 1680
 ctggcctgtt tctccggggg catgatcgcc cttggcgccg aggatgcca ggaagaaaag 1740
 agggcccact accgagagct cgcagcccag atcaccaaga cgtgtcacga gtcatacgcc 1800
 cgctcagaca ccaaacttgg gcctgaggcc ttctggttta actccggcag agaggccgtg 1860
 gccaccagc tgagcgagag ctactacatc ctccggccag aggtggtgga gagctacatg 1920
 tacctgtggc gacagacca caacccatc tacagggagt ggggctggga ggtggtgctg 1980
 gccttggaga aatactgtcg gacagaagcc ggtttctctg ggatccaaga cgtgtacagt 2040
 agcaccacca accacgacaa caagcagcag agcttcttc tagcggagac actaaagtat 2100
 ctctatcttc tgttctctga agatgacttg ctctccctgg aagactgggt gttcaacacc 2160
 gagggcccacc cactcccggg gaaccactca gacagctccg gcagagcctg gggcagacac 2220
 tgaccccatc tctgcccgc gccctggggc cggcgcaggg atgccttgcc ttttcaggat 2280
 ttgagactgt tctcaaaggg attgggaacg aaggcccat ctcgggcaga ccccagcag 2340
 atgtgtcgga caagcaactt ctttctctct gtgaggagac aagacttgga gactcagcga 2400
 tgtcaggcca gggccatggc cacactggcc cacacattcc tttctacaga gaatttctat 2460
 gaagcccact cacttgccat tccagggcca aaggaccgga ggtttgata tccgcccctt 2520
 gtatttgatt tgcttccttt tggtttcttg gtttttgtt ttgcttgatt ttgtcttttc 2580
 tctacagttt agttttgtca caattacaca tatagttttc aaaatcatgc actttctaaa 2640
 atggtgtcat cctgaaaaac aaaaccagt gtttgcacac acacaaaatc ttgaccccgt 2700
 tatctatatt ttaaagtctt tttgcccac actgacccta tgttcaactt tgtgtcattt 2760
 accttataat ttgaggagg gtttcccttt gggcctcagt gttacaaatt actagtgcta 2820
 ttttcattat tattgtaat gaaaaatctg tggactagaa taaaagagtt tattgaataa 2880
 gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 2912

<210> 2

<211> 630

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 434 494 T3

Met Leu Met Arg Lys Val Pro Gly Phe Val Pro Ala Ser Pro Trp Gly
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Phe Leu Phe Leu Leu Phe Leu Ser Gly Leu
 20 25 30

Val Thr Leu Cys Phe Gly Ala Leu Phe Leu Leu Pro His Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Lys Arg Leu Phe Leu Ala Pro Arg Thr Gln Gln Pro Gly Leu Glu
 50 55 60

Val Val Ala Glu Ile Ala Gly His Ala Pro Ala Arg Glu Gln Glu Pro
 65 70 75 80

Pro Pro Asn Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gly Glu Asp Asp Pro
 85 90 95

Ser Ser Trp Ala Ser Pro Arg Arg Arg Lys Gly Gly Leu Arg Arg Thr
 100 105 110

Arg Pro Thr Gly Pro Arg Glu Glu Ala Thr Ala Ala Arg Gly Asn Ser
 115 120 125

Ile Pro Ala Ser Arg Pro Gly Asp Glu Gly Val Pro Phe Arg Phe Asp
 130 135 140

Phe Asn Ala Phe Arg Ser Arg Leu Arg His Pro Val Leu Gly Thr Arg
 145 150 155 160

Ala Asp Glu Ser Gln Glu Pro Gln Ser Gln Val Arg Ala Gln Arg Glu
 165 170 175

Lys Ile Lys Glu Met Met Gln Phe Ala Trp Gln Ser Tyr Lys Arg Tyr
 180 185 190

Ala Met Gly Lys Asn Glu Leu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Gly Tyr Glu
 195 200 205

Gly Asn Met Phe Gly Gly Leu Ser Gly Ala Thr Val Ile Asp Ser Leu
 210 215 220

Asp Thr Leu Tyr Leu Met Glu Leu Lys Glu Glu Phe Gln Glu Ala Lys
 225 230 235 240

Ala Trp Val Gly Glu Ser Phe His Leu Asn Val Ser Gly Glu Ala Ser
 245 250 255

ES 2 434 494 T3

Leu Phe Glu Val Asn Ile Arg Tyr Ile Gly Gly Leu Leu Ser Ala Phe
 260 265 270

Tyr Leu Thr Gly Glu Glu Val Phe Arg Ile Lys Ala Ile Arg Leu Gly
 275 280 285

Glu Lys Leu Leu Pro Ala Phe Asn Thr Pro Thr Gly Ile Pro Lys Gly
 290 295 300

Val Val Ser Phe Lys Ser Gly Asn Trp Gly Trp Ala Thr Ala Gly Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Ile Leu Ala Glu Phe Gly Ser Leu His Leu Glu Phe Leu His
 325 330 335

Leu Thr Glu Leu Ser Gly Asn Gln Val Phe Ala Glu Lys Val Arg Asn
 340 345 350

Ile Arg Lys Val Leu Arg Lys Ile Glu Lys Pro Phe Gly Leu Tyr Pro
 355 360 365

Asn Phe Leu Ser Pro Val Ser Gly Asn Trp Val Gln His His Val Ser
 370 375 380

Val Gly Gly Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Glu Tyr Leu Ile Lys Ser Trp
 385 390 395 400

Leu Met Ser Gly Lys Thr Asp Met Glu Ala Lys Asn Met Tyr Tyr Glu
 405 410 415

Ala Leu Glu Ala Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Asn Val Ser Pro Gly Gly
 420 425 430

Leu Thr Tyr Ile Ala Glu Trp Arg Gly Gly Ile Leu Asp His Lys Met
 435 440 445

Gly His Leu Ala Cys Phe Ser Gly Gly Met Ile Ala Leu Gly Ala Glu
 450 455 460

Asp Ala Lys Glu Glu Lys Arg Ala His Tyr Arg Glu Leu Ala Ala Gln
 465 470 475 480

Ile Thr Lys Thr Cys His Glu Ser Tyr Ala Arg Ser Asp Thr Lys Leu
 485 490 495

Gly Pro Glu Ala Phe Trp Phe Asn Ser Gly Arg Glu Ala Val Ala Thr
 500 505 510

ES 2 434 494 T3

Gln Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr Ile Leu Arg Pro Glu Val Val Glu Ser
 515 520 525

Tyr Met Tyr Leu Trp Arg Gln Thr His Asn Pro Ile Tyr Arg Glu Trp
 530 535 540

Gly Trp Glu Val Val Leu Ala Leu Glu Lys Tyr Cys Arg Thr Glu Ala
 545 550 555 560

Gly Phe Ser Gly Ile Gln Asp Val Tyr Ser Ser Thr Pro Asn His Asp
 565 570 575

Asn Lys Gln Gln Ser Phe Phe Leu Ala Glu Thr Leu Lys Tyr Leu Tyr
 580 585 590

Leu Leu Phe Ser Glu Asp Asp Leu Leu Ser Leu Glu Asp Trp Val Phe
 595 600 605

Asn Thr Glu Ala His Pro Leu Pro Val Asn His Ser Asp Ser Ser Gly
 610 615 620

Arg Ala Trp Gly Arg His
 625 630

<210> 3

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (28)..(192)

10 <400> 3

ES 2 434 494 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

<210> 4

<211> 1725

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 434 494 T3

gaattccctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg 60
 cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg 120
 ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtecc 180
 gccoctaact ccgcccattc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccc 240
 tggtgacta atttttttta tttatgcaga ggcgaggcc gcctcggcct ctgagctatt 300
 ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tggtcgagga 360
 actgaaaaac cagaaagtta actggtaagt ttagtctttt tgtcttttat ttcaggtecc 420
 ggatccggtg gtggtgcaaa tcaaagaact gctcctcagt ggatggtgcc tttacttcta 480
 ggctgtacg gaagtgttac ttctgctota aaagctgctg caacaagctg gtcgagatcc 540
 taggtcaccg ggcgcgcccc aggtcgtga gggaccccgg ccaggcgcgg agatgggggt 600
 gcacgaatgt cctgcctggc tgtggcttct cctgtccctg ctgtcgtctc ctctgggct 660
 ccagtcctg ggcgcccac cagcctcat ctgtgacagc cgagtcctgg agaggtacct 720
 cttggaggcc aaggaggccg agaatatcac gacgggctgt aatgaaacgt gcagcttgaa 780
 tgagaatata actgtcccag acaccaaagt taatttctat gcctggaaga ggatggaggt 840
 cgggcagcag gccgtagaag tctggcaggg cctggccctg ctgtcgggaag ctgtcctgcg 900
 gggccaggcc ctggttggtca actcttccca ggtgaatgag accctgcagc tgcattgtga 960
 taaagccgtc agtggccttc gcagcctcac cactctgctt cgggctctgg gagcccagaa 1020
 ggaagccatc toccctccag atgcggcctc agctgctcca ctccgaacaa tcaactgctga 1080
 cactttccgc aaactcttcc gagtctactc caatttctct cggggaaagc tgaagctgta 1140
 cacaggggag gcctgcagga caggggacag atgaccagggt gtgtccacct gggcatatcc 1200
 accacctccc tcaccaacat tgcttgtgcc acacctccc ccgccaactc tgaaccccgt 1260
 cgaggggctc tcagctcagc gccagcctgt cccatggaca ctccagtgcc agcaatgaca 1320
 tctcaggggc cagaggaact gtccagagag caactctgag atctcgacca tgggaaatgt 1380
 cagagtggag aaccacaccg agtgccactg cagcacttgt tattatcaca aatcctaata 1440
 gtttgcagtg ggcttgtctg atgatggctg acttgcctca aaggaaaatt aatttgtcca 1500
 gtgtctatgg ctttgtgaga taaaaccctc cttttccttg ccataccatt tttaacctgc 1560
 tttgagaata tactgcagct ttattgcttt tctccttate ctacaatata atcagtagtc 1620
 ttgatctttt catttggaat gaaatatggc atttagcatg accataaaaa gctgattcca 1680
 ctggaaataa agtcttttaa atcatcactc tatcactgaa ttcta 1725

<210> 5

<211> 193

5 <212> PRT

ES 2 434 494 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (28)..(192)

5 <400> 5

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

<210> 6

<211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 5 <400> 6
 ggagccccag agccaagt 18
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 7
 tctactacgt caaacgaacc g 21
 15 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> El nucleótido en la posición 1 está unido a 6-Fam.
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> El nucleótido en la posición 22 está unido a Tamra.
 <400> 8
 30 cgagcccagc gggagaaaat ca 22
 <210> 9

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador sintético
 <400> 9
 gttaattct atgcctggaa gaggat 26
 <210> 10
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 10
 15 ttcagaccgt cccggacc 18
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 25 <223> El nucleótido en la posición 1 está unido a 6-Fam.
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> El nucleótido en la posición 22 está unido a Tamra.
 30 <400> 11
 aggtcgggca gcaggccgt 19

<210> 12

<211> 3815

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 12

ES 2 434 494 T3

ggctgcggcg caccgcgcc actggacccc gcgaggaggc cacggcggcc cggggcaata 60
 gcatcccggc ctccaggccc ggggacgagg gcgtcccttt ccgctttgac ttcaacgcat 120
 tccggagccg tctccgccac ccggtcctgg gaacgagggc cgatgagagt caggagcccc 180
 agagccaagt gcgagcccag cgggagaaaa tcaaggagat gatgcagttt gcttggcaga 240
 gctataagcg ttatgcaatg gggaaaaacg aactccgtcc actaacaaaa gatggctacg 300
 agggtaacat gttcggaggc ctccagcggg caacagtcac tgactccctc gataccctct 360
 acctcatgga gctgaaggag gagttccagg aggccaaggc ctgggtggga gagagcttcc 420
 acctgaacgt gagcggagaa gcatccttgt ttgaggtgaa catccgctac atcgggggac 480
 tcctctcagc cttctacctg acaggagaag aggtgttccg aataaaggcc atcaggctgg 540
 gagagaagct cctgccggcg ttcaacaccc ccacgggaat cccaaagggc gtgggtgagct 600
 tcaaaagtgg gaactggggc tgggccacag ccggcagcag cagcatcttg gcggagtttg 660
 gatccctgca cttggaattc ttacacctca ctgaactctc tggcaaccag gtcttcgctg 720
 aaaaggtcag gaacatccgc aaggctctca ggaagatcga aaagcccttt ggcctctacc 780
 ccaacttctc cagcccagtg agtgggaact gggtgcaaca ccatgtctca gttggaggac 840
 tcggggacag tttttatgaa tatttgatca aatcctgggt gatgtcgggc aagacagata 900
 tggaggctaa aaatatgtac tacgaagcct tggaggcgat agagacctac ttgctgaatg 960
 tctctcccgg ggggctgacc tacattgccg agtggcgagg ggggattctg gaccacaaga 1020
 tggggcacct ggccctgttc tccgggggca tgatcgccct tggcgccgag gatgccaaag 1080
 aagaaaagag ggcccactac cgagagctcg cagcccagat caccaagacg tgtcacgagt 1140
 catacggccg ctccagacacc aaacttgggc ctgaggcctt ctggtttaac tccggcagag 1200
 aggccgtggc caccagctg agcgagagct actacatcct ccggccagag gtgggtggaga 1260
 gctacatgta cctgtggcga cagaccaca accccatcta caggagtggt ggctgggagg 1320
 tgggtgctggc cttggagaaa tactgtcggc cagaagccgg tttctctggg atccaagacg 1380
 tgtacagtag ccccccaac cacgacaaca agcagcagag cttctttcta gcggagacac 1440
 taaagatttg agactgttct caaagggatt gggaacgaag gcccctctc gggcagacct 1500
 ccagcagatg tgcgggaca gcaacttctt ttctctgtg aggagacaag acttggagac 1560
 tcagcgatgt caggccaggg ccatggccac actggcccac acattccttt ctacagagaa 1620
 tttctatgaa gccactcac ttgccattcc agggccaaag gaccggagggt ttgcatatcc 1680
 gcccttgta tttgatttgc ttcttttgg tttcttgggt tttgtttttg cttgattttg 1740

ES 2 434 494 T3

"tcttttctct	acagtttagt	tttgtcacia	ttacacatat	agttttcaaa	atcatgcaet	1800
ttctaaaatg	gtgtcatcct	gaaaaacaaa	accagtggtt	tgcacacaca	caaaatcttg	1860
accccgttat	ctatatatta	aatgcttttt	gccaacact	gaccctatgt	tcaactttgt	1920
gtcatttacc	ttataatttg	aggaggggtt	tecctttggg	cctcagtggt	acaaattact	1980
agtgctattt	tcattattat	tgtaatggaa	aaatctgtgg	actagaataa	aagagtttat	2040
tgataagaa	atatgattgg	gctcattgca	catcagtgac	tcctagaaaa	accattgcaa	2100
tgttaccatc	agaaataata	atcagccagc	agttgattta	aggtataatt	tagtaaaccg	2160
ttccaacttc	tattacctcc	cctgaaatcg	gtcctgatat	attcgagaag	catgaggcca	2220
gcccttcaga	tgcaagtgtt	tatttatact	caggtttaga	ttgggaagag	gcccagggag	2280
gagcagcaac	ttgcctgagg	tcacacagcc	caaaaaaggc	aaaggagagt	ctcgcccctg	2340
ccgtctcctg	gccaccccag	ttgagtgtcc	gtctgttcca	tcattcagca	gatgcttggt	2400
gagtgcctgc	aacggaccag	acaactgggt	agaggccagg	gacaccgctg	agagtgagac	2460
agtcataagc	cctgcagtca	aggggtcaag	aggggagaaa	gcgatggtaa	gggaaactga	2520
caagtaagtg	aagtgactgc	aggtcatagg	aaatgctaca	aaggagatag	atagacagct	2580
gaggacctac	cctacggggg	cagggagggc	ctctctgggc	aggtgacctt	caagccaaga	2640
cccagaagat	aaaaaggagc	agccgaaaga	ctatctggca	gaagaatgaa	cttcccataa	2700
cccagcccc	tttcccacc	tcctgatgc	cctccctggg	agggggcctg	aaacactggg	2760
gctgtttgtc	agagcaagga	gctcaggtcc	taacactgaa	gtgacagctc	ttcctccct	2820
gacccttttt	tttttttga	gaccagagt	ctcattcagt	cgcccaggct	ggagtgcagt	2880
ggtgcaatct	tggctcactg	caacctccac	ctcctgggtt	caagcagttc	tcctgcctca	2940
gcttccccag	tagcaggggtg	cgtaaccaca	cccggcta	tttttgtatt	tttagtaaag	3000
acgaggtttt	gccatgttgc	ctaggctggt	cttgaactcc	tgagctcagg	tgatccgccc	3060
acctcagcct	cccaaagtgc	ggggattaca	ggcatgagcc	accacacca	gtcctttcct	3120
ggcacatttg	cagcttgtca	acacagcgga	aatcacggga	gaatggtgag	cccttcctg	3180
ggctcagctg	cttgctctgt	tcataagctt	taatagcccc	cggggctctg	ggccaggtga	3240
cccggcttta	aatccctgct	gtgtgaactt	aggcaggtac	ctcccctctc	tgggctcttc	3300
ttttccatca	agcagacaga	aaacctcaac	cccacaaggt	tgctgtgaga	agaagtggga	3360
agctgctggt	tcctgggca	caggaagtgc	ttgttccttg	ttctggagac	tcaagacatt	3420
cccagaatct	tcttaagcag	agctgctggg	gagtagcccc	tgtagcaagt	accatgctct	3480
tgacaggcag	catgagagcg	tgactcccat	gaccacctg	tgctcaaaaa	aaaaaaaaaa	3540
aaaaaaaaaa	aagcaacca	ggaaaactga	ctacacaaac	attgtagaaa	gattagaaaa	3600
tagaagcaga	aagaagactc	attggccatc	ccactctctg	gggtgaatac	tgttatattt	3660

ES 2 434 494 T3

tcttctaggc ctttttctat gaatatatag aatatagatt ttgccaccgt ggtatcctac 3720
tatgcacact gttttcttat aatctgcttt tgcacttaac tgtacattgt gaacctcttt 3780
ccatgtcaac aaatacatgt ttatctcatc gctgt 3815

<210> 13

<211> 482

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 434 494 T3

Leu Arg Arg Thr Arg Pro Thr Gly Pro Arg Glu Glu Ala Thr Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Gly Asn Ser Ile Pro Ala Ser Arg Pro Gly Asp Glu Gly Val Pro
 20 25 30
 Phe Arg Phe Asp Phe Asn Ala Phe Arg Ser Arg Leu Arg His Pro Val
 35 40 45
 Leu Gly Thr Arg Ala Asp Glu Ser Gln Glu Pro Gln Ser Gln Val Arg
 50 55 60
 Ala Gln Arg Glu Lys Ile Lys Glu Met Met Gln Phe Ala Trp Gln Ser
 65 70 75 80
 Tyr Lys Arg Tyr Ala Met Gly Lys Asn Glu Leu Arg Pro Leu Thr Lys
 85 90 95
 Asp Gly Tyr Glu Gly Asn Met Phe Gly Gly Leu Ser Gly Ala Thr Val
 100 105 110
 Ile Asp Ser Leu Asp Thr Leu Tyr Leu Met Glu Leu Lys Glu Glu Phe
 115 120 125
 Gln Glu Ala Lys Ala Trp Val Gly Glu Ser Phe His Leu Asn Val Ser
 130 135 140
 Gly Glu Ala Ser Leu Phe Glu Val Asn Ile Arg Tyr Ile Gly Gly Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Thr Gly Glu Glu Val Phe Arg Ile Lys Ala
 165 170 175
 Ile Arg Leu Gly Glu Lys Leu Leu Pro Ala Phe Asn Thr Pro Thr Gly
 180 185 190
 Ile Pro Lys Gly Val Val Ser Phe Lys Ser Gly Asn Trp Gly Trp Ala

ES 2 434 494 T3

195					200					205					
Thr	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	His	Leu
	210					215					220				
Glu	Phe	Leu	His	Leu	Thr	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Phe	Ala	Glu
225					230					235					240
Lys	Val	Arg	Asn	Ile	Arg	Lys	Val	Leu	Arg	Lys	Ile	Glu	Lys	Pro	Phe
				245					250					255	
Gly	Leu	Tyr	Pro	Asn	Phe	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Trp	Val	Gln
			260					265					270		
His	His	Val	Ser	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	Tyr	Glu	Tyr	Leu
		275					280					285			
Ile	Lys	Ser	Trp	Leu	Met	Ser	Gly	Lys	Thr	Asp	Met	Glu	Ala	Lys	Asn
	290					295					300				
Met	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Thr	Tyr	Leu	Leu	Asn	Val
305					310					315					320
Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Ala	Glu	Trp	Arg	Gly	Gly	Ile	Leu
				325					330					335	
Asp	His	Lys	Met	Gly	His	Leu	Ala	Cys	Phe	Ser	Gly	Gly	Met	Ile	Ala
			340					345					350		
Leu	Gly	Ala	Glu	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Lys	Arg	Ala	His	Tyr	Arg	Glu
		355					360					365			
Leu	Ala	Ala	Gln	Ile	Thr	Lys	Thr	Cys	His	Glu	Ser	Tyr	Ala	Arg	Ser
	370					375					380				
Asp	Thr	Lys	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Phe	Trp	Phe	Asn	Ser	Gly	Arg	Glu
385					390					395					400
Ala	Val	Ala	Thr	Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Arg	Pro	Glu
				405					410					415	
Val	Val	Glu	Ser	Tyr	Met	Tyr	Leu	Trp	Arg	Gln	Thr	His	Asn	Pro	Ile
			420					425					430		
Tyr	Arg	Glu	Trp	Gly	Trp	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Cys
		435					440					445			

ES 2 434 494 T3

Arg Thr Glu Ala Gly Phe Ser Gly Ile Gln Asp Val Tyr Ser Ser Thr
 450 455 460

Pro Asn His Asp Asn Lys Gln Gln Ser Phe Phe Leu Ala Glu Thr Leu
 465 470 475 480

Lys Ile

<210> 14

<211> 735

<212> ADN

5 <213> *Platichthys flesus*

<400> 14

```

ttctatgttt ggagtcagcg gatcggctgc ccgccacaga gaggactctg tcacagccct      60
gagctgagga accctgcatt gcatcgtctc caagaaaaag ttttcaatgg ttttccgaaa     120
gttgcccggg gtgtcggcct cgggcatggg tcttcgcctg tcccagaagt tcgtctttct     180
gctctttctc tcgggtctgg tcacactctg cttcggggcc ctcttctttc tgcctgactc     240
gggccggcta aaacgcatct tcctgtccaa gacagagacg cagccggtea ccgtcggctc     300
cgggtccgag aacgatgtcc gggagcacat gaagagagcc ggcaaggagc cggagcccc     360
gcgggggggtg acctccgcca agggggagac cagcaccaag ctgaagagcc tcatccgcaa     420
ggcgtccgtc tctcacgagg ccacggagga gcggccggcc ggggacagag cgcaggagga     480
cctgactctg tcccgtcca ggacggagtc cgcctcggag agagtgacct cctccgaccg     540
cgctgccggc tcggatactt tcagttacca gaagttcacg aggtgtctgc tcaaaccccc     600
gctggggagg gacggtggca agccgagcga cccaagagc gaggagcgcc ggctgaaagt     660
caaagagatg atgaagttg cctgggacaa ctacaagctc tacgcctggg gcaagaatga     720
gctgcggcct ctgac                                                                735
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de aumento de la producción de una glicoproteína de interés en una célula huésped aislada que se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar dicha glicoproteína de interés, comprendiendo dicho método aumentar en dicha célula huésped la expresión de alfa 1,2-manosidasa (MAN1C1) que es nativa para dicha célula huésped.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula huésped se transfecta con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para MAN1C1 operativamente unido a una secuencia de control de la expresión heteróloga.
- 10 3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula huésped comprende una secuencia de control de la expresión heteróloga operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para MAN1C1.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha célula huésped se ha transfectado con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para dicha glicoproteína de interés operativamente unida a una secuencia de control de la expresión heteróloga.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha célula huésped comprende una secuencia de control de la expresión heteróloga operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para dicha glicoproteína de interés.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la glicoproteína de interés es una molécula estimulante de la eritropoyesis.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la glicoproteína de interés es eritropoyetina de SEQ ID NO: 3.
- 20 8. Método según la reivindicación 6, en el que la glicoproteína de interés es darbepoetina de SEQ ID NO: 5.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha célula huésped es una célula CHO.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha célula huésped es una célula humana.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha célula huésped es una célula BHK.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha célula huésped es una célula NS/0.
- 25 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha célula huésped es una célula HT-1080.

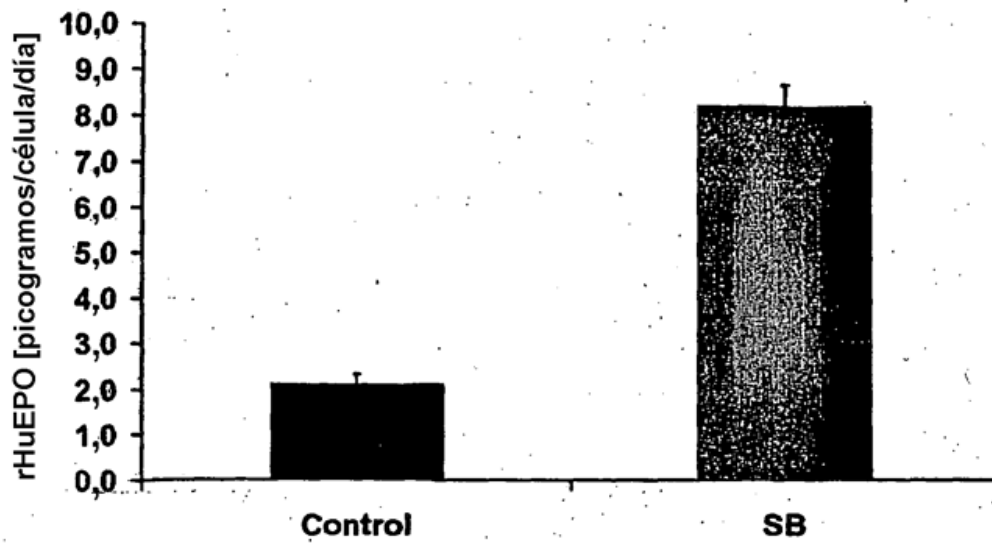
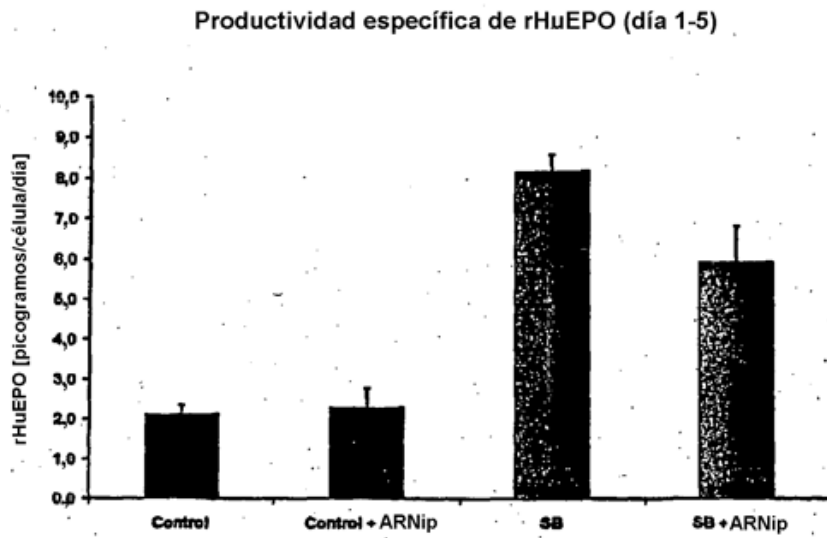


Figura 1: Productividad específica (Q_p) de rHuEPO medida a lo largo del cultivo de 5 días en presencia (SB) y ausencia (control) de butirato de sodio 2 mM

A



B

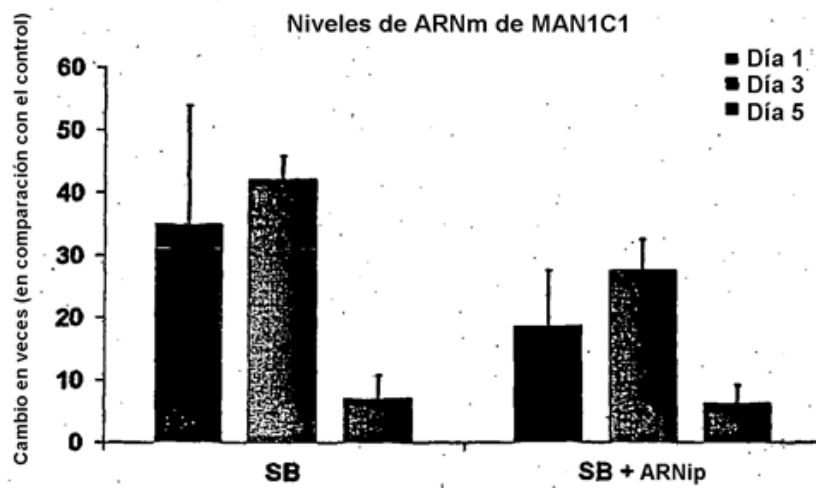


Figura 2: A, el efecto del tratamiento con ARNip de MAN1C1 sobre la Q_p de rHuEPO en presencia (SB) y ausencia (control) de butirato de sodio a lo largo de un periodo de 5 días. B, el cambio en veces en los niveles de ARNm de MAN1C1 en células HT1080 tratadas con butirato de sodio (SB) o butirato de sodio más ARNip (SB + ARNip) en comparación con los niveles de ARNm de HT1080 control

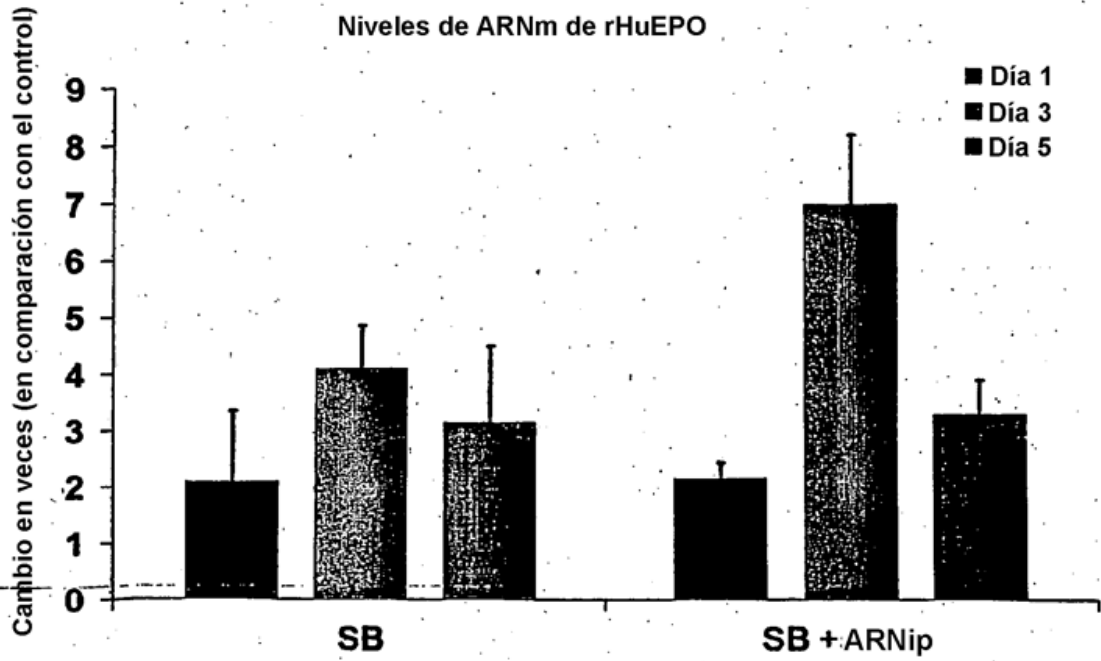


Figura 3: Cambios en los niveles de ARNm de rHuEPO en células HT1080 tratadas con butirato de sodio en presencia (SB + ARNip) y ausencia de ARNip (SB) dirigido contra MAN1C1 (n=3)

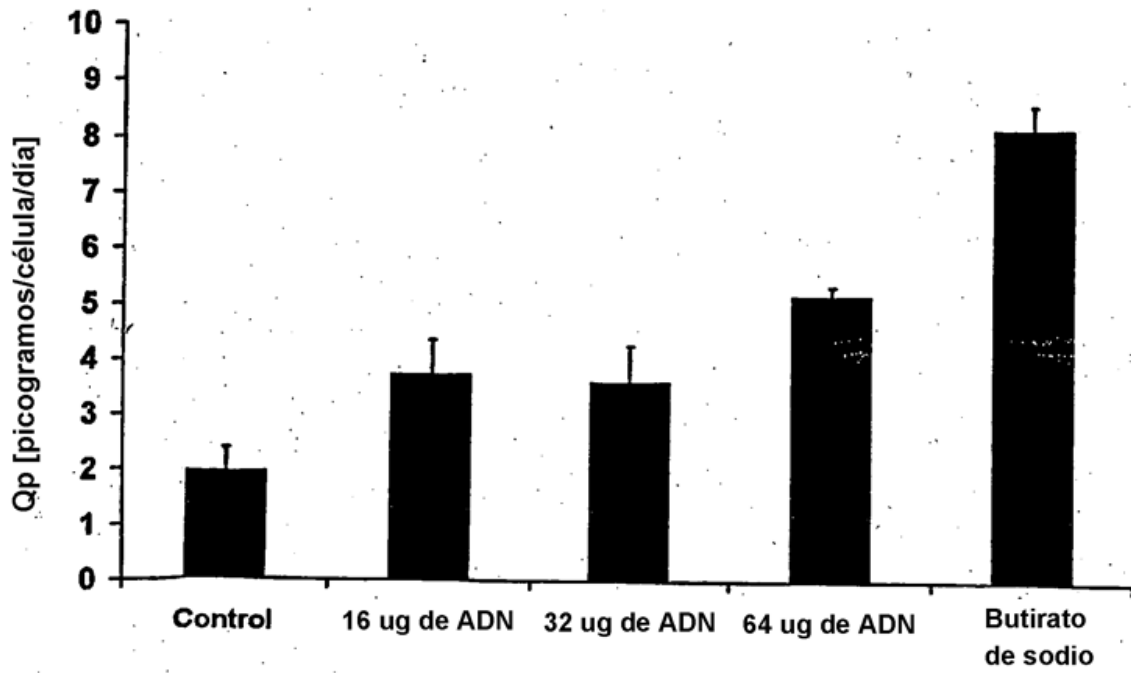


Figura 4: Cambios en la productividad específica de rHuEPO tras la transfección transitoria con cantidades variables de ADN de MAN1C1 de plásmido (n=2)