

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 727**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013 PCT/EP2013/057866**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013 E 13716301 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2839003**

54 Título: **Reducción de la formación de aminoácidos amidados en líneas celulares para la expresión de proteína**

30 Prioridad:

**16.04.2012 EP 12164264**

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

**06.11.2018**

73 Titular/es:

**LEK PHARMACEUTICALS D.D. (100.0%)  
Verovskova 57  
1526 Ljubljana, SI**

72 Inventor/es:

**KULJ, MIHAELA y  
GASER, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 688 727 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

Reducción de la formación de aminoácidos amidados en líneas celulares para la expresión de proteína

La presente invención se refiere a la reducción de la formación de aminoácidos amidados en líneas celulares para la expresión de proteína.

5 Aunque las proteínas se caracterizan principalmente por su secuencia de aminoácidos (estructura primaria), otros aspectos, como modificaciones postraduccionales, también contribuyen a las características de una proteína, por ejemplo, afectando la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Algunas de estas modificaciones postraduccionales desempeñan un papel importante para la actividad proteica posterior, incluida la seguridad y eficacia de los fármacos biofarmacéuticos.

10 Un aspecto principal para la heterogeneidad de las proteínas es el patrón de carga que incluye variantes ácidas, formadas, por ejemplo, por desamidación de aminoácidos como la asparagina, por glicosilación o por procesamiento de glutamina N-terminal a piroglutamato, y variantes básicas, con, por ejemplo, aminoácidos amidados, particularmente residuos de prolinamida C-terminales.

15 La formación de aminoácidos amidados, como la prolinamida C-terminal, sin embargo, no es deseada en algunos casos, por ejemplo, como una fuente de heterogeneidad no deseada, o en el caso de que dichas variantes afecten potencialmente a la actividad proteica o la inmunogenicidad, o cuando la cantidad de los aminoácidos amidados, por ejemplo, prolinamida, en la proteína que se va a producir son más altos o más bajos que en una proteína de referencia.

20 En contraste con fármacos moleculares pequeños, que se producen bajo condiciones fisicoquímicas altamente controlables, la producción de proteínas, particularmente proteínas usadas como bioterapéuticos (productos biofarmacéuticos), es una materia altamente compleja que es difícil de controlar, ya que la producción hace uso de un sistema de cultivo con células vivas. Por lo tanto, es importante tener a mano una caja de herramientas que permita controlar modificaciones particularmente postraduccionales de las proteínas producidas, para poder proporcionar una calidad constante del producto y un alto rendimiento constante, para aumentar la eficiencia del proceso de producción, aumentar y/o ajustar la actividad fisiológica de la proteína producida y la seguridad del fármaco derivado, y/o igualar las características postraduccionales de una proteína producida a las de una proteína de referencia.

25 Iwai et al. ("Autocrine growth loops dependent on peptidyl alpha-amidating enzyme as targets for novel tumor cell growth inhibitors", 1999, Lung Cancer, Vol. 23 No. 3, páginas 209-222) divulgan que la inhibición mediada por antisentido de PAM en células tumorales de pulmón conduce a una reducción en la cantidad de GRP amidada, es decir, una proteína homóloga expresada.

30 El documento WO 2006/084111 A2 divulga un sistema para la optimización de la expresión de proteína heteróloga en términos de la proporción de polipéptidos amidados frente a desamidados mediante la recolección de células en una proporción deseada.

35 El objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos que aborden estas necesidades.

El objetivo se encuentra con métodos y medios de acuerdo con las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con realizaciones preferidas. Debe entenderse que los intervalos de valores delimitados por valores numéricos incluyen dichos valores de delimitación.

## Sumario de la invención

40 Antes de describir la invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a las partes componentes particulares de los dispositivos o medios descritos, o etapas de proceso de los métodos descritos, ya que dichos dispositivos o medios y métodos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento es solo para describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa. Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el, la" incluyen referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 Además, debe entenderse que, en el caso de que se den intervalos de parámetros que estén delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de limitación.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una célula para la expresión de proteína que tiene actividad de amidación peptídica reducida.

5 Como se usa en el presente documento, el término "célula" también abarcará líneas celulares derivadas de la misma. Además, los animales obtenidos de tales células o líneas celulares, plataformas de expresión basadas en células estarán cubiertos por la protección provista por dicho término.

10 Como se usa en el presente documento, el término "para la expresión de proteínas" implica que la célula de acuerdo con la invención es adecuada para la expresión de proteínas en un proceso industrial. Esto incluye la expresión de proteínas tanto homólogas como heterólogas. El hecho de que la célula de acuerdo con la invención sea adecuada para la expresión de proteínas en un proceso industrial significa que las células presentes en un entorno natural, que por su naturaleza tienen actividad de amidación peptídica reducida, pero son, como tales, y sin modificación, aislamiento o tratamiento adicional, no adecuadas para la expresión de proteínas en un proceso industrial, si existe, no anticipa la novedad de las células de acuerdo con la presente invención.

15 La amidación peptídica es una modificación postraduccional generalizada, a menudo esencial, experimentada por muchos péptidos bioactivos. La amidación peptídica sirve, por ejemplo, para catalizar péptidos neuroendocrinos hasta productos activos  $\alpha$ -amidados.

Sin embargo, la amidación peptídica es indeseable en algunos casos, por ejemplo, como fuente de heterogeneidad no deseada, o en el caso de que dichas variantes afecten potencialmente la actividad proteica o la inmunogenicidad, o cuando la cantidad de aminoácidos amidados, por ejemplo, prolinamida, en la proteína que se va a producir es más alta o más baja que en una proteína de referencia.

20 En una realización preferida de la célula utilizada en la expresión de proteínas heterólogas que tiene actividad de amidación peptídica reducida de acuerdo con la invención, la actividad de amidación peptídica reducida se ha logrado mediante

a) inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica; y/o

25 b) expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la actividad de amidación peptídica en una célula utilizada en la expresión de proteínas heterólogas, cuyo método comprende al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en

30 a) inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica; y/o

b) expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida.

35 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la actividad de amidación peptídica reducida se ha logrado o se puede lograr mediante al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en

- silenciamiento de genes,

- desactivación de genes,

- inactivación permanente de genes,

- inactivación permanente condicional de genes, y/o

40 ▪ alteración de genes

con respecto a un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica.

El término "expresión génica", como se usa en la presente memoria, significa que abarca al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en la transcripción de ADN en ARNm, procesamiento de ARNm, maduración de ARNm no codificante, exportación de ARNm, traducción, plegamiento de proteínas y/o transporte de proteínas.

5 La inhibición o reducción de la expresión génica de un gen se refiere a métodos que interfieren directamente con la expresión génica, que abarcan, pero no se limitan a, inhibición o reducción de la transcripción de ADN, por ejemplo, mediante el uso de represores específicos relacionados con promotores, por mutagénesis específica del sitio de un promotor dado, mediante intercambio de promotor, o inhibición o reducción de la traducción, por ejemplo, mediante silenciamiento génico postranscripcional inducido por ARNi.

10 La expresión de una  $\alpha$ -amidación de un péptido que cataliza una enzima disfuncional o inactiva, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida, puede conseguirse, por ejemplo, por mutagénesis, inserciones o eliminaciones específicas del sitio o aleatorias dentro del gen codificador.

15 La inhibición o reducción de la actividad de una enzima que cataliza la amidación peptídica se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración de, o la incubación con, un inhibidor de la enzima respectiva, antes o simultáneamente con la expresión de la proteína. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen, pero sin limitación, un péptido inhibidor, un anticuerpo, un aptámero, una proteína de fusión o un mimético de anticuerpo contra dicha enzima, o un ligando o receptor de los mismos, o un péptido o ácido nucleico inhibidor, o un molécula pequeña con actividad de unión similar.

20 Otras formas de inhibir la enzima son la reducción de cofactores específicos de la enzima en el medio, tales como el cobre, que es un cofactor de iones específico de PAM (por ejemplo, en forma de  $\text{CuSO}_4$ ), ascorbato, que actúa como donante de electrones para PAM, oxígeno molecular, catalasa y otros conocidos hoy en día por el experto en la técnica, o aún por descubrir en el futuro.

25 El silenciamiento génico, desactivación del gen y inactivación permanente del gen se refieren a técnicas mediante las cuales se reduce la expresión de un gen, ya sea mediante modificación genética o mediante tratamiento con un oligonucleótido con una secuencia complementaria ya sea a un transcrito de ARNm o a un gen. Si se realiza la modificación genética del ADN, el resultado es un organismo desactivado o modificado permanentemente. Si el cambio en la expresión génica es causado por un oligonucleótido que se une a un ARNm o se une temporalmente a un gen, esto da como resultado un cambio temporal en la expresión génica sin modificación del ADN cromosómico y se denomina desactivación transitoria.

30 En una desactivación transitoria, que también está abarcada por el término anterior, la unión de este oligonucleótido al gen activo o a sus transcritos provoca una disminución de la expresión a través del bloqueo de la transcripción (en el caso de la unión a genes), la degradación del transcrito de ARNm (por ejemplo, mediante ARN interferente pequeño (ARNpi) o antisentido dependiente de RNasa-H) o bloqueo ya sea de la traducción del ARNm, sitios de empalme o de escisión con nucleasa previos al ARNm usados para maduración u otros ARNm funcionales tales como miARN (por ejemplo, por oligonucleótidos morfolino u otro antisentido independiente de RNasa-H). Otros enfoques implican el uso de ARNhp (ARN de horquilla pequeña, que es una secuencia de ARN que produce un giro brusco que puede usarse para silenciar la expresión génica a través de la interferencia de ARN), ARNpie (ARNpi preparados con endorribonucleasa, que son una mezcla de oligos de ARNpi resultantes de la escisión de ARN bicatenario largo (ARNbc) con una endorribonucleasa) o la activación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

40 Otros enfoques para llevar a cabo el silenciamiento génico, desactivación o inactivación permanente son conocidos por el experto a partir de la literatura respectiva, y su aplicación en el contexto de la presente invención se considera rutinaria.

45 La desactivación génica permanente se refiere a técnicas mediante las cuales la expresión de un gen está completamente bloqueada, es decir, el gen respectivo es inoperativo, o incluso se elimina. Los enfoques metodológicos para lograr este objetivo son múltiples y conocidos por el experto. Los ejemplos son la producción de un mutante que es predominantemente negativo para el gen dado. Tal mutante puede producirse por mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, eliminación, eliminación parcial, inserción o sustitución de ácido nucleico), mediante el uso de transposones adecuados, o por otros enfoques que son conocidos por el experto a partir de la literatura respectiva, cuya aplicación en el contexto de la presente invención se considera por lo tanto como de rutina. Un ejemplo de una técnica desarrollada recientemente que la persona experta consideraría como útil en el contexto de la presente invención es inactivación permanente mediante el uso de nucleasas de dedo de cinc dirigidas. Sigma Aldrich proporciona un kit respectivo tal como "CompoZR knockout ZFN". Otro enfoque abarca el uso de nucleasas efectoras del tipo activador de la transcripción (TALEN).

5 La administración de un constructo dominante negativo implica la introducción de una secuencia que codifica una enzima disfuncional, por ejemplo, mediante transfección. Dicha secuencia de codificación está acoplada funcionalmente a un promotor fuerte, de tal manera que la expresión génica de la enzima disfuncional anula la expresión natural de la enzima de tipo silvestre, que, a su vez, conduce a un defecto fisiológico efectivo de la actividad enzimática respectiva.

Una desactivación condicional permanente de un gen permite bloquear la expresión del gen de un modo específico del tejido o del tiempo. Esto se hace, por ejemplo, introduciendo secuencias cortas llamadas sitios loxP alrededor del gen de interés. De nuevo, otros enfoques son conocidos por el experto a partir de la literatura respectiva, y su aplicación en el contexto de la presente invención se considera rutinaria.

10 Otro enfoque es la alteración genética que puede conducir a un producto génico disfuncional o a un producto génico con actividad reducida. Este enfoque implica la introducción de mutaciones de desplazamiento del marco, mutaciones sin sentido (es decir, introducción de un codón de parada prematuro) o mutaciones que conducen a una sustitución de aminoácidos que hace que el producto génico completo sea disfuncional o que cause una actividad reducida. Dicha alteración génica puede producirse, por ejemplo, mediante mutagénesis (por ejemplo, eliminación, eliminación parcial, inserción o sustitución de ácido nucleico), bien sea mutagénesis inespecífica (aleatoria) o mutagénesis dirigida al sitio.

20 Los protocolos que describen la aplicación práctica de silenciamiento génico, desactivación de genes, inactivación permanente de genes, administración de un constructo negativo dominante, desactivación génica permanente condicional y/o alteración génica están comúnmente disponibles para el experto en la técnica, y dentro de su rutina diaria. La enseñanza técnica proporcionada en este documento está por lo tanto completamente habilitada con respecto a todos los métodos imaginables que conducen a una inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica o a la expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida.

25 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la célula es una célula eucariótica. El término "célula eucariota" abarca, pero no se limita a, células animales, tales como, por ejemplo, células de insectos, células vegetales y células fúngicas. Por consiguiente, una realización preferida de la invención permite que la célula sea una célula animal y/o una célula vegetal.

30 De acuerdo con aún otra realización preferida de la invención, la célula es una célula de mamífero. De acuerdo con aún otra realización preferida de la invención, la célula es al menos una seleccionada del grupo que consiste en:

- Células de riñón de hámster bebé (por ejemplo, BHK21)
- Células de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB o CHO-dhfr)
- Células de mieloma de ratón (por ejemplo, SP2/0 o NS0)
- Células de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK-293)
- 35 • Células derivadas de retina humana (por ejemplo, PER-C6) y/o
- Células amniocitos (por ejemplo, CAP).

40 Como se usa en el presente documento, el término "célula recombinante" se usa para referirse a una célula con ácido nucleico exógeno y/o heterólogo incorporado, ya sea incorporado de forma estable para permanecer incorporado en la expansión clonal de las células, o introducido transitoriamente en una célula (o una población de células). Tal ácido nucleico exógeno y/o heterólogo puede codificar para que se exprese una proteína heteróloga, o puede afectar la inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o la expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida.

45 Preferiblemente, la enzima que cataliza la amidación peptídica es una peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante (PAM). PAM es una proteína multifuncional que contiene dos actividades enzimáticas que actúan secuencialmente para catalizar el truncamiento C-terminal y la alfa-amidación peptídicas. La peptidilglicina monooxigenasa alfa-hidroxilante (PHM) cataliza la primera etapa de la reacción y es dependiente de cobre (Cu), o iones de cobre, ascorbato y oxígeno molecular. La peptidilamido-glicolato liasa dependiente de zinc (PAL) cataliza la segunda etapa de la reacción, la amidación de la prolina ahora C-terminal a prolinamida. Para un esquema de reacción del proceso

catalizado por ambas enzimas, véase la Figura 9. El gen o enzima real es, por supuesto, dependiente de la célula que se usa para la expresión de proteínas.

Un ejemplo de dicho gen o enzima es la peptidilglicina monooxigenasa humana alfa-amidante (ID del gen de acuerdo con la base de datos de genes del NCBI: 5066), cuyo gen codifica una proteína multifuncional que tiene dos dominios enzimáticamente activos con actividades catalíticas: (i) peptidilglicina monooxigenasa alfa-hidroxilante (PHM) y (ii) peptidil-alfa-hidroxiglicina liasa alfa-amidante (PAL). Estos dominios catalíticos funcionan secuencialmente para catalizar péptidos neuroendocrinos para activar productos alfa-amidados. Se han descrito múltiples variantes de transcritos empalmadas alternativamente que codifican diferentes isoformas para este gen, pero aún se desconocen algunas de sus secuencias de longitud completa. El gen se encuentra en 5q14-q21. En caso de que la célula utilizada para la expresión de proteínas sea una célula humana (por ejemplo, HEK, PER-C6 o CAP), preferiblemente está previsto que (i) la expresión génica de dicho gen se inhiba o reduzca, o que (ii) se exprese una enzima disfuncional o inactiva, o una enzima con actividad reducida, o que (iii) la actividad de dicha enzima se inhiba o se reduzca.

Otro ejemplo de dicho gen o enzima es peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante de hámsteres, como el hámster chino (*Cricetulus griseus*), del que se pueden derivar células CHO (células de ovario de hámster chino). La secuencia de genes respectiva aún no se ha publicado en bases de datos públicas, aunque existen bases de datos patentadas en las que se enumeran las etiquetas de secuencias de expresión (EST) respectivas.

En el caso de que la célula utilizada para la expresión de proteínas sea una célula de hámster (por ejemplo, BHK o CHO o CAP), preferiblemente está provisto que (i) la expresión génica de dicho gen se inhiba o se reduzca, o que (ii) se exprese una enzima disfuncional o inactiva, o una enzima con actividad reducida, o que (iii) la actividad de dicha enzima se inhiba o se reduzca.

Otro ejemplo para dicho gen o enzima es peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante murina (ID del gen: 18484), cuyo gen codifica una proteína multifuncional que tiene dos dominios enzimáticamente activos con actividades catalíticas: (i) peptidilglicina monooxigenasa alfa-hidroxilante (PHM) y (ii) peptidil-alfa-hidroxiglicina liasa alfa-amidante (PAL). Estos dominios catalíticos funcionan secuencialmente para catalizar péptidos neuroendocrinos a productos activos alfa-amidados. Se han descrito múltiples variantes de transcritos empalmadas alternativamente que codifican diferentes isoformas para este gen, pero aún se desconocen algunas de sus secuencias de longitud completa. El gen está ubicado en 1D; 1 57.5 cM

En caso de que la célula utilizada para la expresión de proteínas sea una célula de ratón (por ejemplo, SP2/0 o NS0), se preferiblemente está provisto que (i) la expresión génica de dicho gen se inhiba o se reduzca, o que (ii) se exprese una enzima disfuncional o inactiva, o una enzima con actividad reducida, o que (iii) la actividad de dicha enzima se inhiba o se reduzca.

Otros ejemplos comprenden a la proteína 1 que interactúa con el terminal COOH de la peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante de insecto (las ID de los genes son por ejemplo 5567876, 6053618 o 6043293) en caso de que la célula utilizada para la expresión de proteína sea una célula de insecto.

La peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante presente en otras células potenciales para la expresión de proteínas (como en levaduras, plantas, hongos filamentosos, o incluso bacterias) también estará abarcada por el alcance de la presente invención. Asimismo, otras enzimas capaces de amidación peptídicas, particularmente capaces de la formación de prolinamida, también estarán abarcadas por el alcance de la presente invención. La transferencia de las enseñanzas de la presente invención a estas enzimas no implica ninguna etapa inventiva adicional.

La célula o método de acuerdo con cualquiera de los aspectos y realizaciones mencionados anteriormente de la presente invención, en donde se inhibe o se reduce la expresión génica del gen que codifica dicha enzima que cataliza la amidación peptídicas, por medio de ARN de interferencia (ARNi).

El ARNi es un proceso de silenciamiento génico dependiente de ARN que está controlado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se inicia mediante moléculas pequeñas de ARN bicatenario en el citoplasma de una célula, donde interaccionan con el componente Argonauta del RISC catalítico. La vía de ARNi se encuentra en muchos eucariotas, incluidos los animales, y es iniciada por la enzima Dicer, que escinde moléculas largas de ARN bicatenario (ARNbc) en fragmentos cortos de -20 nucleótidos que se denominan ARNpi. Cada ARNpi se desenrolla en dos ARN monocatenarios, ARNmc, a saber, la cadena pasajero y la cadena guía. La cadena pasajero se degradará y la cadena guía se incorporará al complejo de silenciamiento inducido por ARN.

Para fines de silenciamiento génico en ingeniería genética, el ARN se importa directamente en el citoplasma y se escinde en fragmentos cortos por la enzima. El ARNbc iniciador también puede ser endógeno (que se origina en la

célula), como en los pre-microARN expresados a partir de genes que codifican ARN en el genoma. Las transcripciones primarias de dichos genes se procesan primero para formar la estructura característica de tallo-bucle de pre-miARN en el núcleo y luego se exportan al citoplasma para ser escindidos por Dicer. Por lo tanto, las dos vías de ARNbc, exógeno y endógeno, convergen en el complejo RISC.

5 Preferiblemente, se usan ARN bicatenarios largos (ARNbc, típicamente > 200 nt) para silenciar la expresión del gen que codifica para dicha enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica. Tras la introducción, los ARNbc se escinden en RNA de interferencia pequeños de 20-25 nucleótidos (ARNpi) por Dicer (etapa de iniciación). Luego, los ARNpi se ensamblan en RISC, que se desenrollan en el proceso.

10 Las cadenas de ARNpi guían posteriormente los RISC a moléculas de ARN complementarias, donde escinden y destruyen el ARN afín (etapa efectora). La escisión del ARN afín tiene lugar cerca del centro de la región unida por la cadena de ARNpi. En células cultivadas de mamíferos, el ARNi típicamente se induce mediante el uso de los ARNpi. Hay dos métodos generales para producir ARNpi en células cultivadas: administración de ARNpi sintéticos e introducción de un constructo de ADN que expresa secuencias de ARN de horquilla pequeña (ARNhp) que se procesan hasta ARNpi dentro de la célula. Los ARNpi y ARNhp respectivos utilizados en el contexto de la presente invención se muestran en la sección experimental.

Si el ARN de interferencia (ARNi) conduce a una inhibición no transitoria de la expresión génica que puede establecerse en la línea celular respectiva también en las células de la próxima generación, el resultado es una célula o línea celular desactivada o inactivada permanentemente.

20 De acuerdo con otra realización preferida adicional de la invención, la enzima que cataliza la amidación peptídica cataliza la formación de residuos de prolinamida C-terminal.

La cadena pesada de muchas inmunoglobulinas humanas tiene, en su C-terminal (por ejemplo, en la región constante), un motivo de secuencia que consiste en -Pro-Gly-Lys-COOH (código de una letra: PGK), en el que la Lys C-terminal es frecuentemente objeto de eliminación por carboxipeptidasas básicas, dejando así -Pro-Gly-COOH en el extremo C-terminal.

25 En muchos sistemas de expresión de proteínas, este motivo de secuencia es el objetivo de las enzimas que catalizan la  $\alpha$ -amidación peptídica, tal como la peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante, que, por ejemplo, convierte la peptidil-prolil-glicina C-terminal en peptidil-prolil- $\alpha$ -hidroxiglicina, y luego en peptidil-prolin- $\alpha$ -amida y glioxilato (véase la Figura 9 y la descripción respectiva).

30 La formación de residuos de prolinamida C-terminal se observa con frecuencia en la expresión proteica de anticuerpos monoclonales y sus derivados que comprenden una región constante de cadena pesada, tal como IgG, proteínas de fusión receptor-inmunoglobulina que tienen una región Fc de inmunoglobulina humana, tal como etanercept o aflibercept, o inmunotoxinas y el anticuerpo trifuncional que tiene una región Fc.

35 El término "expresión de proteína heteróloga", como se usa en este documento, se referirá a la expresión de proteína de un gen, un ácido nucleico o un ADNc, que es extraño a la célula en la que se produce la expresión ("célula huésped", o "sistema de expresión"). Heterólogo (que significa "derivado de un organismo diferente") se refiere al hecho de que a menudo la proteína transferida se clonó inicialmente o se derivó de un tipo de célula diferente o una especie diferente, y se obtuvo material genético codificante (por ejemplo, "ADNc") que luego se transfiere a la célula huésped. El material genético que se transfiere típicamente debe estar dentro de un formato que aiente a la célula receptora a expresar el ADNc como una proteína (es decir, es parte de un vector de expresión). Los métodos para transferir material genético extraño a una célula receptora incluyen transfección y transducción. La elección del tipo de célula receptora a menudo se basa en una necesidad experimental de examinar la función de la proteína en detalle, y los receptores más frecuentes, conocidos como sistemas de expresión heterólogos, se eligen, entre otros, para (i) facilidad de transferencia del ADN, (ii) capacidad de crear la proteína en una forma, función farmacéuticamente eficaces, (iii) rendimiento de proteína y similares.

45 El término "expresión de proteína recombinante" se superpone en gran medida con el término "expresión de proteína heteróloga". El término "recombinante" alude al hecho de que se ha introducido material genético (codificante) "nuevo" en un sistema de expresión, por ejemplo, una célula. Tal proceso da como resultado la formación de un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un ADN recombinante), y el huésped se denomina por lo tanto un huésped recombinante, por ejemplo, una célula recombinante. Una idea detrás de este proceso es producir una proteína de un organismo (por ejemplo, una proteína humana) en otro organismo, por ejemplo, en un sistema de expresión de proteínas basado en células, tal como una célula CHO.

Preferiblemente, dicha proteína es al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

- un anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo
- una proteína de fusión,
- un mimético de anticuerpo, y/o
- proteínas que no son anticuerpos.

5 El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se referirá a inmunoglobulinas, o fragmentos o derivados de las mismas. Particularmente preferido, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgD, IgE, IgA y/o IgM, o un fragmento o derivado del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a fragmentos de dicho anticuerpo que retienen, en algunos casos, capacidades de unión a objetivos, por ejemplo

- 10
- una CDR (región determinante de complementariedad)
  - una región hipervariable,
  - un dominio variable (Fv)
  - una cadena pesada de IgG (que consiste en regiones VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3)
  - una cadena ligera de IgG (que consiste en regiones VL y CL), y/o
- 15
- a Fab y/o F(ab)<sub>2</sub>

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se referirá a constructos de proteínas que son estructuralmente diferentes de, pero que todavía tienen alguna relación estructural con, el concepto de anticuerpo común, por ejemplo, scFv, así como constructos de anticuerpos biespecíficos, trispecíficos o superiores, proteínas de fusión basadas en anticuerpos, conjugados anticuerpo-fármaco, inmunotoxinas y similares.

20 El término "mimético de anticuerpo" se refiere a una molécula de proteína de unión a objetivo no basada en inmunoglobulina. Tales miméticos de anticuerpos se derivan, por ejemplo, de proteínas de repetición de anquirina, lectinas de tipo C, proteínas del dominio A de *Staphylococcus aureus*, transferrinas, lipocalinas, fibronectinas, inhibidores de proteasa de dominio de Kunitz, ubiquitina, nudos de cisteína o knotinas, tiorredoxina A, y así sucesivamente, y son conocidos por el experto en la materia a partir de la literatura respectiva.

25 El término "proteína de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere principalmente a proteínas de fusión receptor-inmunoglobulina que tienen, por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina humana.

Preferiblemente, las células y los métodos de acuerdo con la presente invención son adecuados para la producción (recombinante) de proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a todas o parte de una de las siguientes proteínas: un ligando Flt3, un ligando CD40, proteínas estimulantes de eritropoyesis tales como eritropoyetina (EPO), darbepoyetina que incluye darbepoyetina alfa, y trombopoyetina, calcitonina, leptina, un ligando Fas, un ligando para el activador receptor de NF-kappa B (RANKL), un ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL), linfopoyetina derivada de estroma tímico, el factor estimulante de colonias de granulocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento de mastocitos, el factor de crecimiento de células madre, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de queratinocitos, el factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos, RANTES, hormona de crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a la insulina, hormona paratiroidea, interferones que incluyen interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$  e interferón  $\gamma$ , factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP1-5), neurotrofina 3, glucagón, interleuquinas incluyendo IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18, factores estimulantes de colonias, linfotoxina p, factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M y varios ligandos para moléculas de superficie celular ELK y Hek (tales como los ligandos para quinasas relacionadas con Eph o LERKS).

Otras proteínas que se pueden producir usando los métodos y medios de la invención incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista de dicho receptor de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas.

También, las proteínas que se pueden producir usando los métodos y medios de la invención incluyen proteínas que comprenden todo o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (denominadas proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estos. Los ejemplos de dichos antígenos son antígenos de diferenciación que incluyen CD20, CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 y ligandos a los mismos.

- 5 Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden producir usando los métodos y medios de la invención. Los ejemplos incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas, o sus ligandos, o proteínas sustancialmente similares a uno de estos: miembros de la familia metaloproteínasa-desintegrina, quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-1, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1  
10 antitripsina, enzima convertidora del TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

Breve descripción de los ejemplos y dibujos

- 15 Detalles adicionales, características, características y ventajas del objeto de la invención se divulgan en las reivindicaciones dependientes, y la siguiente descripción de las figuras y ejemplos respectivos, que, a manera de ejemplo, muestran realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, estos dibujos no deberían entenderse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención.

Figuras

En todas las figuras, las barras de error muestran la desviación estándar. Todos los resultados mostrados se analizaron adicionalmente con la prueba t de Student (véase a continuación).

- 20 Figura 1: silenciamiento del ARNm de PAM usando ARNpi (Invitrogen) en células CHO K1 PD./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células CHO K1 PD no transfectadas, + K: células CHO K1 PD transfectadas con ARNpi mezclado (Ambion).

Figura 2: silenciamiento de ARNm de PAM usando ARNpi (Ambion) en células CHO K1 PD./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células CHO K1 PD no transfectadas, +K: células CHO K1 PD transfectadas con ARNpi mezclado (Ambion).

- 25 Los experimentos mostrados en las Figuras 1 y 2 se diseñaron para evaluar el efecto silenciador sobre el gen PAM mediante ARNpi proporcionado por Invitrogen o Ambion. Las células CHO K1 PD se transfectaron mediante ARNpi para determinar la secuencia con el efecto de silenciamiento más potente. Esto también se demostró calculando el % de disminución en la expresión del ARNm de PAM (Tabla 9) y usando la prueba t de Student (Tabla 10).

- 30 Figura 3: silenciamiento de ARNm de PAM usando ARNhp en el clon K25./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células K25 no transfectadas.

Figura 4: silenciamiento de ARNm de PAM usando ARNhp en el clon K62./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células K62 no transfectadas.

Figura 5: silenciamiento de ARNm de PAM usando ARNhp en la línea celular parental CHO K1 PD./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células CHO K1 PD no transfectadas.

- 35 Figura 6: silenciamiento de ARNm de PAM usando ARNhp en la línea celular parental CHO SSF3./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células CHO SSF3 no transfectadas.

- 40 Los experimentos mostrados en las Figuras 3-6 se diseñaron para evaluar el nivel de expresión de ARNm de PAM usando diferentes ARNhp y diferentes concentraciones de puromicina (PURO) en líneas celulares analizadas. El mayor efecto de silenciamiento se observó utilizando sh6 (si se usa solo o en mezcla con sh5) en todas las líneas celulares, respectivamente. Esto también se demostró calculando el % de disminución en la expresión del ARNm de PAM (Tabla 11) y usando la prueba t de Student (Tabla 12). Solo se observó una reducción menor del nivel de expresión usando 5 µg/mL de puromicina. El silenciamiento de PAM se determinó en el nivel de ARNm y de proteína, respectivamente.

- 45 Figura 7: Correlación entre el nivel de expresión de ARNm de PAM y el contenido de prolinamida de mAb./1: paralelo 1,/2: paralelo 2, -K: células K25 y K62 no transfectadas.

Figura 8: Gráfico del vector *pSilencer 2.1-U6* puro

Figura 9: Reacción catalizada por peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante (PAM). PAM es una proteína multifuncional que contiene dos actividades enzimáticas que actúan secuencialmente para catalizar el truncamiento C-terminal y la alfa-amidación de péptidos. La peptidilglicina monooxigenasa alfa-hidroxilante (PHM) cataliza la primera etapa de la reacción (peptidilglicina (C-terminal) → peptidil- $\alpha$ -hidroxiglicina) y es dependiente de cobre (Cu), o iones de cobre, ascorbato y oxígeno molecular. La peptidilamido-glicolato liasa (PAL) dependiente de zinc cataliza la segunda etapa de la reacción (peptidil- $\alpha$ -hidroxiglicina → péptido- $\alpha$ -amida y glioxilato). La figura fue tomada de Prigge et al., Science (1997) 278, 1300-1305.

Experimentos

10 1. Silenciamiento de genes basado en ARNpi

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son una línea celular derivada del ovario del hámster chino (*Cricetulus griseus*). A menudo se usan en investigaciones biológicas y médicas y comercialmente en la producción de proteínas terapéuticas. Por esta razón, se demostró experimentalmente que reduce la actividad de amidación peptídica en una línea celular CHO. La secuencia exacta de la enzima responsable de la formación de prolinamida en células CHO no se publica en la literatura ni en las bases de datos públicas. Las secuencias de nucleótidos potenciales se extrajeron de una base de datos EST de CHO patentada. Con base en esta información de secuencia, se construyeron ARNpi y se evaluó su efecto silenciador. Los ARN de horquilla corta (ARNhp) se construyeron sobre la base de resultados de ARNpi, y la supresión génica se evaluó en el nivel de ARNm y proteína.

Después de la determinación de la secuencia de nucleótidos de peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante de *C. griseus* (Tabla 1), se diseñaron 9 y 6 secuencias de ARNpi. El efecto silenciador se ensayó después de la transfección y cultivo de dos líneas celulares parentales CHO y dos líneas celulares CHO productoras de mAb, una que produce un producto que contiene un nivel alto y uno con un nivel bajo de prolinamida, respectivamente. Después del cultivo, el nivel de ARNm de PAM se determinó mediante qPCR y se seleccionaron dos silenciadores con el efecto más potente para el diseño de ARNhp. Después de la transfección de células usando ARNhp y el posterior cultivo celular, se analizaron tanto el nivel de ARNm como el de PAM. Los detalles experimentales se presentan a continuación.

Tabla 1: secuencia del gen PAM extraída de una base de datos EST de CHO patentada.

<p>Secuencia del gen PAM extraída de una base de datos EST de CHO patentada utilizada para la construcción de ARNpi (SEQ ID No 1):</p> <pre> GGGAGTGCTCCTAAGCCAGGCCAGTTCAGTGTTCCCTCACAGTTTGGCCCTTGTGCCTCATTTGGACCAGTTG TGTGTGGCAGACAGGGAAAATGGCCGGATCCAATGTTTCAGAACTGACACCAAAGAATTTGTGAGAGAGATT AAACATGCGTCATTTGGGAGAAAATGTATTCGCAATTTTCATATATATCAGGTTTGTCTTTGCAGTAAATGGG AAGCCTTACTTTGGAGACCATGAACCTGTGCAAGGCTTTGTGATGAACTTTTCCAGTGGGGAAAATATAGAT GTCTTCAAGCCAGTACGCAAGCACTTTGACATGCCTCACGATGTGGTTGCCTCTGACGATGGGAAATGTGTAC ATTGGAGACGCACACACGAACACGGTGTGGAAGTTACCCCTGACTGAAAAAATGGAGCATCGATCGGTTAAA AAGGCAGGCATTGAGGCTCAGGAAAATCAAAGAAACCGAGGCAGTTGTTGAATCCAAAATGGAGAACAACCC ACCTCCTCAGAATTGCAGAAGATGCAAGAGAAACAGAAACTGATCAAAGAGCCAGGTTCCGGGAGTGCCCGTG GTTCTCATTACAACCCTTCTGGTTATTCCTGTGGTTGTCTGCTGGCCATTGTCATGTTTATTCGGTGGAAA AAATCAAGGGCCTTTGGAGGAAAA                     </pre>
--

Diseño y preparación de ARNpi y ARNhp

Se utilizaron herramientas de diseño respectivas para diseñar secuencias de ARNpi contra el gen de la peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante (PAM). Con base en la secuencia del gen, se diseñaron ARNpi de diferentes secuencias y longitudes (9 por Invitrogen y 6 por Ambion) (Tabla 2). Después de la evaluación del ARNpi, se diseñaron los ARNhp utilizando la herramienta de diseño en línea de Ambion. Dos oligonucleótidos complementarios para cada ARNhp fueron sintetizados por Methabion (Tabla 3) y luego se hibridaron para generar oligonucleótidos bicatenarios en casa. Posteriormente, los oligonucleótidos hibridados se clonaron en el vector *pSilencer2.1-U6* Puro (Figura 8). La secuenciación del ADN se realizó para verificar la secuencia del inserto de oligonucleótidos.

Tabla 2: secuencias de nucleótidos de ARNpi

Nombre	ARNpi_Oligonucleótido	SEQ ID No
ARNpi_1	CAGUUGUGUGUGGCAGACAGGGAAA	2
ARNpi_2	CGGAUCCAAUGUUUCAGAACUGACA	3
ARNpi_3	CCAAUGUUUCAGAACUGACACCAA	4
ARNpi_4	GAGAGAGAUUAAACAUGCGUCAUUU	5
ARNpi_5	CAUGCGUCAUUUGGAGAAAUGUAU	6
ARNpi_6	UGGAGAAAUGUAUUCGCAAUUUCA	7
ARNpi_7	GGGAGAAAUGUAUUCGCAAUUUCAU	8
ARNpi_8	CACACGAACACGGUGUGGAAGUUCA	9
ARNpi_9	CAAAGAAACCGAGGCAGUUGUUGAA	10
ARNpi_1	CAGUAAAUGGGAAGCCUJATT	11
ARNpi_2	AGGCAGUUGUUGAAUCCAATT	12
ARNpi_3	AACAGAAACUGAUCAAAGATT	13
ARNpi_4	CAAGAGAAACAGAAACUGATT	14
ARNpi_5	GAACUGACACCAAAGAAUUTT	15
ARNpi_6	UUUCAGAACUGACACCAAATT	16

Tabla 3: Secuencias de nucleótidos de ARNhp

Nombre	ARNhp_Oligonucleótido de cadena sentido	SEQ ID NO	ARNhp_Oligonucleótido de cadena antisentido	SEQ ID NO
SH5_HLP AM	5' GATCCGAACTGACACCA AAGAATTCTCAAGAGAAAT TCTTTGGTGTTCAGTTCTGT TTTTTGGAAA-3'	17	5' AGCTTTTCCAAAAAACAGAAC TGACACCAAAGAATTTCTCTTGA GAATTCTTTGGTGTTCAGTTTCG- 3'	19
SH6_HLP AM	5' GATCCGTTTCAGAACTG ACACCAAACCTCAAGAGATT TGGTGTTCAGTTCTGAAACA TTTTTTGGAAA-3'	18	5' AGCTTTTCCAAAAAATGTTTC AGAAGTACACCAAATCTCTTGA GTTTGGTGTTCAGTTCTGAAACG- 3'	20

Reconstitución de ARNpi

## ES 2 688 727 T3

Los ARNpi se reconstituyeron en agua DEPC hasta una concentración final de 40  $\mu\text{M}$ . Se usaron 30 pmoles de ARNpi para cada nucleofección paralela.

Clonación de insertos de ARNpi en horquilla en el vector pSilencer

Se hibridaron dos oligonucleótidos complementarios para cada ARNhp para generar oligonucleótidos bicatenarios. Posteriormente, los oligonucleótidos hibridados se clonaron en el vector pSilencer2.1-U6 puro utilizando los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III. El procedimiento completo se realizó de la siguiente manera:

1. Disolver los oligonucleótidos de la plantilla de ARNpi en horquilla en aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
2. Diluir los oligonucleótidos hasta aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en TE.
- 10 3. Ensamblar los 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de hibridación de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4: Hibridación de los ARNpi

Cantidad	Componente
2 $\mu\text{L}$	oligonucleótido de la plantilla de ARNpi sentido
2 $\mu\text{L}$	oligonucleótido de la plantilla de ARNpi antisentido
46 $\mu\text{L}$	solución de hibridación 1XADN

4. Calentar la mezcla a 90°C durante 3 minutos, luego colocarla en una incubadora a 37°C e incubar durante 1 h.
5. Diluir 5  $\mu\text{L}$  del inserto de la plantilla de ARNpi en horquilla hibridado con 45  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa hasta una concentración final de 8 ng/ $\mu\text{L}$ .
- 15 6. Preparar dos reacciones de ligación de 10  $\mu\text{L}$ ; mas una ligación de inserto y menos un control negativo de inserto

A cada tubo, añadirle los siguientes reactivos (Tabla 5):

Tabla 5: Reacciones de ligación

Más inserto	Menos inserto	Componente
1 $\mu\text{L}$	--	inserto de ARNpi hibridado diluido
--	1 $\mu\text{L}$	solución de hibridación de 1x ADN
6 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$	agua libre de nucleasas
1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	regulador ADN ligasa T4 10x
1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	Vector p <i>Silencer</i>
1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	Ligasa T4 ADN (5 U/mL)

7. Incubar a 16°C durante la noche.
8. Usar para la transformación el sistema vector pGEM-T Easy (Promega, Cat. No. : A13801):

## ES 2 688 727 T3

- a) Colocar las células competentes JM109 de *E. coli* en un baño de hielo hasta que se descongelen.
- b) Transferir 50 µL de células a los tubos de reacción de ligación y añadir 3 µL de reacción de ligación a cada tubo. golpear suavemente los tubos e incubar por 20 min.
- 5 c) Someter a choque térmico las células durante 50 s en baño de agua a 42°C. Inmediatamente devolver los tubos a hielo durante 2 min.
- d) Añadir 950 µL de medio LB a las reacciones de transformación e incubar durante 1,5 horas a 37°C con agitación (225 rpm).
- e) Colocar 100 µL de cada cultivo de transformación en placas de LB/ampicilina e incubar durante la noche a 37°C.
- 10 f) para identificar clones con los clones con el inserto de la plantilla de ARNpi, recoger los clones, aislar el ADN de plásmido y digerir con *BamHI* y *HindIII*, para confirmar la presencia del inserto de la plantilla de ARNpi de ~65 pb.
9. Secuenciar el inserto utilizando los siguientes cebadores de secuenciación (Tabla 6):

Tabla 6: cebadores de secuenciación

Cebador de secuenciación directa (SEQ ID No 21)	Cebador de secuenciación inversa (SEQ ID No 22)
5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3'	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

15 Después del aislamiento y la verificación de los constructos de expresión de ARNhp, se linealizaron usando la endonucleasa de restricción de corte único *SspI* (AAT/ATT). Se digirieron máximo 50 µg de ADN plasmídico por reacción usando la enzima *SspI* a razón de 3 U/µg de ADN (New England Biolabs, Cat. No.: R0132L). Se añadió a la reacción una cantidad apropiada de regulador de reacción 10x y H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó a 37°C durante 3 horas. Después de la digestión, la precipitación del ADN se realizó en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar como se describe en el siguiente protocolo:

1. Agregar 1 volumen de isopropanol (300 µL)
- 20 2. Someter a agitación tipo vórtice completamente
3. Centrifugar durante 30 min a 21.000 g a 4°C
4. Descartar el sobrenadante
5. Agregar cuidadosamente 1 volumen de etanol estéril, al 70% enfriado en hielo
6. Centrifugar durante 1 min a velocidad máxima, a 4°C
- 25 7. Descartar el sobrenadante
8. Secar al aire el precipitado a TA durante 5-30 min (en cabina laminar)
9. Resuspender el ADN en 50 µL de agua estéril.

A continuación, se determinaron la pureza (DO 260/280 nm) y la concentración de ADN lineal usando NanoDrop ND-1000.

30 Células huésped

Se usaron cuatro líneas celulares diferentes durante el estudio (líneas celulares CHO K1 PD y SSF3 parentales y dos clones productores de mAb, K25 y K62). La línea celular CHO K1 PD es una subpoblación de la línea celular CHO K1 que se origina en ATCC (Cat. No. CCL-61.3). La línea celular original se adaptó al cultivo en suspensión

5 libre de suero y se sometió a 3 rondas de selección sucesivas a densidades de siembra cada vez más diluidas para mejorar la frecuencia de subclonación sin suero en medio DM122. La línea celular CHO SSF3 es una línea celular adaptada libre de suero de DUKXB1. DUKXB1 se derivó de células CHO K1. Ambos alelos funcionales *dhfr* se inactivaron secuencialmente en CHO K1. Sin embargo, los resultados mostraron que uno de los alelos no se inactiva de manera irreversible. El cultivo continuo libre de suero indujo inesperadamente la expresión de baja actividad de dihidrofolato reductasa en las células CHO originalmente deficientes en dihidrofolato reductasa (*dhfr*).

10 K25 y K62 se prepararon por transfección de las células parentales SSF3 con el vector plasmídico pBW2017. Se demostró en experimentos previos que ambos clones están expresando un producto de mAb que contiene estructuras indeseadas de prolinamida. K25 y K62 se incluyeron en experimentos de silenciamiento ya que los productos respectivos de mAb contenían dos valores extremos de prolinamida, es decir, un bajo contenido de prolinamida en el mAb producido por K25 (4%) y un alto contenido de prolinamida en el mAb producido por K62 (14%).

#### Nucleofección

15 El sistema de nucleofección de Amaxa se usó para la transfección celular (kit Nucleofector V, Cat. No.: VCA-1003). No se transfectan más de 5 grupos a la vez, para permitir el tiempo suficiente para todas las manipulaciones necesarias de células. Un protocolo detallado se describe a continuación:

1. En el momento de la transfección, las células deben ser de hasta 2E6/mL con una viabilidad  $\geq$  90%.
2. Se usaron 5E6 células por nucleofección.
3. Contar las células y centrifugar a 90  $\times$ g, 10 min, RT en un tubo de centrifuga de 50 mL.
- 20 4. Retirar con cuidado el resto del medio y resuspender el sedimento celular en la solución V (100  $\mu$ L por transfección)
5. Agregar ADN (30 pmol de ARNpi/nucleofección o 3  $\mu$ g/nucleofección de ARNhp) y mezclar suavemente.
6. Agregar 100  $\mu$ L de suspensión celular mezclada con ADN en la cubeta de transfección, colocarla en un dispositivo Nucleofector Amaxa.
- 25 7. Transfectar las células mediante nucleofección usando el programa Amaxa U 23
8. Agregar algún medio de crecimiento en la cubeta y transferir las células cuidadosamente en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio. Enjuagar la cubeta 1-2x con medio fresco y agregarlo al matraz de agitación. Incubar las células durante 24-48 h en un agitador (120 rpm), a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>.

#### Medio de crecimiento

30 Se cultivaron células CHO K1 PD en un medio adecuado para cultivar células de mamífero, tales como medio de cultivo DM122 complementado con L-glutamina 8 mM (Sigma, Cat. No.: G7513). Las células CHO SSF3 se cultivaron en medio de cultivo DM122 complementado con L-glutamina 8 mM (Sigma, Cat. No.: G7513) y 1 mg/L de insulina (Millipore, Cat. No.: 10131-027). K25 y K62 se cultivaron en medio de cultivo DM122 complementado con L-glutamina 8 mM (Sigma, Cat. No.: G7513), 1 mg/L insulina (Millipore, Cat. No. : 10131-027) y metotrexato 150 nM (metotrexato)hidratado, Sigma, Cat. No.: M8407). Las etapas de selección celular se realizaron en el mismo medio complementado adicionalmente con 3  $\mu$ g/mL y posteriormente 5  $\mu$ g/mL de puromicina (Gibco, Cat. No.: A11138-02).

35

#### Descongelación/congelación de células

Los viales se descongelaron en etanol al 70% a 37°C. Las células se inocularon gota a gota directamente en matraces de agitación de 250 mL que contenían 50 mL de medio precalentado a una densidad celular inicial de cca. 40 1E5 células viables por mL. Las células se cultivaron a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>, 120 rpm. Las células se congelaron en la fase de crecimiento exponencial a una viabilidad > 90%. Se congelaron 5-10E6 células viables por vial en medio acondicionado que contenía DMSO al 7,5%. Primero, el cultivo celular se centrifugó a 180 g, 5 min, a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante redundante. Posteriormente, se añadió DMSO a una concentración final de 7,5%. Los sedimentos celulares se resuspendieron suavemente. Los crioviales se llenaron con 1 mL de suspensión celular y se transfirieron a un congelador a -80°C en una caja criogénica Mr. Frosty. En 1 mes, los viales congelados se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido.

45

Cultivo y manejo de células

5 Para los experimentos con ARNpi, se transfectaron células CHO K1 PD con ARNpi usando nucleofección y se cultivaron durante cuatro días. El día cuatro, se recolectaron sedimentos celulares para el análisis de qPCR. Para los experimentos con ARNhp, las cuatro líneas celulares (CHO K1 PD, CHO SSF3, K25 y K62) se transfectaron con ARNhp usando nucleofección. Las células se dividieron en un programa de 2-2-3 días a 2-3E5 células por mL en el medio precalentado adecuado para mantener el crecimiento celular exponencial. Después de alcanzar la densidad celular y la viabilidad adecuadas, las células se dividieron y se procesaron adicionalmente en cuatro etapas separadas:

1. se recolectaron muestras para qPCR (sedimentos celulares)
- 10 2. se inoculó un lote de 10 días que contenía 3 µg/mL de puromicina (después de 10 días se recogieron los sobrenadantes para el análisis CEX)
3. se congelaron 3 viales de células de cada cultivo celular
4. las células se cultivaron adicionalmente en el medio que contenía 5 µg/mL de puromicina.

15 Después de alcanzar la densidad y viabilidad celular apropiadas usando 5 µg/mL de puromicina, se repitieron las etapas 1, 2 y 3.

Las células se cultivaron en matraces de agitación de 125 mL. Condiciones de incubación: 37°C, 90-110 rpm para matraces de agitación de 125 y 250 mL y 10% de CO<sub>2</sub> para medio DM122

Selección de puromicina

20 La selección de antibióticos usando puromicina fue la primera etapa de selección después de la transfección. Todos los grupos transfectados se seleccionaron usando puromicina a una concentración final de 3 mg/mL. Se añadió puromicina al cultivo celular 2 días después de la transfección cuando la viabilidad celular excedía el 60%. Después de que cada grupo alcanzó al menos un 85% de viabilidad celular, se procedió con la selección usando 5 mg/mL de puromicina.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

25 Se añadieron 10 ng de ARN de luciferasa (Promega, Cat. No.: L4561) a 5E6 células antes del aislamiento del ARN. El ARN total (ARNtot) se aisló usando Kit Mini RNeasy (Qiagen, Cat. No.: 74104) en la estación de trabajo automatizada QIAcube. Después del aislamiento, la concentración de ARNtot se midió en NanoDrop. Posteriormente, se añadió DNasa I (Ambion, Cat. No.: AM1906) a 5 µg de ARNtot (Tabla 7) y se incubó (25 min a 37°C, 10 min a 75°C). Después del tratamiento con ADNasa, el ARN se transcribió en ADNc usando el kit SuperScript VILO (Invitrogen, Cat. No.: 11754-050).

30

Tabla 7: tratamiento con ADNasa I y síntesis de ADNc

Tratamiento con DNasa		Síntesis de ADNc	
5µg de ARNtot	X µL	ARNtot tratado con DNasa	5 µL
Regulador DNasa I 10x	5 µL	Mezcla de reacción VILO 5x	4 µL
DNasa I	5 µg	Enzima superscript 10x	2 µL
Agua NF	hasta 50µL	Agua DEPC	9 µL

qPCR

Se usó un método de qPCR con base en química de TaqMan para la determinación del nivel de ARNm (TaqMan MasterMix, Applied Biosystems, Cat. No.: 4326708 y ensayo por diseño, Applied Biosystems, Cat. No.: 4331348,

véase la Tabla 8). El nivel de expresión de ARNm de PAM se calculó usando la cuantificación absoluta y se expresó como el número de transcritos de ARNm por célula, así como por el gen de referencia ACTB ( $\beta$ -actina). En el caso del cálculo por gen ACTB, se construyó una curva patrón usando ADN genómico aislado y se usó para la determinación del número de copias de ARNm de ACTB. Se determinó la relación entre el ARNm de PAM y ACTB. Cuando se calculó el número de copias de ARNm por célula, se construyó una curva estándar usando ADN de luciferasa y se determinó el número de copias de ARNm para la luciferasa. La relación entre el ARNm de PAM y LUC se calculó luego, y se determinó el nivel de ARNm de PAM por célula (véanse las Figuras 1- 6).

Tabla 8: Secuencias de nucleótidos de cebadores y sondas de qPCR

	Cebador directo	SEQ ID NO	Cebador inverso	SEQ ID NO	Sonda	SEQ ID NO
PAM	GGCCGGAT CCAATGTT TCAGAA	23	TCCCAAATGA CGCATGTTTA ATCTCT	26	FAM- CTGACACCAA AGAATTT	29
ACTB	AGCCACGC TCGGTCAG	24	CATCCTGCGT CTGGACCT	27	FAM- CCGGGACCTG ACAGACT	30
LUC	CTGATTTT TCTTGCGT CGAGTTT	25	GAGTTGTGTT TGTGGACGAA GTAC	28	FAM- TCCGGTAAGA CCTTTCG	31

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

- 10 Los mAb purificados con proteína A se analizaron mediante CEX usando un sistema cromatográfico HPLC analítico. Usando este método, Lys y prolinamida se eluyen en el mismo pico. La cantidad de prolinamida se determinó adicionalmente mediante el tratamiento del extremo C del producto con carboxipeptidasa. Seguido por el mismo análisis CEX, el pico restante presenta la cantidad de prolinamida.

Resultados experimentales

- 15 El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto silenciador sobre el gen PAM mediante ARNpi y ARNhp. El silenciamiento de PAM se determinó en el nivel de ARNm y de proteína, respectivamente. Las células CHO K1 PD se transfirieron mediante ARNpi para determinar la secuencia con el efecto de silenciamiento más potente (Figuras 1-2 y Tablas 9-10).

Tabla 9: efecto de silenciamiento en % de diferencia cuando se calcula por ACTB o por LUC.

ARNpi Invitrogen			ARNpi Ambion		
	Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC		Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC
si1	60,5	50,2	si1	31,9	32,1
si2	79,7	78,4	si2	56,1	62,4
si3	85,7	83,8	si3	45,2	50,6
si4	68,0	64,7	si4	52,0	56,5
si5	78,0	73,3	si5	73,2	74,1
si6	89,6	89,1	si6	71,9	74,0

ARNpi Invitrogen			ARNpi Ambion		
	Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC		Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC
si7	87,9	85,6			
si8	85,5	83,9			
si9	55,0	51,8			

Tabla 10: Prueba t de Student

ARNpi Invitrogen			ARNpi Ambion		
	Valor p	Valor p		Valor p	Valor p
si1	0,11	0,09	si1	0,58	0,16
si2	0,06	0,11	si2	0,32	0,04
si3	0,06	0,03	si3	0,44	0,03
si4	0,09	0,06	si4	0,36	0,03
si5	0,07	0,04	si5	0,22	0,01
si6	0,05	0,03	si6	0,23	0,02
si7	0,05	0,03			
si8	0,06	0,03			
si9	0,13	0,0			

5 A partir de los resultados mostrados anteriormente (Figuras 1-2 y Tabla 9) se puede concluir que existe una  
 10 disminución de hasta 90% en la expresión de ARNm de PAM usando ARNpi de Invitrogen y hasta 75% de  
 15 disminución usando ARNpi de Ambion. La prueba t de Student (Tabla 10) se realizó para determinar cuáles ARNpi  
 difieren significativamente del control negativo. Los resultados muestran las mismas observaciones que las  
 obtenidas después de la diferencia porcentual del cálculo (el valor p más bajo presenta una mayor diferencia en la  
 expresión en comparación con el control negativo). Sobre la base de estos resultados, se seleccionaron dos  
 secuencias de ARNpi y se construyeron vectores de ARNhp (si5, si6 para PAM). Debido a las limitaciones del diseño  
 de ARNhp, solo se usaron secuencias de ARNpi de Ambion para la construcción de ARNhp. Para evaluar el  
 silenciamiento de PAM se transfectaron dos líneas celulares parentales CHO K1 PD y SSF3 y dos clones que  
 producen mAb (K25 con bajo y K62 con alto contenido de prolina en el producto) con cada uno de los dos  
 ARNhp respectivamente y con la mezcla de ambos. La selección de las células transfectadas se realizó con dos  
 concentraciones diferentes de puromicina consecutivamente (Figuras 3-6). El silenciamiento de PAM se evaluó  
 adicionalmente en el nivel de proteína por análisis CEX del mAb producido y se determinó la correlación con el nivel  
 de ARNm (Figura 7).

Los resultados en las Figs. 3-6 muestran el nivel de expresión de ARNm de PAM usando diferentes ARNhp y  
 diferentes concentraciones de puromicina (PURO) en líneas celulares analizadas. El mayor efecto de silenciamiento  
 se observó utilizando sh6 (si se usa solo o en la mezcla con sh5) en todas las líneas celulares, respectivamente.  
 Esto también se demostró calculando el % de disminución en la expresión del ARNm de PAM (Tabla 11) y usando la

ES 2 688 727 T3

prueba t de Student (Tabla 12). Solo se observó una reducción menor del nivel de expresión usando 5 µg/mL de puromicina.

Tabla 11: efecto de silenciamiento en % de diferencia cuando se calcula por ACTB o por LUC

		Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC			Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC
K25 3 µg PURO	sh5/1	-50,8	-18,8	K62 3 µg PURO	sh6	44,9	38,8
	sh6/1	58,6	56,9		sh5+6	55,1	66,5
	sh5+6/1	45,2	48,6				
K25 5 µg PURO	sh5/1	16,2	47,0	K62 5 µg PURO	sh6	38,8	52,0
	sh6/1	63,7	76,6		sh5+6	41,9	47,3
	sh5+6/1	27,0	45,9				
PD 3 µg PURO	sh5	32,1	37,7	SSF3 3 µg PURO	sh5	2,0	18,5
	sh6	63,2	65,1		sh6	30,5	20,8
PD 5 µg	sh5	48,9	55,7	SSF3	sh5	38,8	55,4
PURO	sh6	80,3	83,1	5µg PURO	sh6	56,8	67,9

Tabla 12: Prueba t de Student

		Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC			Silenciamiento [%] por ACTB	Silenciamiento [%] por LUC
K25 3 µg PURO	sh5/1	0,06	0,67	K62 3mg PURO	sh5	0,02	0,27
	sh6/1	0,04	0,27		sh6	0,01	0,01
	sh5+6/1	0,04	0,33				
K25 5 µg PURO	sh5/1	0,56	0,35	K62 5mg PURO	sh5	0,09	0,24
	sh6/1	0,04	0,18		sh6	0,02	0,05
	sh5+6/1	0,17	0,35				
PD 3 µg PURO	sh5	0,17	0,01	SSF3 3mg PURO	sh5	0,94	0,68
	sh6	0,03	0,00		sh6	0,51	0,70
PD 5 µg PURO	sh5	0,07	0,00	SSF3 5mg PURO	sh5	0,06	0,12
	sh6	0,01	0,00		sh6	0,17	0,16

Los resultados en la Figura 7 muestran una correlación entre ARNm y mAb modificado con PAM. Esta correlación también se muestra al calcular la función de Pearson (se determinó que el coeficiente de correlación de Pearson era de 0,55).

2. Desactivación permanente de genes dirigida en células CHO mediante el uso de nucleasas de dedo de cinc (ZFN)

5 Las ZFN pueden diseñarse para dirigirse a un locus elegido con alta especificidad. Tras la expresión transitoria de estas nucleasas, el gen objetivo es escindido primero por las ZFN y luego reparado por un proceso de reparación de ADN natural, pero imperfecto, unión final no homóloga. Esto a menudo resulta en la generación de alelos mutantes (nulos). Tal enfoque se describe, por ejemplo, en Santiago et al., 2008 ("Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases", PNAS, 15 de abril de 2008, volumen 105 no. 15).

10 Las nucleasas con dedos de zinc específicas del sitio que se dirigen al locus del gen PAM se diseñan y se seleccionan *in vitro* para unión del ADN a sus sitios objetivo. La función de nucleasa de ZFN es conferida por el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI*, que está unida a las proteínas dedos de zinc que se unen al ADN.

Los plásmidos que expresan cada par de ZFN se transfectan en células CHO. La frecuencia de la ruptura mediada por ZFN en el sitio objetivo en cada conjunto de células se determina usando una nucleasa CEL-I.

15 Las líneas celulares PAM<sup>-/-</sup> se generan transfectando células CHO con un par de ZFN y luego realizando una etapa de clonación (por ejemplo, limitando la dilución, ClonePix<sup>MR</sup> [Molecular Devices Ltd., RU] o clasificación por citometría de flujo) para obtener líneas celulares deficientes en PAM derivadas de células individuales. Después de la clonación, los aislados se analizan por ruptura del gen PAM, usando el ensayo CEL-I o el análisis por qPCR. La secuencia exacta de los alelos mutantes en cada línea celular, y por lo tanto el genotipo, se determina por  
20 amplificación por PCR del locus objetivo y clonación del producto de PCR, o mediante el uso de una de las tecnologías disponibles de secuenciación de segunda generación.

3. Manipulación dirigida de genes con TALEN

25 Las TALEN son nuevas proteínas de fusión que consisten en motivos ensamblados de unión al ADN acoplados a la nucleasa *FokI*. Los motivos de unión al ADN provienen de proteínas secretadas por patógenos de plantas en el género bacteriano *Xanthomonas*.

El ensamblaje de un constructo TALEN personalizado, o efector TAL, se divulga, por ejemplo, en Cermak et al., 2011 ("Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting"; Nucl. Acids Res. 39 (12)), e implica dos etapas: (i) ensamblaje de módulos repetidos en matrices intermediarias de 1-10 repeticiones y (ii) unión de las matrices intermedias en una estructura para elaborar el constructo final. Los  
30 detalles de este proceso se divulgan en Cermak et al. 2011

El software para diseñar TALEN está disponible para su uso como una herramienta en línea (TAL Effector-Nucleotide Targeter, TALE-NT; <http://boglabx.plp.iastate.edu/TALENT/>). La herramienta proporciona una ventana para introducir secuencias de ADN del gen de interés a ser dirigido, por ejemplo, el gen PAM. El software identifica conjuntos de sitios de reconocimiento TALEN de entre 15 y 30 pb de longitud y separados por un espaciador. Las  
35 longitudes de espaciador predeterminadas son 15 pb y 18-30 pb, pero el usuario puede especificar otras longitudes. Además, los botones permiten a los usuarios excluir las pautas de diseño individualmente.

Uno de los pares de TALEN que se dirigen al gen PAM se subclona en el vector de expresión de mamífero pCADN3.1(-) (Invitrogen) usando *XhoI* y *AflII*. Estas enzimas cortan todo el TALEN de pTAL3 o pTAL4 y colocan la secuencia codificante bajo el control del promotor de CMV (citomegalovirus). Los plásmidos resultantes se  
40 introducen en células HEK293T mediante transfección (por ejemplo, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante). Las células se recogieron 72 h después de la transfección y se aisló el ADN genómico y se digirió con *Hpy188I*, que corta en la secuencia espaciadora del sitio objetivo TALEN. Después de la digestión, un fragmento cromosómico que abarca el sitio objetivo se amplifica por PCR. Posteriormente, los productos de PCR se digieren con *Hpy188I* y se clonan en un vector TOPO TA (Invitrogen). Los clones  
45 independientes que contienen el producto de PCR de longitud completa se secuencian para evaluar las mutaciones en el sitio de escisión.

Listado de secuencias

<110> LEK Pharmaceuticals d.d.

# ES 2 688 727 T3

<120> Reducción de la formación de aminoácidos amidados en líneas celulares para la expresión de proteínas

<130> SD 42432

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1

<211> 672

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

```
gggagtgtct ctaagccagg ccagttcagt gttcctcaca gtttggccct tgtgcctcat      60
ttggaccagt tgtgtgtggc agacagggaa aatggccgga tccaatgttt cagaactgac      120
accaaagaat ttgtgagaga gattaacat gcgtcatttg ggagaaatgt attcgcaatt      180
tcatatatat caggtttgct ctttgcaagta aatgggaagc cttactttgg agaccatgaa      240
cctgtgcaag gctttgtgat gaacttttcc agtggggaaa ttatagatgt cttcaagcca      300
gtacgcaagc actttgacat gcctcacgat gtggttgctt ctgacgatgg gaatgtgtac      360
attggagacg cacacacgaa cacggtgtgg aagttcaccg tgactgaaaa aatggagcat      420
cgatcgggta aaaaggcagg cattgaggct caggaaatca aagaaaccga ggcagttggt      480
gaatccaaaa tggagaacaa acccacctcc tcagaattgc agaagatgca agagaaacag      540
aaactgatca aagagccagg ttcgggagtg cccgtggttc tcattacaac ctttctgggt      600
attcctgtgg ttgtcctgct ggccattgtc atgtttattc ggtggaaaaa atcaagggcc      660
10 tttggaggaa aa                                                                672
```

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> ARNpi\_1

<400> 2

caguugugug uggcagacag ggaaa 25

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> ARNpi\_2

<400> 3

cggauccaau guuucagaac ugaca 25

<210> 4

<211> 25

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNpi\_3

<400> 4

15 ccaauguuuc agaacugaca ccaa 25

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> ARNpi\_4

<400> 5

gagagagauu aaacaugcgu cauu 25

<210> 6

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNpi\_5  
<400> 6  
caugcgucau uugggagaaa uguau 25  
<210> 7  
5 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> ARNpi\_6  
10 <400> 7  
ugggagaaau guauucgcaau uuuca 25  
<210> 8  
<211> 25  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> ARNpi\_7  
<400> 8  
gggagaaaug uauucgcaau uucau 25  
20 <210> 9  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
25 <223> ARNpi\_8  
<400> 9  
cacacgaaca cgguguggaa guuca 25  
<210> 10

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> ARNpi\_9

<400> 10

caaagaaacc gaggcaguug uugaa 25

<210> 11

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNpi\_1

<400> 11

15 caguaaaugg gaagccuuaat t 21

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> ARNpi\_2

<400> 12

aggcaguugu ugaaucuaat t 21

<210> 13

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNpi\_3  
<400> 13  
aacagaaacu gaucaaagat t 21  
<210> 14  
5 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> ARNpi\_4  
10 <400> 14  
caagagaaac agaaacugat t 21  
<210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> ARNpi\_5  
<400> 15  
gaacugacac caaagaaat t 21  
20 <210> 16  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
25 <223> ARNpi\_6  
<400> 16  
uuucagaacu gacacaaat t 21  
<210> 17

ES 2 688 727 T3

<211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> SH5\_HLPAM  
 <400> 17  
     gatccgaact gacaccaaag aattctcaag agaaattctt tgggtgctcagt tctgtttttt      60  
     ggaaa      65  
 <210> 18  
 <211> 66  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> SH6\_HLPAM  
 <400> 18  
     gatccgtttc agaactgaca ccaaactcaa gagatttggg gtcagttctg aaacattttt      60  
 15      tggaaa      66  
 <210> 19  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> ARNhp\_ Oligonucleótido de cadena inferior  
 <400> 19  
     agctttttcca aaaaacagaa ctgacaccaa agaatttctc ttgagaattc tttggtgtca      60  
     gttcg      65  
 <210> 20  
 25 <211> 66  
 <212> ADN

ES 2 688 727 T3

<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> ARNhp\_Oligonucleótido de cadena inferior SH6\_HLPAM  
<400> 20  
agcttttcca aaaaatgttt cagaactgac accaaatctc ttgagtttgg tgtcagttct 60  
5 gaaacg 66  
<210> 21  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
10 <220>  
<223> Cebador de secuenciación directa  
<400> 21  
aggcgattaa gttgggta 18  
<210> 22  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Cebador de secuenciación inversa  
20 <400> 22  
taatagcact cactataggg 20  
<210> 23  
<211> 22  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Cebador directo PAM

<400> 23

ggccgatcc aatgttcag aa 22

<210> 24

<211> 16

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo ACTB

<400> 24

10 agccacgctc ggtcag 16

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cebador directo LUC

<400> 25

ctgattttc ttgcgtcag ttt 23

<210> 26

20 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso PAM

25 <400> 26

tcccaaatga cgcatgtta atctct 26

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ACTB

5 <400> 27

catcctgcgt ctggacct 18

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso LUC

<400> 28

gagttgtgtt tgtggacgaa gtac 24

15 <210> 29

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Sonda PAM

<400> 29

ctgacaccaa agaattt 17

<210> 30

<211> 17

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ACTB

# ES 2 688 727 T3

<400> 30

ccgggacctg acagact 17

<210> 31

<211> 17

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda LUC

<400> 31

10 tccggaaga ccttcg 17

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula utilizada en la expresión de proteínas heterólogas que tiene actividad de amidación peptídica reducida, en cuya célula se ha logrado la actividad de amidación peptídica reducida mediante
- 5 a) inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica; y/o
- b) expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida, debido a mutagénesis, inserciones o supresiones aleatorias o específicas del sitio dentro del gen de codificación endógeno.
- 10 2. Un método para reducir la actividad de amidación peptídica en una célula utilizada en la expresión de proteínas heterólogas, cuyo método comprende al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en
- a) inhibición o reducción de la expresión génica de un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica;
- 15 b) expresión de una enzima disfuncional o inactiva que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica, o una enzima que cataliza la amidación peptídica con actividad reducida, debido a mutagénesis, inserciones o supresiones aleatorias o específicas de sitio dentro del gen de codificación endógeno.
3. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la actividad de amidación peptídica reducida se ha logrado mediante al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en
- silenciamiento de genes,
  - desactivación de genes,

20

  - inactivación permanente de genes,
  - inactivación permanente condicional de genes, y/o
  - alteración de genes
- con respecto a un gen que codifica una enzima que cataliza la  $\alpha$ -amidación peptídica.
- 25 4. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la célula es una célula eucariótica.
5. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la célula es una célula animal y/o una célula vegetal.
6. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la célula es una célula de mamífero.
- 30 7. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la célula es al menos una seleccionada del grupo que consiste en:
- Células de riñón de hámster bebé (por ejemplo, BHK21)
  - Células de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB o CHO-*dhfr*)
  - Células de mieloma de ratón (por ejemplo, SP2/0 o NS0)

35

  - Células de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK-293)
  - Células derivadas de la retina humana (por ejemplo, PER-C6), y/o

- Células de amniocitos (por ejemplo, CAP).

8. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la enzima que cataliza la amidación peptídica es peptidilglicina monooxigenasa alfa-amidante (PAM).

5 9. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la expresión génica del gen que codifica dicha enzima que codifica la amidación peptídica se inhibe, o se reduce, por medio de ARN de interferencia (ARNi).

10. La célula o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la enzima que cataliza la amidación peptídica cataliza la formación de residuos de prolinamida C-terminales.

10 11. Uso de una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones antes mencionadas para la expresión de proteína heteróloga, en la que dicha proteína es al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

- un anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo
- una proteína de fusión,
- un mimético de anticuerpo, y/o
- proteínas que no son anticuerpos.

15

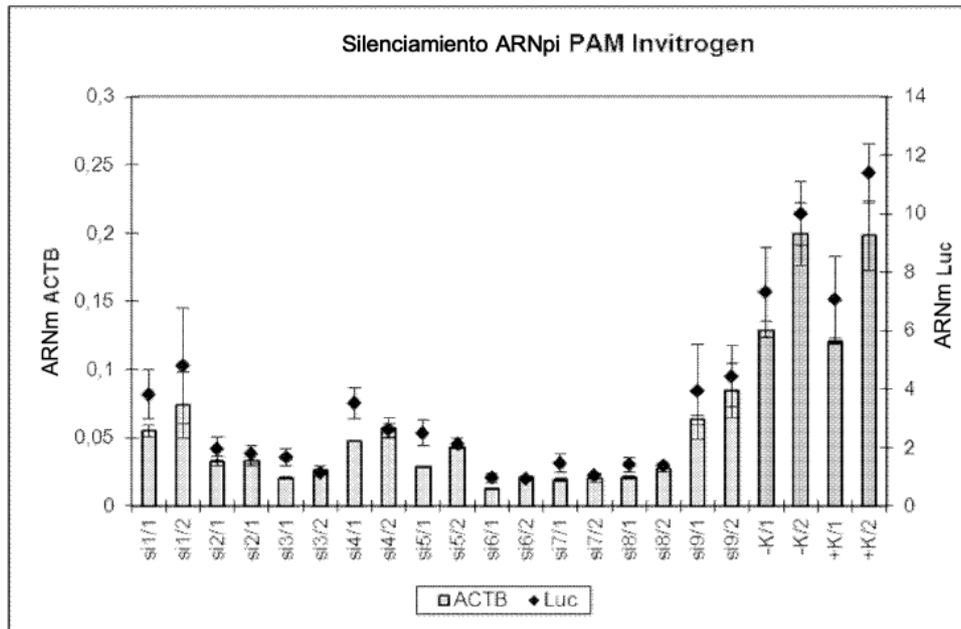


Fig. 1

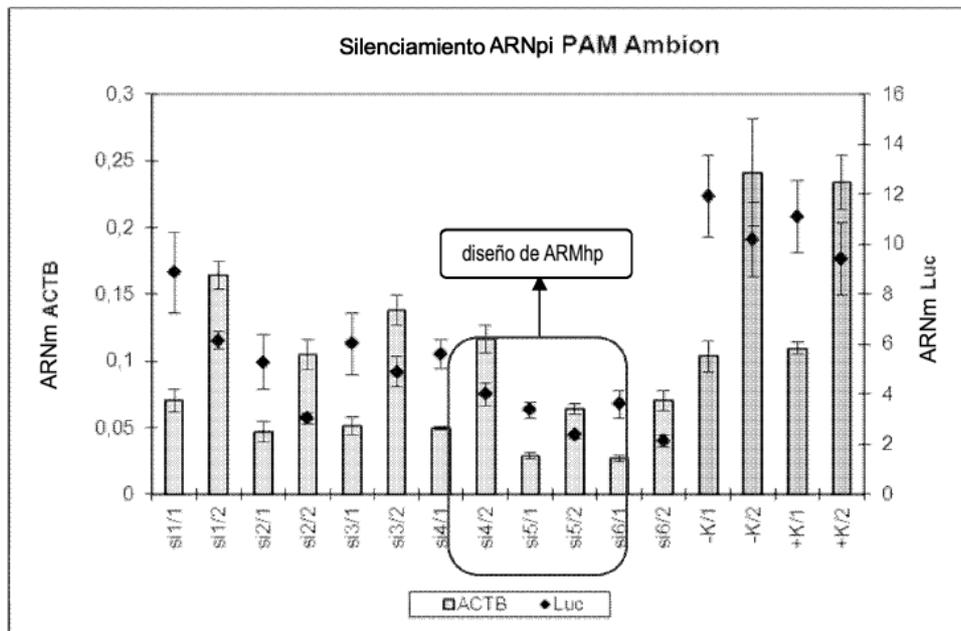


Fig. 2

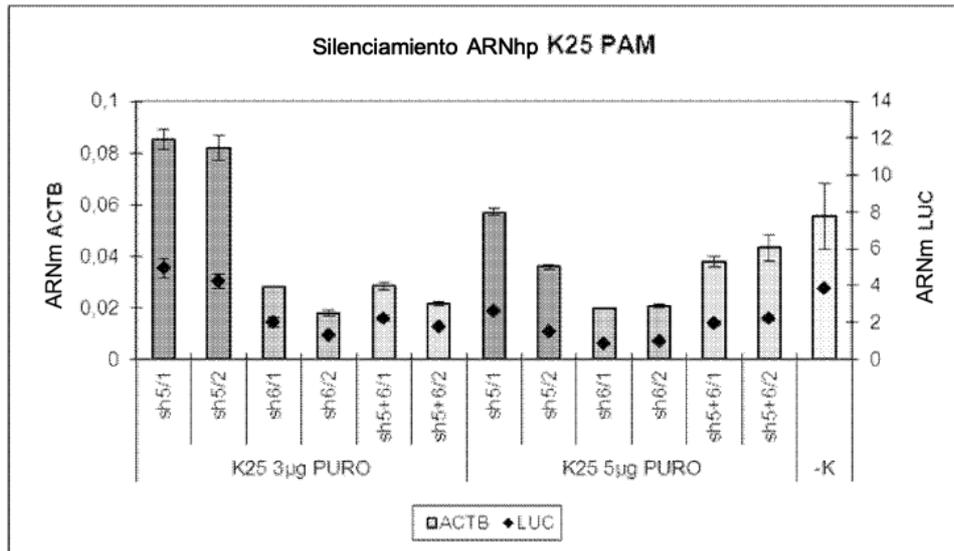


Fig. 3

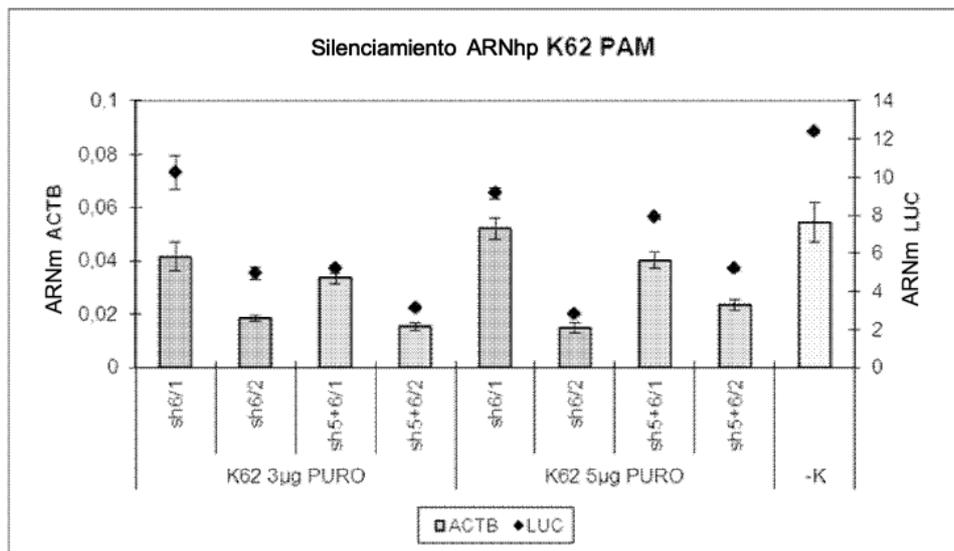


Fig. 4

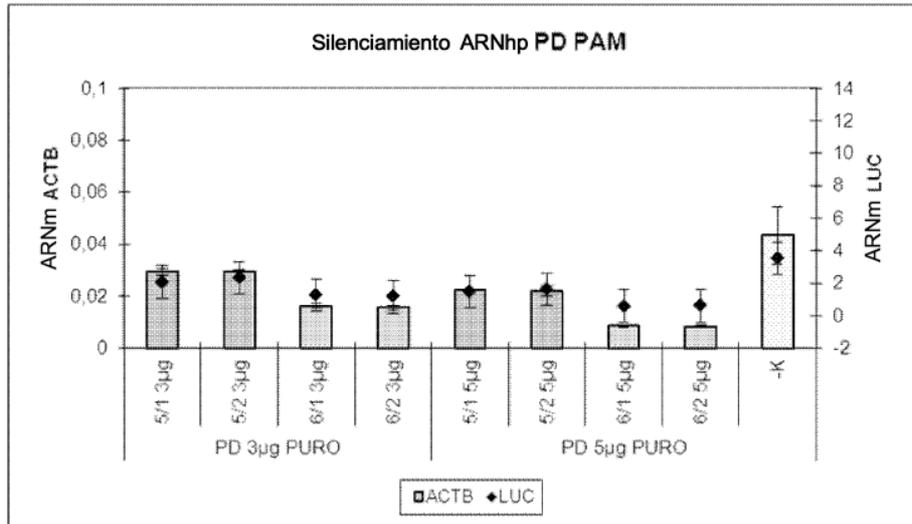


Fig. 5

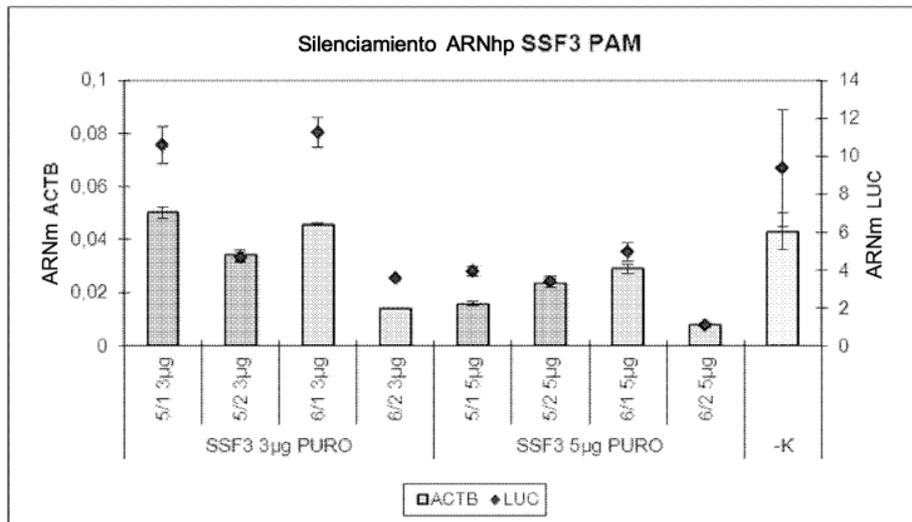


Fig. 6



