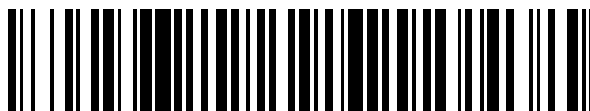


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 246**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015 PCT/IB2015/053110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15166427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015 E 15739327 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3137595**

54 Título: **Células de vertebrado novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un polipéptido de interés**

30 Prioridad:

29.04.2014 US 201461985589 P

16.05.2014 US 201461994310 P

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

14.11.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

LAUX, HOLGER;

ROMAND, SANDRINE y

BODENDORF, URSULA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 731 246 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 de vertebrado novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un polipéptido de interés

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se refiere al campo de las tecnologías de expresión recombinante. Se refiere, entre otras cosas, a células de vertebrado alteradas y su uso en métodos de expresión recombinante. Cuando se expresa de forma recombinante un polipéptido de interés en dichas células alteradas, el cual se secreta a continuación en el medio de cultivo celular, la degradación proteolítica (*clipping*) del polipéptido expresado de forma recombinante de interés en el medio de cultivo celular se reduce significativamente o incluso se evita completamente.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

El mercado de los productos biofarmacéuticos sigue creciendo a gran velocidad a medida que los productos biofarmacéuticos se vuelven cada vez más importantes para la medicina de hoy en día. En la actualidad, se produce un número cada vez mayor de productos biofarmacéuticos en células de vertebrado tales como, en particular, células de mamífero. Los productos biofarmacéuticos incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ADC (siglas en inglés referentes a un conjugado de anticuerpo-fármaco), nanocuerpos, proteínas de fusión-Fc, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, enzimas y otros polipéptidos terapéuticos. Especialmente, cada vez está cobrando más importancia la expresión de proteínas terapéuticas recombinantes que no sean anticuerpos. Además, para otros campos de aplicación, también es de gran interés la expresión recombinante de polipéptidos en células de mamífero. Teniendo en cuenta los costes de producción de los polipéptidos que se expresan de forma recombinante, resulta importante disponer de líneas celulares de mamífero de alta expresión. El polipéptido de interés es expresado y secretado por las células de mamífero en el medio de cultivo celular a partir del cual se recolecta a continuación.

El documento WO93/13125 describe un método para la producción de proteínas y tiene como objetivo mejorar el rendimiento de la proteína producida incrementando la estabilidad de la proteína producida en el medio de crecimiento mediante la protección de la proteína producida frente al medio de crecimiento restante tras su secreción.

Un problema importante que surge cuando se utilizan células de vertebrado tales como células de mamífero como células hospedadoras para la expresión recombinante es la degradación proteolítica del polipéptido expresado y secretado de interés en el medio de cultivo celular, a la cual también se hace referencia como «*clipping*». Las proteasas que se originan a partir de las células de vertebrado utilizadas para la producción son activas en el medio de cultivo celular y su actividad proteolítica puede degradar el polipéptido expresado de forma recombinante y secretado de interés, con lo que se obtiene un polipéptido de interés alterado, p. ej., menos funcional o no funcional. Esta degradación proteolítica relacionada con la célula hospedadora es uno de los principales problemas de la expresión recombinante de polipéptidos. Aunque los anticuerpos de tipo IgG también se pueden ver afectados, p. ej., debido a que los anticuerpos de tipo IgG pueden sufrir una degradación proteolítica en las regiones variables, la degradación proteolítica, es decir, el *clipping* se produce con una frecuencia mucho mayor en los polipéptidos que no son IgG. Tales polipéptidos que no son IgG, en particular los glicopolipéptidos, debido a su estructura tridimensional relativamente expuesta, pueden ser muy sensibles a la degradación proteolítica. El *clipping* de polipéptidos que no son IgG expresados de forma recombinante puede alcanzar valores de hasta un 100%. El *clipping* puede proporcionar polipéptidos inmunogénicos y/o inactivos que no sean útiles para el fin deseado. Además, incluso si la degradación proteolítica ocurre únicamente en un porcentaje determinado, el polipéptido degradado proteolíticamente no se puede utilizar para el fin deseado y, por consiguiente, reduce el rendimiento del polipéptido recombinante útil de interés. Además, para muchas aplicaciones, el polipéptido degradado proteolíticamente se tiene que eliminar durante la purificación. Esto puede requerir el desarrollo específico de métodos de purificación que hagan posible la separación del polipéptido degradado proteolíticamente respecto al polipéptido intacto, los cuales pueden ser laboriosos y de coste elevado y, en ocasiones, ni siquiera tienen éxito, de manera que la proteína degradada proteolíticamente sigue siendo una impureza. Por consiguiente, la degradación proteolítica del polipéptido expresado de interés en el medio de cultivo celular es un problema importante cuando se produce de forma recombinante un polipéptido de interés en células de vertebrado.

Varios estudios han investigado el fenómeno de *clipping* con el fin de proporcionar soluciones a este problema. Se ha observado que el *clipping* depende del tiempo y la temperatura y se podría desactivar mediante un tratamiento térmico. A pesar de ello, hasta ahora no se tienen muchos datos sobre las proteasas expresadas por las células hospedadoras de vertebrado utilizadas para la expresión recombinante ni sobre las proteasas responsables del *clipping*. Uno de los principales retos es el número de proteasas expresadas por las células hospedadoras de vertebrado. P. ej., existe constancia de que hay más de 700 proteasas presentes en los genomas de células de roedores, muchas de las cuales podrían participar en el *clipping*.

En la técnica anterior se han sugerido varias estrategias para resolver los problemas del *clipping*. Una estrategia para evitar el *clipping* consiste en volver a modificar genéticamente la proteína afectada con el fin de eliminar los motivos de aminoácidos que sean propensos a experimentar el *clipping*. Sin embargo, esta estrategia consume mucho tiempo, requiere pruebas exhaustivas si la estrategia seleccionada tiene éxito y no garantiza que la proteína modificada de nuevo genéticamente siga siendo funcional, no experimente *clipping* en otros sitios y no sea inmunogénica. Una

manera distinta de controlar la actividad de las proteasas en el cultivo celular consiste en añadir inhibidores o sustratos sustitutivos en el medio de cultivo. A pesar de ello, en los procesos de producción a gran escala tales aditivos son caros y deben eliminarse durante la purificación, lo cual puede requerir el desarrollo específico de métodos de purificación y ensayos sensibles para monitorizar que no sigan presentes los aditivos. Otras maneras de reducir la degradación proteolítica del polipéptido expresado de interés en el medio de cultivo celular incluyen controlar el momento de la recolección (recolección temprana) para limitar la exposición de los polipéptidos de interés a las proteasas en el medio de cultivo celular, reducir la temperatura del cultivo, optimizar las condiciones de pH o mejorar la viabilidad celular para reducir la liberación de las proteasas intracelulares en el medio de cultivo celular. Además, se ha descubierto que la elección de la línea celular de vertebrado utilizada como célula hospedadora de producción puede influir sobre el *clipping*, dependiendo de las proteasas que son expresadas por la línea celular respectiva y el polipéptido individual de interés que se ha de expresar. Por consiguiente, una opción consiste en cribar diferentes líneas celulares para identificar una línea celular en la que el *clipping* del polipéptido de interés no se produzca o se produzca en menor grado, lo cual, sin embargo, consume mucho tiempo y puede requerir la adaptación del proceso de producción a la línea celular seleccionada. Aunque estas opciones diferentes pueden reducir el *clipping*, raramente eliminarán por completo la degradación proteolítica. Además, en muchos casos se requieren adaptaciones del proceso de expresión y producción al polipéptido individual de interés que se ha de expresar con el fin de desarrollar un método de producción que evite o al menos reduzca los problemas del *clipping* y proporcione el polipéptido intacto de interés con un rendimiento y una pureza suficientes. A pesar de ello, tales adaptaciones consumen mucho tiempo y tienen un coste económico elevado. Por consiguiente, se necesitan mejores modos de resolver el problema del *clipping*.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un método mejorado para la producción recombinante de un polipéptido de interés en células de vertebrado, donde el *clipping* del polipéptido expresado y secretado de interés en el medio de cultivo celular se reduce o elimina. En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar células de vertebrado novedosas, donde el *clipping* de un polipéptido de interés expresado y secretado por dichas células se reduce o elimina.

COMPENDIO DE LA DIVULGACIÓN

La invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se basa, entre otras cosas, en el descubrimiento inesperado de que el hecho de alterar una célula de vertebrado para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa, p. ej., reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa, reduce significativamente la degradación proteolítica («*clipping*») de un polipéptido recombinante de interés que es expresado y secretado por dicha célula en el medio de cultivo celular. Por lo tanto, el hecho de debilitar el efecto de la matriptasa en dicha célula reduce el *clipping* del polipéptido recombinante secretado de interés en comparación con una célula de vertebrado correspondiente en la que el efecto de la matriptasa no esté debilitado. Con la matriptasa, se identificó una proteasa clave responsable del *clipping* de polipéptidos expresados de forma recombinante y secretados. El hecho de alterar la célula de vertebrado para debilitar el efecto de la matriptasa permite mejorar de forma significativa la producción recombinante de un polipéptido de interés mediante la reducción o eliminación del *clipping* del polipéptido expresado de forma recombinante y secretado de interés en el medio de cultivo celular. De este modo, se incrementa el rendimiento del polipéptido intacto de interés. Según demuestran los ejemplos, estos efectos favorables no se observan cuando se debilita la función de otras proteasas, lo cual confirma que la matriptasa es la principal proteasa responsable del *clipping*. Las células de vertebrado novedosas proporcionadas en la presente divulgación evitan la necesidad de volver a modificar genéticamente el polipéptido de interés que se ha de expresar con el fin de eliminar los sitios proteolíticos o de adaptar de forma laboriosa el proceso de producción para reducir o prevenir el *clipping* o de diseñar procesos de purificación específicos para eliminar la proteína degradada proteolíticamente. De forma favorable, estas células de vertebrado alteradas descritas en la presente se pueden utilizar como células hospedadoras universales para expresar diferentes polipéptidos de interés, incluidos los polipéptidos de interés que son particularmente propensos a experimentar el *clipping*. Las adaptaciones específicas del polipéptido que se ha de expresar o el sistema de expresión se vuelven obsoletas, lo cual ahorra tiempo y costes. Además, según demuestran los ejemplos, la célula de vertebrado alterada proporcionada en la presente divulgación presenta unas buenas características de expresión y crecimiento. Por consiguiente, el hecho de debilitar el efecto de la matriptasa sigue proporcionando a las células hospedadoras unas características de expresión favorables que son importantes para la expresión recombinante de un polipéptido de interés. Por lo tanto, la presente invención realiza una contribución importante a la técnica anterior.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una célula de vertebrado aislada adecuada para la expresión recombinante de un polipéptido de interés, donde la célula de vertebrado se altera para debilitar el efecto de la matriptasa y comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés, donde la célula de vertebrado secreta el polipéptido de interés. La célula de vertebrado se altera para debilitar el efecto de la matriptasa, p. ej., reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa en dicha célula de vertebrado, p. ej., mediante silenciamiento génico, delección génica o mutando el gen de la matriptasa de modo que se exprese una proteína menos funcional o no funcional. El hecho de debilitar el efecto de la matriptasa en dicha célula de vertebrado reduce el *clipping* del polipéptido recombinante secretado de interés en comparación con una célula de vertebrado correspondiente en la que el efecto de la matriptasa no esté debilitado. Según muestran los ejemplos basados, entre otros, en experimentos de adición (*spike-in*), en el sobrenadante del medio de cultivo celular que se

obtiene cuando se cultivan células de vertebrado alteradas correspondientemente en las que el efecto de la matriptasa está debilitado, el *clipping* de polipéptidos recombinantes de interés, sorprendentemente, se reduce significativamente aunque otras proteasas sigan siendo activas en el sobrenadante. Estos resultados se confirmaron expresando varios polipéptidos de interés en células alteradas correspondientemente en las que el efecto de la matriptasa estaba debilitado. Estos resultados confirman que la matriptasa es una proteasa clave responsable del *clipping* de un polipéptido expresado de forma recombinante y secretado de interés. Por lo tanto, las células de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto son particularmente adecuadas como células hospedadoras para tecnologías de producción recombinante y se pueden utilizar para la producción recombinante de un polipéptido de interés que es secretado por la célula de vertebrado en el medio de cultivo celular a partir del cual se puede recolectar a continuación.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto, que comprende alterar una célula de vertebrado para debilitar el efecto de la matriptasa e introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés que se ha de expresar, donde dicho polipéptido de interés es secretado por la célula de vertebrado. El debilitamiento del efecto se puede conseguir, p. ej., reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa en dicha célula, p. ej., mediante silenciamiento génico, delección génica o mutando el gen de la matriptasa de modo que se exprese una proteína menos funcional o no funcional.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende utilizar una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto como célula hospedadora para la expresión recombinante del polipéptido de interés. Según se ha descrito anteriormente, debido al nivel reducido que se consigue de *clipping* del polipéptido en el medio de cultivo celular, estas células de vertebrado alteradas son particularmente adecuadas como células hospedadoras para la producción recombinante de un polipéptido de interés, en particular de polipéptidos que sean propensos a experimentar el *clipping* tales como los glicopolipéptidos. Como realización preferida, se proporciona un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

- (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto en unas condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular;
- (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

- (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado que comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés en unas condiciones que permiten la expresión y secreción del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular, donde el medio de cultivo celular comprende un inhibidor de proteasas que es selectivo para la matriptasa;
- (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

- (a) proporcionar células de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto como células hospedadoras; y
- (b) seleccionar una o más células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés.

De acuerdo con un sexto aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés que se secreta a partir de la célula de vertebrado, donde la célula utilizada se altera para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa. Las células alteradas correspondientemente se pueden, p. ej., transfectar con un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés que supuestamente es expresado y secretado por dicha célula. Cuando se utilizan las células de vertebrado respectivas en las que el efecto de la proteasa endógena matriptasa está debilitado, unas cantidades reducidas o nulas de la matriptasa funcional son activas en el medio de cultivo celular. Esto reduce de forma significativa o incluso elimina la degradación proteolítica del polipéptido recombinante de interés que es secretado por las células en el medio de cultivo celular. Por consiguiente, resulta favorable utilizar tales células de vertebrado alteradas para la expresión de proteínas recombinantes.

De acuerdo con un séptimo aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para seleccionar una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés, que comprende analizar si la proteasa endógena matriptasa se expresa de forma funcional en la célula de vertebrado y seleccionar una célula de vertebrado en la que el efecto de tal matriptasa endógena esté debilitado para la producción recombinante del polipéptido de interés. Este proceso de selección permite identificar células de vertebrado que sean capaces de producir un polipéptido recombinante de interés, donde el *clipping* del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular se

reduzca. Las células de vertebrado respectivas son particularmente adecuadas para la producción de proteínas recombinantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1** muestra una inmunotransferencia de Western para dos proteínas terapéuticas (panel superior: IgG (mAb), panel inferior: proteína de fusión-Fc) incubadas durante varios días en medio acondicionado obtenido al cultivar células CHO transfectadas con ARNip dirigidos contra diferentes genes diana de proteasas (7 días de incubación para mAb, 3 días de incubación para la proteína de fusión-Fc). El primer control «(+)» representa una muestra del polipéptido de interés incubado durante el mismo tiempo en un medio de cultivo químicamente definido que no estuvo en contacto con las células. El medio de cultivo químicamente definido utilizado como control fue el mismo medio de cultivo que el medio de cultivo en el que se cultivaron las células para obtener el medio acondicionado. El segundo control «(-)» representa una muestra del polipéptido de interés incubada en el medio acondicionado obtenido a partir de células CHO transfectadas con un ARNip no eficaz (125pmol) que sirvió como control negativo de ARNip. Los nombres de las serín proteasas de tipo tripsina diana y los homólogos cuya expresión fue silenciada por la transfección de ARNip se proporcionan por encima del panel superior (MT-SP1 (matriptasa, que también se denomina en la presente St14), C1r (que también se denomina C1ra), C1s (que también se denomina Gm5077), Plat y Prss35). Para cada una de las combinaciones de «polipéptido de interés/medio acondicionado de células con expresión de proteasa silenciada», se muestran los resultados de dos configuraciones experimentales con diferentes concentraciones de ARNip. También se determinó y se indica en la Fig. 1 más adelante entre paréntesis el porcentaje de expresión del gen de la proteasa residual en relación con la expresión del gen de la proteasa en las células de control negativo de ARNip, que se fijó como un 100%. Esto significa, p. ej., con respecto a MT-SP1 (18.6%), que se produjo un 18.6% de expresión del gen residual tras el silenciamiento. MT-SP1: 125 pmol (18.6%) y 150 pmol (18.2%), C1r (C1ra): 125 pmol (6.3%) y 150 pmol (6.7%), C1s (Gm5077): 100 pmol (11.9%) y 125pmol (14.4%), Plat: 125 pmol (8.3%) y 150 pmol (5.1%) y Prss35: 100 pmol (18.4%) y 125 pmol (14.8%). Estos resultados demuestran que, cuando el nivel de ARNm de MT-SP1 se reduce mediante interferencia por ARN, se produce significativamente menos *clipping* en el medio acondicionado (detectado para el mAb y la proteína de fusión-Fc). Cuando se redujo la expresión de otras serín proteasas de tipo tripsina expresadas, el *clipping* se mantuvo igual. De este modo, los resultados demuestran que la matriptasa es la proteasa clave responsable del *clipping*.

La **Fig. 2** muestra la secuencia del exón 2 del gen de la matriptasa más las regiones del intrón flanqueante en células derivadas de CHO-K1. Se diseñaron cebadores de secuenciación (en cursiva, negrita y subrayados) que tenían como diana los intrones flanqueantes para confirmar la secuencia del exón 2 de MT-SP1 derivada de CHO-K1 (con sombreado gris). Los sitios de unión de los dominios de unión del ADN de TALEN que se utilizaron para obtener células con supresión de matriptasa se representan en negrita y subrayados y la región diana para la mutación de supresión se muestra en negrita y con un subrayado doble.

La **Fig. 3** muestra un diagrama de columnas que representa la expresión del ARNm de la matriptasa relativa medida en los clones de células con supresión de matriptasa derivadas de CHO-K1 de KO-1 a KO-9 y el clon $\Delta 7/\Delta 15$ y una línea celular natural (WT) derivada de CHO-K1. La expresión del ARNm de la matriptasa en la línea celular derivada de CHO-K1 natural se definió como un 100%. Como se puede observar, la expresión del ARNm de la matriptasa se redujo en todos los clones con supresión y en el clon $\Delta 7/\Delta 15$.

La **Fig. 4** muestra una inmunotransferencia de Western de tres polipéptidos de interés diferentes que son propensos a experimentar *clipping* incubados en el sobrenadante del medio de cultivo celular de células CHO-K1 naturales (WT) y una variedad de diferentes clones de células derivadas de CHO-K1 en los que se suprimió la matriptasa mediante diferentes mutaciones (remítase al Ejemplo 2, en particular la Tabla 5). Los polipéptidos de interés (concentración de 0.7 μ M para cada uno) se incubaron en medio acondicionado obtenido a partir de células CHO-K1 naturales (WT), los clones de supresión de KO-1 a KO-9 mostrados en la Tabla 5 (que se indican en la Fig. 4 con los números 1-9, respectivamente) o un medio químicamente definido que no se puso en contacto con las células (+). El polipéptido de interés en la Fig. 4A es una IgG (mAb) y el tiempo de incubación fue de 48 h. El polipéptido de interés en la Fig. 4B es una proteína de fusión-Fc, el tiempo de incubación fue de 24 h. El polipéptido de interés en la Fig. 4C es una proteína recombinante adicional con dos glicovariantes, el tiempo de incubación fue de 1 h. Ambas glicovariantes se degradaron proteolíticamente en medio acondicionado obtenido a partir de células CHO-K1 naturales (WT). Las proteínas intactas y las degradadas proteolíticamente se indican con las flechas. La Fig. 4D muestra el resultado de una repetición del experimento con el mAb utilizando medio acondicionado obtenido a partir de las células respectivas que habían sido cultivadas durante tres meses. Las condiciones de incubación fueron idénticas a las de la Fig. 4A. Los resultados demuestran que el *clipping* se evita de forma eficaz en el medio acondicionado obtenido a partir de los clones de las células con supresión de matriptasa de KO-1 a KO-9 y que estos resultados favorables se mantienen durante un cultivo prolongado.

Las **Fig. 5A y B** muestran inmunotransferencias de Western de dos glicoproteínas víricas (polipéptidos de interés) diferentes que son propensas a experimentar *clipping*. Los polipéptidos de interés se incubaron en medio acondicionado obtenido a partir de la línea celular derivada de CHO-K1 que expresa matriptasa (WT) y diferentes clones celulares en los que se había suprimido la matriptasa (de KO-1 a KO-3). Los polipéptidos de interés se incubaron con una concentración de 0.7 μ M en medio acondicionado obtenido a partir de células naturales (WT),

medio acondicionado de los clones de supresión de KO-1 a KO-3 mostrados en la Tabla 5 (que se indican con los números 1-3, respectivamente) o un medio de cultivo químicamente definido que no se puso en contacto con las células (+). D1 indica un tiempo de incubación de 24 h y D2 un tiempo de incubación de 48 h. Las proteínas intactas y degradadas proteolíticamente se indican con flechas (flechas blancas y negras). Los números al lado izquierdo de la inmunotransferencia de western en la **Fig. 5B** representan el peso molecular en kDa tal y como se determinó. Los resultados demuestran nuevamente que el *clipping* se reduce significativamente en el medio acondicionado obtenido a partir de los clones con supresión (KO) de matriptasa.

La **Fig. 6** muestra una inmunotransferencia de Western de una proteína de fusión-Fc (**Fig. 6A**) y una IgG (mAb) (**Fig. 6B**) que se incubaron en el sobrenadante del medio de cultivo celular obtenido a partir de células CHO que expresan matriptasa natural («WT1» y «WT2») y un clon de CHO en el que se mutó la matriptasa («Δ7/Δ15») de modo que se redujo la expresión funcional de la matriptasa. Un medio de cultivo químicamente definido correspondiente («(+))» que no estuvo en contacto con las células sirvió como control positivo. La proteína de fusión-Fc y el mAb (concentración de 0.7 μM para cada uno) se incubaron durante 2 h y 24 h, respectivamente. Los números al lado de la inmunotransferencia de Western representan el peso molecular aprox. en kDa tal y como se determinó en el gel. Los resultados demuestran que el *clipping* se reduce en el medio acondicionado obtenido a partir del clon celular mutado Δ7/Δ15, en el cual se ha reducido la expresión funcional de la matriptasa activa.

La **Fig. 7** muestra los resultados de una coincubación de diferentes polipéptidos de interés con dos proteasas de tipo tripsina diferentes, a saber una matriptasa de ratón (MT-SP1) y Htra1 humana. La **Fig. 7A** muestra un análisis por inmunotransferencia de Western de mAb (tiempo de incubación 24 h), la **Fig. 7B** muestra un análisis por electroforesis en gel capilar (Caliper LabChip®) de una proteína de fusión-Fc (tiempo de incubación 2 h) y la **Fig. 7C** muestra un análisis por inmunotransferencia de Western de una proteína recombinante adicional (tiempo de incubación 1 h). La concentración del polipéptido de interés fue de 0.7 μM en todas las configuraciones experimentales. Cada polipéptido de interés se evaluó con cantidades cada vez menores de MT-SP1 y Htra1: Las relaciones molares de la proteasa respecto al polipéptido de interés son, de izquierda a derecha, 1/10, 1/100 y 1/1000 para MT-SP1 y 1/3, 1/10 y 1/100 para Htra1. Los polipéptidos de interés también se incubaron durante el mismo tiempo en un medio de cultivo químicamente definido «(+))» y en medio acondicionado (sobrenadante) obtenido a partir de células naturales derivadas de CHO-K1 «(-))». Las proteínas intactas (más grandes) y las proteínas degradadas proteolíticamente (más pequeñas) se indican con las flechas en la Fig. 7A y 7C. En la Fig. 7B, hay dos tipos de polipéptidos degradados proteolíticamente al lado del polipéptido intacto (todos marcados con una flecha e ilustrados al lado). Las Fig. 7A-7C demuestran que se produce *clipping* en presencia de la matriptasa, con lo que se confirma que la matriptasa es una proteasa clave responsable del *clipping*.

La **Fig. 8** muestra un análisis por inmunotransferencia de Western de dos polipéptidos de interés, un anticuerpo IgG monoclonal (panel superior, tiempo de incubación 24 h) y una proteína recombinante (panel inferior, tiempo de incubación 1 h). Los polipéptidos de interés (concentración de 0.7 μM para cada uno) se incubaron o bien en un medio de cultivo químicamente definido «(+))», en medio acondicionado obtenido a partir de células naturales derivadas de CHO-K1 «(-))» o en un medio de cultivo químicamente definido con matriptasa recombinante de *Mus Musculus* añadida ((+) + MT-SP1). A varias muestras, se les añadió un fragmento Fab inhibidor anti-MT-SP1 tal y como se indica («+ Fab»). La concentración del Fab en la muestra se indica por encima de la línea (1 μM, 10 μM o 50 μM). Las flechas indican las bandas de proteína que representan la proteína intacta o degradada proteolíticamente. La banda de proteína a aprox. 25kD en las líneas en las que se añadió el fragmento Fab representa el fragmento Fab. Los resultados demuestran que la adición del fragmento Fab anti-MT-SP1 (el cual es un inhibidor selectivo de la matriptasa) a un medio de cultivo celular en el que la matriptasa es activa reduce o incluso evita completamente el *clipping*. Los resultados confirman adicionalmente que la matriptasa es la proteasa clave responsable del *clipping*.

La **Fig. 9** muestra el resultado de una electroforesis capilar en microchip (Caliper LabChip®). Se expresó un mAb recombinante en células naturales (WT) derivadas de CHO-K1 o en células con supresión de matriptasa (KO-4, remítase también a la Tabla 5) y se purificó utilizando cromatografía de afinidad (proteína A). Los números por encima de las líneas presentan diferentes agrupaciones de células productoras de mAb obtenidas a partir de procesos de selección y transfección en paralelo. En cada línea, se observan tres bandas de proteína tal y como indican las flechas. La banda de proteína superior representa la cadena pesada del mAb intacto, la segunda banda (directamente por debajo de la primera) representa la cadena pesada del anticuerpo degradado proteolíticamente y la banda inferior representa la cadena ligera del mAb. Los resultados muestran que el *clipping* se reduce significativamente cuando se expresa un polipéptido de interés en células con supresión de matriptasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se basa, entre otras cosas, en el descubrimiento inesperado de que una célula de vertebrado alterada, en la que el efecto de la proteasa endógena matriptasa se debilita, p. ej., reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa, es capaz de expresar y secretar un polipéptido recombinante de interés en el medio de cultivo celular, donde, a pesar de ello, el *clipping* del polipéptido recombinante de interés en el medio de cultivo celular se reduce significativamente. De este modo, se identificó la principal proteasa responsable del *clipping* de los polipéptidos expresados de forma recombinante y secretados entre cientos de proteasas diferentes. También resultó muy sorprendente que el hecho de actuar sobre la actividad de una única proteasa y debilitarla fuera suficiente para

reducir significativamente e incluso eliminar el *clipping* en el medio de cultivo celular. El hecho de utilizar, p. ej., células de vertebrado alteradas correspondientemente de acuerdo con la invención permite mejorar significativamente la producción recombinante de un polipéptido de interés mediante el incremento del rendimiento del polipéptido intacto de interés que se puede obtener tras su expresión y secreción a partir del medio de cultivo celular. Por consiguiente, cuando se utiliza la célula de vertebrado alterada de acuerdo con la invención para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, no es necesario realizar medidas adicionales para reducir la degradación proteolítica y, por lo tanto, evitar el *clipping* del polipéptido de interés. Por consiguiente, la presente invención realiza una contribución importante a la técnica anterior.

A continuación se describirán detalladamente los aspectos individuales y las realizaciones adecuadas y preferidas de la presente divulgación.

A. Células de vertebrado alteradas

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una célula de vertebrado aislada adecuada para la expresión recombinante de un polipéptido de interés, donde la célula de vertebrado se altera para debilitar el efecto de la matriptasa y comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés, donde la célula vertebrada secreta el polipéptido de interés. El hecho de debilitar el efecto de la matriptasa en dicha célula de vertebrado reduce el *clipping* del polipéptido recombinante secretado de interés en comparación con una célula de vertebrado correspondiente en la que el efecto de la matriptasa no esté debilitado. De acuerdo con la reivindicación 1, el efecto de la matriptasa se debilita debido a que la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en dicha célula de vertebrado mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores.

La matriptasa fue descrita por primera vez en 1993 como una actividad gelatinolítica nueva en células cultivadas de cáncer de mama. La matriptasa pertenece a la familia de serín proteasas de transmembrana de tipo II (TTSP). Hay ortólogos de la matriptasa presentes en diferentes especies de vertebrados, que incluyen especies de mamíferos, y se han identificado, por ejemplo, en el ser humano, chimpancé, perro, ratón, rata, gallina, pez cebra, pez globo verde moteado y pez globo tigre, lo cual sugiere una función evolutiva conservada. La matriptasa está enumerada en la nomenclatura de enzimas IUBMB como EC 3.4.21.109. La matriptasa también se conoce como serín proteasa de tipo membrana 1 (MT-SP1) y supresor de la tumorigenicidad-14 (ST14) (remítase a Chen *et al.*, *The Transmembrane Serine Protease Matriptase: Implications for Cellular Biology and Human Diseases J Med Sci* 2012; 32 (3): 097-108). Es una proteína de membrana integral con un dominio transmembranal de intervalo único cercano al extremo N citoplasmático. La parte extracelular consta de una región de tallo (que incluye un único dominio SEA, 2 CUB y 4 LDLRA) y el dominio de serín proteasa C-terminal que es estructuralmente muy similar al de otras TTSP e incluye una tríada catalítica de histidina/ácido aspártico/serina (HDS) conservada esencial para la actividad catalítica (remítase, p. ej., a List *et al.*, *Matriptase: Potent Proteolysis on the cell Surface; MOL MED* 12 (1-3) 1-7, ENERO-MARZO de 2006 y Chen *et al.*, *The Transmembrane Serine Protease Matriptase: Implications for Cellular Biology and Human Diseases J Med Sci* 2012; 32 (3): 097-108). Se ha descrito que la matriptasa se expresa en los epitelios de muchos sistemas de órganos tales como la piel, mama, pulmón, epidermis, córnea, glándula salival, cavidades orales y nasales, tiroides, timo, esófago, tráquea, bronquiolos, alveolos, estómago, páncreas, vesícula, duodeno, intestino delgado, colon, recto, riñón, adrenales, vejiga urinaria, uréter, vesículas seminales, epidídimo, próstata, ovarios, útero y vagina (remítase a List *et al.*, 2006 y Chen *et al.*, 2012). La matriptasa se sintetiza como un zimógeno inactivo y se convierte en su forma activa mediante un proceso complicado. En List *et al.* 2006 y Chen *et al.* 2012 se describen detalles referentes al proceso de activación, el cual implica escisiones endoproteolíticas para la matriptasa humana. La matriptasa está unida a la membrana como una proteína transmembranal de tipo II con el dominio catalítico orientado en el espacio extracelular. Además, se describe en la bibliografía que *in vivo* se produce un desprendimiento significativo de la matriptasa, con respecto a su parte extracelular (remítase a List *et al.*, 2006 y Chen *et al.* 2012). Se describe en la bibliografía que la matriptasa se desprende en forma de un complejo, p. ej., complejada con el inhibidor de serín proteasas de tipo Kunitz HAI-1. Diferentes estudios sugieren que en células humanas el inhibidor específico HAI-1 facilita el transporte de la matriptasa hacia la membrana celular, ya que se observó que su eliminación o incluso mutaciones puntuales individuales en HAI-1 provocaron una acumulación de la matriptasa en el compartimiento de Golgi. En la bibliografía, se han descrito varios inhibidores endógenos diferentes de la matriptasa además de HAI-1 tales como HAI-2, antitrombina, antitripsina alfa-1 y antiplasmina alfa-2. Además, también se han descrito otros inhibidores de la matriptasa (remítase, p. ej., a Chen *et al.*, 2012). Se ha descrito en la bibliografía que la matriptasa puede desempeñar numerosas funciones en una fisiología normal, tales como una función de barrera cutánea, integridad epitelial, desarrollo de folículos pilosos y homeostasis del timo, y en patologías humanas tales como osteoartritis, aterosclerosis y evolución, invasión y metástasis de un tumor.

En contra de estos antecedentes científicos que no están relacionados con la producción recombinante de un polipéptido de interés, el presente descubrimiento de que la matriptasa es una proteasa clave responsable del *clipping* de polipéptidos de interés producidos de forma recombinante que son secretados por las células hospedadoras en el medio de cultivo celular fue muy sorprendente. Teniendo en cuenta el gran número y variedad de proteasas que se expresan en las células de vertebrado, tales como en particular las células de mamífero, fue incluso más sorprendente el hecho de que el debilitamiento de la función de esta única proteasa - la matriptasa - fuera suficiente para reducir de forma significativa o incluso eliminar el *clipping* del polipéptido secretado de interés en el medio de cultivo celular. Estos efectos favorables no se observan con otras proteasas incluso estrechamente relacionadas, lo que recalca la

importancia del descubrimiento de que la matriptasa es la enzima clave responsable del *clipping* de polipéptidos recombinantes secretados en el medio de cultivo celular. Como muestran los ejemplos, cuando se utilizan células de vertebrado alteradas, donde el efecto de la proteasa endógena matriptasa está debilitado, el *clipping* de un polipéptido recombinante de interés que es secretado por la célula en el medio de cultivo celular se reduce significativamente. P. ej., el hecho de debilitar la función de la matriptasa, ya sea mediante silenciamiento génico (p. ej., iARN según se muestra en el Ejemplo 1) o mutación del gen de la matriptasa endógena (p. ej., supresión de uno o ambos de los dos alelos de la matriptasa según se muestra en el Ejemplo 2 y 5), provoca una reducción significativa o incluso una eliminación completa del *clipping* del polipéptido expresado de forma recombinante y secretado de interés en el medio de cultivo celular. Se observó una reducción significativa del *clipping* para todos los polipéptidos evaluados que eran propensos a experimentar *clipping*, tales como anticuerpos IgG, proteínas de fusión-Fc, proteínas víricas glicosiladas y otras proteínas terapéuticamente activas. Por consiguiente, el hecho de utilizar una línea celular deficiente en matriptasa para producir un polipéptido de interés mediante expresión recombinante resulta favorable. Además, resulta evidente a partir de los ejemplos que la matriptasa escinde directamente el polipéptido de interés que es secretado en el medio de cultivo celular. Por lo tanto, cualquier debilitamiento del efecto de la matriptasa reduce el *clipping* del polipéptido expresado de forma recombinante que es secretado en el medio de cultivo celular. Además, según demuestran los ejemplos, el hecho de añadir un inhibidor selectivo de la matriptasa al medio de cultivo celular también puede reducir el *clipping*.

Debido a que el efecto de la proteasa endógena matriptasa está debilitado en la célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación, hay una cantidad menor o nula de matriptasa funcionalmente activa presente en el medio de cultivo celular en el que se cultivan dichas células, p. ej., debido a que dichas células presentan cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional en la superficie celular y/o liberan (p. ej., debido a su desprendimiento) cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional en el medio de cultivo celular. De este modo, la degradación proteolítica del polipéptido recombinante de interés que se secreta en el medio de cultivo celular se reduce significativamente o incluso se elimina, lo que supone una ventaja importante cuando se produce de forma recombinante un polipéptido de interés. Debido a que el *clipping* se reduce significativamente, el rendimiento del polipéptido intacto de interés se incrementa. Se produce una cantidad inferior o incluso nula de subproducto degradado proteolíticamente no funcional y potencialmente inmunogénico. Además, se determinó que estas células hospedadoras de vertebrado novedosas presentan por lo general unos buenos rendimientos de expresión y tienen unas buenas características de crecimiento, lo que hace que sean particularmente adecuadas como líneas celulares de producción. En lo sucesivo se describen ventajas adicionales y estas también resultan evidentes a partir de los ejemplos. Por lo tanto, estas células de vertebrado favorables permiten producir de forma recombinante un polipéptido de interés con una calidad y un rendimiento del producto mejorados. Además, el hecho de utilizar las células de vertebrado de acuerdo con la invención, las cuales son preferentemente células de mamífero, reduce el tiempo necesario para desarrollar una línea celular de producción para la producción recombinante de un polipéptido de interés. Es necesaria una optimización menor o incluso nula del polipéptido de interés con el fin de evitar o reducir el *clipping*, p. ej., mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos. En particular, la eliminación de los sitios de *clipping* se vuelve obsoleta. Además, cuando se utilizan estas células como línea celular de producción, se pueden evitar los procesos de purificación, los cuales consumen mucho tiempo, para eliminar la proteína degradada proteolíticamente. Por lo tanto, estas células de vertebrado presentan ventajas importantes cuando se utilizan como líneas celulares hospedadoras para tecnologías de producción recombinante.

La lista de secuencias muestra secuencias de aminoácidos ilustrativas para la matriptasa de diferentes especies de vertebrados tales como hámster (SEQ ID NO: 1 - secuencia de referencia de NCBI: XP_003495890), ser humano (SEQ ID NO: 2 - secuencia de referencia de NCBI: NP_068813), ratón (SEQ ID NO: 3 - secuencia de referencia de NCBI: NP_035306), rata (SEQ ID NO: 4 - secuencia de referencia de NCBI: NP_446087) y chimpancé (SEQ ID NO: 5 - secuencia de referencia de NCBI: NP_001189434). Como resulta evidente a partir de la Tabla 1, actualmente también se puede hacer referencia a la matriptasa como «supresor de tumorigenicidad proteína 14» (p. ej., para el ser humano) y «supresor de tumorigenicidad homólogo de la proteína 14» (p. ej., en ratón y hámster chino). El término «matriptasa», tal como se utiliza en la presente, engloba en particular cualquier proteína que comparta al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con una o más de las proteínas que se muestran en SEQ ID NO: 1-5 como proteína de referencia de la matriptasa y que presente la misma actividad proteolítica que dicha proteína de referencia de la matriptasa. La identidad, tal como se utiliza en la presente, se calcula en toda la longitud de la proteína de referencia. La matriptasa se distingue de otras proteasas. En la bibliografía, se han asignado varios nombres a la matriptasa, una selección de los cuales se proporciona en la Tabla 1. También se han asignado varios nombres a los genes correspondientes que codifican la enzima matriptasa, una selección de los cuales se proporciona en la Tabla 1. En el contexto de la invención, se hace referencia a la proteasa como «matriptasa», «MT-SP1», «supresor de tumorigenicidad proteína 14» o «supresor de tumorigenicidad homólogo de la proteína 14», para una mayor simplicidad. Sin embargo, el término «matriptasa» también engloba y se refiere a cualesquiera nombres alternativos de dicha proteína o el gen correspondiente, p. ej., utilizados para caracterizar la proteína o el gen correspondiente en diferentes especies. En el término «matriptasa» se incluyen homólogos y ortólogos de la matriptasa que tienen la misma función. En este contexto, cabe mencionar que la matriptasa-2 y la matriptasa-3 se refieren a proteasas que son distintas de la matriptasa (aunque relacionadas estructuralmente) y, por lo tanto, no quedan cubiertas por el término «matriptasa» tal como se utiliza en la presente.

Tabla 1: Nombres alternativos ilustrativos del gen de la matriptasa y/o el producto proteico codificado matriptasa que se utilizan en la bibliografía (orden alfabético)

Proteasa de 80 kDa del cáncer de mama
CAP3
Proteasa activadora del canal 3
EC 3.4.21.109
Epitina
HAI
Matriptasa
Matriptasa-1
Serín proteasa de tipo membrana 1
MT-SP1; MTSP1
Prostamina
PRSS14 g.p. (Homo sapiens), PRSS14
Serín endopeptidasa SNC19
Serín proteasa 14
Serín proteasa TADG-15; TADG-15; TADG15
SNC19
ST14 (nombre oficial del gen en el ser humano de acuerdo con HGNC)
St14 (nombre oficial del gen en ratón de acuerdo con MGI)
Supresión de tumorigenicidad-proteína 14; supresión de tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon, matriptasa, epitina)
Supresor de tumorigenicidad proteína 14
Supresor de tumorigenicidad homólogo de la proteína 14 (ratón)
TMPRSS14
Proteína del gen 15 que se expresa de forma diferencial y se asocia a un tumor

En la presente, también se hace referencia a un gen que codifica una proteína matriptasa como «gen de la matriptasa».

- 5 La secuencia genómica del gen de diferentes especies de mamífero es conocida y se describe, p. ej., en hámster chino (ID del gen según NCBI: 100755225); *Homo sapiens* (ID del gen según NCBI: 6768); *Mus musculus* (ID del gen según NCBI: 19143); *Rattus norvegicus* (ID del gen según NCBI: 114093); *Pan Troglodytes* (ID del gen según NCBI: 100188950) y otras. En la Tabla 1 se enumeran sinónimos para el gen de la matriptasa, habitualmente se utiliza «ST14» o «St14». La expresión «gen de la matriptasa», tal como se utiliza en la presente, engloba en particular
- 10 cualquier gen endógeno de una célula de vertebrado que codifica una proteína matriptasa según se muestra en SEQ ID NO: 1-5 o que codifica una proteína matriptasa que comparte al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un matriptasa 99% de identidad con una o más de las proteínas matriptasa que se muestran en SEQ ID NO: 1-5 como proteína de referencia de la matriptasa y que presenta la misma
- 15 actividad proteolítica que dicha proteína de referencia de la matriptasa. La identidad, tal como se utiliza en la presente, se calcula en toda la longitud de la proteína de referencia.

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a una célula de vertebrado modificada, tal como preferentemente una célula de mamífero, donde se debilita en dicha célula el efecto de la matriptasa endógena, la cual normalmente

20 es expresada de forma endógena por una célula de vertebrado no modificada correspondiente. Debido a esta alteración que debilita el efecto de la proteasa matriptasa endógena, la célula de vertebrado alterada descrita en la presente presenta o libera cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional en el medio de cultivo celular, con lo que el *clipping* del polipéptido secretado de interés en el medio de cultivo celular se reduce o incluso se evita completamente. Según demuestran los ejemplos, esta alteración, la cual puede ser transitoria o permanente, reduce

25 significativamente la degradación proteolítica de un polipéptido recombinante de interés que es secretado por dicha célula alterada en el medio de cultivo celular.

Existen varias posibilidades para alterar y, por lo tanto, modificar una célula de vertebrado con el fin de debilitar el efecto de la matriptasa endógena en dicha célula. El efecto de la matriptasa se puede debilitar, p. ej., a nivel del gen

30 o de la proteína. El efecto de la matriptasa se puede debilitar, por ejemplo, mediante la modificación de la estructura/secuencia de la matriptasa, la transcripción, traducción y/o transporte celular de la matriptasa. En lo sucesivo se describen opciones no limitantes.

Según se define en la reivindicación 1, el efecto de la matriptasa se debilita porque se reduce o elimina la expresión funcional del gen de la matriptasa en dicha célula. Esto se consigue mediante supresión génica, mutación génica,

35 delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores. Según muestran los ejemplos, el hecho de alterar la expresión del gen de la matriptasa mediante la reducción o eliminación de la expresión funcional del gen de la matriptasa, p. ej., mediante silenciamiento génico o mediante supresión génica, supone una medida muy eficaz para proporcionar una célula de vertebrado que sea adecuada para expresar un polipéptido recombinante de interés donde, a pesar de ello, el *clipping* del polipéptido secretado de interés en el medio de cultivo

40

celular se reduzca o incluso se elimine completamente. Se descubrió que, cuando se reducía o eliminaba la expresión funcional del gen de la matriptasa en una célula de vertebrado, el *clipping* de un polipéptido recombinante secretado de interés en el medio de cultivo celular se reducía del mismo modo. Esta correlación es un descubrimiento inesperado.

La reducción o eliminación de la expresión funcional de la matriptasa se puede conseguir de varias maneras. La expresión funcional se puede reducir, por ejemplo, reduciendo el nivel de expresión de la matriptasa o reduciendo la actividad catalítica de la matriptasa o mediante una combinación de ambas. De acuerdo con una realización, la célula se altera de modo que la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduzca o elimine mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores. De acuerdo con una realización, el genoma de la célula de vertebrado se altera para debilitar el efecto de la matriptasa.

De acuerdo con una realización, la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en la célula mediante supresión génica. Una supresión génica es una técnica genética mediante la cual se hace que un gen sea inoperante alterando su función. P. ej., se puede insertar un ácido nucleico en la secuencia codificante, con lo que se altera de este modo la función del gen. Además, se puede eliminar el gen de la matriptasa completo o una porción de este, con lo que la célula alterada correspondientemente no expresa la proteína o expresa una proteína no funcional. Otra opción consiste en introducir una o más mutaciones de supresión en la secuencia codificante, lo cual conduce a un producto de expresión no funcional o menos funcional. P. ej., se pueden introducir una o más mutaciones de desplazamiento del marco que den como resultado una proteína no funcional o menos funcional. Como alternativa o de forma adicional, se pueden introducir uno o más codones de parada en la secuencia codificante, de modo que se obtenga una proteína truncada, no funcional o menos funcional. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el gen de la matriptasa comprende una o más mutaciones que proporcionan un producto de expresión no funcional o menos funcional. De acuerdo con una realización, dicha una o más mutaciones son mutaciones de desplazamiento del marco o del codón de parada. De acuerdo con una realización, la totalidad o parte del dominio de la proteasa localizado en el extremo C de la matriptasa no está presente debido a dicha una o más mutaciones que se han introducido. Otras opciones incluyen, sin carácter limitante, la introducción de una o más mutaciones en el promotor, en 5'UTR, 3' UTR y/u otros elementos reguladores. De acuerdo con una realización, la función del promotor del gen de la matriptasa se altera, p. ej., mediante la introducción de una delección del promotor o mediante la introducción de un constructo entre el promotor y el inicio de la transcripción. Los expertos en la técnica también estarán familiarizados con los métodos para conseguir una supresión génica con el fin de suprimir o eliminar la expresión funcional de un gen diana y, por lo tanto, no necesitan ninguna descripción detallada en la presente. A pesar de ello, a continuación se describen algunos ejemplos no limitantes.

De acuerdo con una realización, el gen de la matriptasa se suprime funcionalmente mediante modificación genética. Algunos ejemplos incluyen, sin carácter limitante, una edición del genoma tal como una edición del genoma con nucleasas modificadas genéticamente (GEEN). Esta es un tipo de modificación genética en la que se inserta, reemplaza o elimina ADN de un genoma utilizando nucleasas modificadas genéticamente de forma artificial o «tijeras moleculares». Las nucleasas crean roturas bicatenarias específicas (DSB) en ubicaciones deseadas del genoma y se aprovechan de los mecanismos endógenos de la célula para reparar la rotura inducida mediante procesos naturales de recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Existen al menos cuatro familias de nucleasas modificadas genéticamente que se pueden utilizar con este fin: nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), una nucleasa que reconoce repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y endonucleasas buscadoras de dianas remodeladas genéticamente que son meganucleasas modificadas genéticamente. En los ejemplos también se utilizó la tecnología TALEN para proporcionar células de mamífero alteradas donde el gen de la matriptasa se había suprimido de forma total o parcial, con lo que se debilitó el efecto de la matriptasa en dichas células.

De acuerdo con una realización, una o más copias del gen de la matriptasa presentes en el genoma de la célula de vertebrado se alteran, p. ej., mediante supresión o delección, para reducir o eliminar y, por lo tanto, debilitar el efecto de la matriptasa en la célula de vertebrado. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, al menos una copia del gen de la matriptasa se elimina o desactiva funcionalmente en el genoma de la célula de vertebrado. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado comprende una o más mutaciones en al menos una copia del gen de la matriptasa para proporcionar un producto de expresión no funcional o menos funcional. En general, una célula de vertebrado comprende dos copias alélicas del gen de la matriptasa. Se pueden insertar una o más mutaciones en una o ambas copias del gen de la matriptasa. Preferentemente, se insertan una o más mutaciones en ambas copias, correspondientemente todas las copias, del gen de la matriptasa para proporcionar un producto de expresión no funcional o menos funcional y, por lo tanto, para debilitar el efecto de la matriptasa en la célula de vertebrado. De este modo, todas las copias del gen de la matriptasa están básicamente debilitadas o desactivadas en el genoma. Según se muestra en los ejemplos, se pueden introducir diferentes mutaciones en los diferentes alelos del gen de la matriptasa para conseguir el debilitamiento.

De acuerdo con una realización, dicha una o más mutaciones están comprendidas en una región codificante del gen de la matriptasa y dan como resultado un producto de expresión no funcional o menos funcional. P. ej., la función de la matriptasa se puede debilitar debido a que la célula de vertebrado alterada comprende una o más mutaciones en una región del gen de la matriptasa que codifica una secuencia de aminoácidos presente en más de una variante de corte y empalme funcional y, por lo tanto, activa catalíticamente de la matriptasa. Se han identificado varias variantes

de corte y empalme de la matriptasa en diferentes especies. Se han encontrado varios de los exones de la matriptasa en la mayoría o incluso todas las variantes de corte y empalme funcionales identificadas. Resulta favorable introducir una o más mutaciones en una región del gen de la matriptasa que codifica un exón que está presente en más de una, preferentemente en la mayoría de, o incluso todas las variantes de corte y empalme funcionales de la matriptasa de la célula de vertebrado respectiva.

De acuerdo con una realización, una o más mutaciones están comprendidas en una secuencia de polinucleótido que codifica el exón 2 de la matriptasa. El hecho de seleccionar el exón 2 como diana para la alteración con el fin de debilitar la función de la proteasa endógena matriptasa en la célula de vertebrado alterada presenta la ventaja de que esta estrategia cubre varias variantes de corte y empalme funcionales diferentes. Los exones cercanos al extremo N de la matriptasa tales como, p. ej., el exón 1, exón 2 y exón 3 son dianas favorables para la introducción de una o más mutaciones, en particular una o más mutaciones de desplazamiento del marco. Una mutación de desplazamiento del marco en uno de estos exones probablemente conduzca a un codón de detención en la zona inicial de la secuencia. La proteína truncada codificada por el gen mutado probablemente sea corta y se asume que se localizará en una zona intracelular y/o que no será activa. Una proteína truncada inactiva es favorable ya que se puede asumir que su expresión no será tóxica para las células. Sin embargo, también se pueden introducir una o más mutaciones en uno de los exones posteriores, p. ej., seleccionados a partir de los exones 4-19.

En los ejemplos, se generan células CHO que comprenden diferentes mutaciones de desplazamiento del marco en el exón 2. Los ejemplos muestran que las células alteradas correspondientemente sostuvieron crecimiento celular. Por consiguiente, la versión o versiones truncadas codificadas de la matriptasa evaluadas en los ejemplos fueron aparentemente atóxicas para las células. Además, se observó que la expresión del ARNm global del gen de la matriptasa mutado correspondientemente era inferior, de modo que se obtuvieron niveles menores de la versión truncada (remítase a la Fig. 3). Por lo tanto, los ejemplos demuestran que una alteración correspondiente es eficaz con el fin de debilitar la función de la matriptasa en una célula de vertebrado tal como una célula de mamífero a la vez que se mantienen otras características que son importantes para la producción recombinante de un polipéptido de interés. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la célula de vertebrado aislada comprende al menos una mutación de desplazamiento del marco en el exón 2 del gen de la matriptasa que da como resultado el hecho de que se expresa un polipéptido truncado no funcional o menos funcional. De acuerdo con una realización preferida, la célula de vertebrado es una célula CHO que comprende una o más mutaciones de desplazamiento del marco en el exón 2 de un alelo, o preferentemente ambos alelos, del gen de la matriptasa, con lo que el efecto de la matriptasa se debilita en dicha célula CHO.

De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado comprende una o más mutaciones en una secuencia de polinucleótido del gen de la matriptasa que codifica al menos parte del dominio catalítico de la matriptasa, con lo que se obtiene un producto de expresión no funcional o menos funcional. El dominio catalítico es la región de una enzima que interacciona con su sustrato para provocar la reacción enzimática. Se pueden introducir una o más mutaciones en este dominio de modo que se reduzca o elimine la actividad catalítica de la proteína. El dominio catalítico está codificado por aminoácidos en los exones 16, 17, 18 y 19. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la célula de vertebrado comprende una o más mutaciones en uno o más exones seleccionados entre el exón 16, exón 17, exón 18 y exón 19. De acuerdo con una realización, dicha una o más mutaciones en el dominio catalítico conducen a una reducción o eliminación de la actividad catalítica de la matriptasa. Esto se puede conseguir, p. ej., mediante una mutación de desplazamiento del marco, mediante una mutación puntual específica, una mutación de un codón de parada y/o una delección o inserción en el dominio catalítico. De acuerdo con una realización, se introducen una o más mutaciones de modo que la tríada catalítica de la matriptasa se altera, con lo que se proporciona una proteína no funcional o menos funcional. En la bibliografía también se han descrito mutantes catalíticos inactivos de la matriptasa tales como, p. ej., la matriptasa G827R o matriptasa S805A (remítase a Désilets *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 283, N.º 16, págs. 10535-10542, 2008). Además, se conoce la estructura cristalina del dominio catalítico de una matriptasa recombinante. A partir de esta estructura y los datos de la secuencia, el experto puede derivar dianas específicas adicionales para las mutaciones con el fin de debilitar la función catalítica de la matriptasa.

También se pueden obtener células alteradas en las que la expresión funcional de la matriptasa esté debilitada utilizando estrategias de cribado o mutagénesis aleatoria. En la técnica anterior existe constancia de los métodos respectivos y, por consiguiente, no es necesario que se describan detalladamente. A continuación, las células alteradas en las que la expresión funcional de la matriptasa está debilitada se pueden identificar utilizando, p. ej., el método de acuerdo con el séptimo aspecto.

La expresión funcional de la matriptasa también se puede ver influida por la alteración del promotor y/o potenciador del gen de la matriptasa, de modo que se produzca una cantidad de transcrito menor o nula, o por tecnologías de silenciamiento génico tales como silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado aislada comprende una o más mutaciones en la región del promotor del gen de la matriptasa. Por ejemplo, la región del promotor se puede alterar para proporcionar un promotor no funcional o menos funcional; también se puede eliminar completamente el promotor. Como alternativa o de forma adicional a esto, es posible añadir una secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido que incluya un codón de parada entre el promotor y el codón de inicio del gen de la matriptasa, lo cual conduciría a la expresión del otro polipéptido en lugar de la matriptasa. El polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótido insertada entre el promotor y el codón de

inicio puede ser, por ejemplo, un polipéptido indicador tal como la proteína de fluorescencia verde (GFP). La señal del indicador determinará que se expresa el polinucleótido heterólogo que codifica el indicador en lugar de la matriptasa, lo que permite identificar fácilmente las células en las que se ha debilitado la expresión funcional de la matriptasa.

- 5 La reducción de la expresión del gen funcional puede llegar a un nivel en el que incluso se elimine la expresión funcional.

El silenciamiento génico postranscripcional se puede conseguir, p. ej., utilizando moléculas antisentido o moléculas que medien en la interferencia por ARN. En lo sucesivo se describirán brevemente ejemplos no limitantes.

- 10 Se pueden diseñar polinucleótidos antisentido para que se unan específicamente al ARN, lo cual da como resultado la formación de híbridos ARN-ADN o ARN-ARN, con una detención de la transcripción inversa o la traducción del ARN mensajero. Se han desarrollado muchas formas de antisentido y se pueden clasificar ampliamente en antisentido dependiente de enzima o antisentido de bloqueamiento estérico. El antisentido dependiente de enzima incluye formas dependientes de la actividad de ARNasa H para degradar ARNm diana, que incluyen antisentido de ADN monocatenario, ARN y fosforotioato. Los polinucleótidos antisentido son generados habitualmente por la célula mediante la expresión a partir de constructos antisentido que contienen la hebra antisentido como hebra transcrita. Los ARN catalíticos de escisión en trans (ribozimas) son moléculas de ARN que poseen actividad de endorribonucleasa. Las ribozimas se pueden diseñar específicamente para una diana particular y se pueden modificar genéticamente para que escindan cualquier especie de ARN de forma específica según el sitio en el entorno de ARN celular. El evento de escisión hace que el ARNm sea inestable y evita la expresión de la proteína. El genoma de la célula de vertebrado se puede alterar de modo que se exprese una molécula antisentido respectiva, p. ej., de forma permanente.

- 25 Otra opción adecuada para reducir la expresión funcional del gen de la matriptasa a nivel postranscripcional se basa en la interferencia por ARN (iARN). Según muestran los ejemplos basados en experimentos de adición (*spike-in*), el hecho de reducir la expresión de la matriptasa mediante iARN es eficaz a la hora de reducir el grado de *clipping* de polipéptidos recombinantes de interés que son expresados y secretados en el medio de cultivo celular por las células de vertebrado alteradas correspondientemente. Una cantidad significativamente mayor de polipéptido recombinante permanece intacta en el medio de cultivo celular/sobrenadante tras silenciar el gen de la matriptasa mediante iARN y, por lo tanto, se puede recolectar a partir de este. Por el contrario, la reducción de los niveles de expresión de otras proteasas, incluso serán proteasas estrechamente relacionadas, presentó un efecto pequeño o nulo sobre el *clipping*. Esto enfatiza la importancia de haber identificado con la matriptasa la principal proteasa responsable del *clipping* cuando se expresa un polipéptido recombinante de interés en una célula de vertebrado tal como preferentemente en una célula de mamífero. Los expertos en la técnica estarán muy familiarizados con los métodos para silenciar un gen diana mediante iARN y, por lo tanto, estos no requieren ninguna descripción detallada en la presente. Los ejemplos de compuestos inductores de iARN que se pueden utilizar para silenciar la expresión del gen de la matriptasa para proporcionar de este modo una célula alterada en la que el efecto de la matriptasa esté debilitado incluyen, sin carácter limitante, ácidos nucleicos interferentes pequeños (ANip), ARN interferente pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN horquillado pequeño (ARNhp), así como precursores de estos que son procesados en la célula para obtener el compuesto inductor de iARN real. De acuerdo con una realización, se utiliza un ARNip para el silenciamiento. El ARNip se puede proporcionar como una molécula bicatenaria con protuberancias 3' en cada hebra. También se pueden utilizar moléculas con extremos romos. Dicho ARNip puede comprender desoxi- así como también ribonucleótidos y, además, puede comprender nucleótidos modificados. En la técnica anterior existe constancia de varias realizaciones y variaciones de compuestos de tipo ARNip y se pueden utilizar para reducir la expresión de la matriptasa. Los ARNip adecuados que tienen como diana las secuencias diana identificadas/seleccionadas de los genes diana a nivel de ARN se pueden identificar utilizando métodos computacionales adecuados, aplicando ciertos algoritmos-diseños. Con el fin de obtener un ARNip contra el transcrito diana, la molécula bicatenaria se puede transfectar directamente en la célula. Según muestran los ejemplos, incluso tales métodos transitorios que reducen la expresión de la matriptasa son eficaces para evitar el *clipping* de un polipéptido de interés en el medio acondicionado obtenido a partir de tales células de vertebrado. Como alternativa, el ARNip puede proceder del procesamiento con dicer, una enzima que convierte ya sea ARNbc largos o ARN horquillados pequeños (ARNhp) en ARNip. Estos precursores o las moléculas de ARNip finales se pueden producir de forma exógena (artificial) y se pueden introducir a continuación en las células de vertebrado mediante varios métodos de transfección. De acuerdo con una realización adicional, el compuesto inductor de iARN es expresado por un vector que se transfecta en la célula de vertebrado. Para el ARNip, esto se puede llevar a cabo, p. ej., mediante la introducción de un bucle entre las dos hebras, con lo que se produce un único transcrito, el cual se puede procesar a continuación para obtener un ARNip funcional en la célula de vertebrado. Tales casetes de transcripción emplean habitualmente un promotor de la ARN-polimerasa III (por ejemplo, U6 o H1), el cual dirige normalmente la transcripción de ARN nucleares pequeños (p. ej., para expresar ARNhp). Se asume que el transcrito de ARNhp resultante del vector es procesado a continuación por dicer, con lo que se producen de este modo las moléculas de ARNip bicatenarias, que tienen preferentemente la característica de protuberancias 3'. De acuerdo con una realización, tal vector que proporciona ARNhp se integra de forma estable en el genoma de la célula de vertebrado. Esta realización es favorable, ya que la reducción de la expresión del gen de la matriptasa es debida al ARNip producido constantemente, que es bastante estable y no es transitorio. P. ej., las células que comprenden un vector que proporciona ARNhp respectivo pueden ser transfectadas a continuación con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés que ha de ser expresado y secretado por la célula

de vertebrado. Además, se pueden utilizar estrategias de cotransfección, donde el vector que genera el ARNhp se cotransfecta con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés.

5 El silenciamiento génico transcripcional puede incluir, p. ej., modificaciones genéticas. Además, la secuencia del gen de la matriptasa se puede modificar para reducir la semivida del ARNm. Esto también puede lograr una reducción en la expresión funcional de la matriptasa.

10 De acuerdo con una realización, la expresión de la matriptasa se reduce o elimina actuando sobre un elemento regulador implicado en la regulación de la expresión del gen de la matriptasa. P. ej., se puede actuar sobre un factor de la transcripción, promotor (remítase también más arriba), potenciador, UTR u otro elemento regulador, p. ej., mediante supresión, delección, mutación, reducción de su expresión o cualquier otra alteración que desactive o reduzca la actividad de dicho elemento regulador, con lo que se evita o reduce de este modo la expresión funcional del gen de la matriptasa y se debilita de este modo el efecto de la matriptasa en dichas células.

15 De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado se altera para debilitar la función de la matriptasa mediante la expresión heteróloga de una matriptasa mutada, la cual es no funcional o menos funcional que la matriptasa endógena. En esta realización, la célula de vertebrado aislada comprende, además del polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés, un polinucleótido heterólogo adicional que codifica una matriptasa mutada. La matriptasa mutada presenta una actividad catalítica reducida o incluso nula en comparación con la matriptasa endógena. Al sobreexpresar una matriptasa mutada respectiva, se incrementa la probabilidad de que la forma inactiva mutada se inserte en la membrana plasmática en lugar de la matriptasa endógena, con el fin de crear un fenotipo negativo dominante. Una opción adicional para debilitar y, por lo tanto, reducir el efecto de la matriptasa que es expresada normalmente por la célula consiste en la expresión heteróloga de una proteína tal como un anticuerpo o un inhibidor de la matriptasa que neutralice y/o inhiba la matriptasa y, por lo tanto, debilite el efecto de la matriptasa.

25 De acuerdo con una realización, el efecto de la matriptasa se debilita en la célula alterando la expresión funcional de moléculas que interaccionan funcionalmente con la matriptasa en la célula.

30 De acuerdo con una realización, la función de la matriptasa se debilita en la célula dificultando el tráfico intracelular de la matriptasa.

35 De acuerdo con otra realización, la función de la matriptasa se debilita dificultando la activación del zimógeno de la matriptasa. De acuerdo con una realización, la función de la matriptasa se debilita aumentando la expresión de uno o más inhibidores celulares endógenos de la matriptasa y/o mediante la coexpresión de un inhibidor de la matriptasa. Hasta la fecha, se han descrito varios inhibidores endógenos de la matriptasa en diferentes células de vertebrado tales como HAI-1, HAI-2, alfa1-antitripsina, alfa2-antiplasmina, antitrombina (remítase al artículo de revisión de Chen *et al.*, 2012). Si son expresados por la célula de vertebrado que se ha de alterar, un aumento de la expresión de estos inhibidores y/o una coexpresión de estos inhibidores también puede debilitar la función de la proteasa endógena matriptasa, con lo que se reduce de este modo el *clipping* del polipéptido secretado de interés en el medio de cultivo celular.

45 De acuerdo con una realización, la expresión funcional de la matriptasa se debilita mediante la expresión recombinante de un antagonista tal como un anticuerpo o un dominio de unión de este. P. ej., un antagonista correspondiente puede ser sobreexpresado por la célula de vertebrado.

De acuerdo con una realización, la secuencia codificante de la matriptasa se altera de modo que la proteína permanece en el ER. P. ej., la proteína matriptasa se puede alterar para que incluya un motivo KDEL, el cual ejerce como efecto que la matriptasa permanezca en el ER. También se pueden utilizar estrategias similares.

50 El debilitamiento del efecto de la proteasa endógena matriptasa da como resultado una célula alterada, donde el *clipping* del polipéptido recombinante de interés que es expresado y secretado por dicha célula alterada se reduce o incluso está ausente en comparación con una célula de vertebrado correspondiente en la que la función de la proteasa endógena matriptasa no está debilitada. Según se describe en la presente, cuando se utilizan las células alteradas correspondientemente donde el efecto de la matriptasa está debilitado como células hospedadoras para la expresión recombinante, una cantidad menor o nula de matriptasa funcional es activa en el medio de cultivo celular que contiene dichas células hospedadoras y en el cual se secreta el polipéptido de interés.

60 De acuerdo con una realización, la expresión del gen de la matriptasa es un 40% o inferior, un 35% o inferior, un 30% o inferior, un 25% o inferior, un 20% o inferior, un 15% o inferior, un 12.5% o inferior, un 10% o inferior, un 5% o inferior, un 2.5% o inferior, un 1.5% o inferior, un 1% o inferior o un 0.05% o inferior en comparación con la expresión del gen de la matriptasa en una célula de vertebrado de referencia correspondiente no alterada en la que el efecto de la matriptasa no está debilitado (que se fija como un 100%). De acuerdo con una realización, en la célula alterada de acuerdo con el primer aspecto, la expresión del gen de la matriptasa es un 0.1% o inferior, un 0.075% o inferior, un 0.05% o inferior, un 0.045% o inferior, un 0.04% o inferior, un 0.035% o inferior, un 0.03% o inferior, un 0.025% o inferior, un 0.02% o inferior, un 0.015% o inferior, un 0.01% o inferior, un 0.0075% o inferior, un 0.005% o inferior, un 0.0045% o inferior, un 0.004% o inferior, un 0.0035% o inferior, un 0.003% o inferior, un 0.0025% o inferior, un 0.002% o inferior.

o inferior, un 0.0015% o inferior o un 0.001% o inferior en comparación con la expresión del ARN 18S (que se fija como un 100%) en dicha célula. De acuerdo con una realización, la expresión del gen de la matriptasa es un 0.00075% o inferior, un 0.0005% o inferior o un 0.0004% o inferior en comparación con la expresión del ARN 18S (que se fija como un 100%) en dicha célula. La expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina de modo que el *clipping* de un polipéptido recombinante de interés que es secretado por dicha célula en el medio de cultivo celular se reduce en comparación con una célula de vertebrado de referencia correspondiente (de la que deriva la célula alterada) donde la expresión funcional del gen de la matriptasa no se ha reducido o eliminado. P. ej., una célula CHO alterada en la que se reduce la expresión funcional de la matriptasa se compara con una célula CHO natural como célula de vertebrado de referencia con el fin de analizar dicha característica. Como polipéptido de prueba, se utiliza un polipéptido que es propenso a experimentar *clipping* cuando es expresado por la célula de vertebrado de referencia. De acuerdo con una realización, el *clipping* se reduce al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 7.5 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces en comparación con una célula de vertebrado de referencia correspondiente en la que la expresión funcional del gen de la matriptasa no se ha reducido o eliminado. Esto se puede evaluar utilizando, p. ej., los ensayos descritos en los ejemplos.

La célula de vertebrado alterada deriva de una especie y tipo celular que expresa la matriptasa de forma endógena. La célula de vertebrado es preferentemente una célula de mamífero. De este modo, todas las realizaciones descritas en la presente para una célula de vertebrado se aplican en general y se refieren específicamente a la realización preferida en la que se utiliza una célula de mamífero. El término «aislada» se utiliza simplemente para dejar claro que la célula de vertebrado no está contenida en ningún organismo vivo tal como un animal o ser humano. La célula de vertebrado, según se describe en la presente, se puede proporcionar en forma de un cultivo celular, una línea celular, un clon celular y similares. Más adelante también se describen ejemplos. Según se ha descrito anteriormente, dicha célula de vertebrado está alterada para debilitar el efecto de la matriptasa en comparación con una célula de vertebrado no alterada correspondiente que expresa la matriptasa de forma endógena. El debilitamiento se consigue preferentemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa. Anteriormente se han descrito realizaciones. Con el fin de proporcionar una línea celular de producción con características estables, uniformes y, por lo tanto, predecibles, se prefiere alterar el genoma de la célula de vertebrado para conseguir el debilitamiento de la matriptasa. Anteriormente se han descrito realizaciones adecuadas. A continuación, la célula de vertebrado alterada correspondientemente se puede transfectar con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés para proporcionar las células hospedadoras de acuerdo con la presente divulgación que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés y que secretan el polipéptido de interés en el medio de cultivo celular. La célula de vertebrado es preferentemente una célula de mamífero y se puede seleccionar, p. ej., del grupo constituido por células de roedores, células humanas y células de mono. Las células de vertebrado preferidas son células de roedor tales como, por ejemplo, células derivadas de hámster o ratón. La célula de roedor puede ser una línea celular seleccionada del grupo constituido por una línea celular de hámster chino (tal como, p. ej., una línea celular de ovario de hámster chino (CHO)), una línea celular BHK, una línea celular NS0, una línea celular C127, una línea celular de fibroblasto 3T3 de ratón y una línea celular SP2/0. Se prefiere particularmente una célula CHO tal como una célula CHO derivada de CHO-K1. Según se muestra en los ejemplos, el hecho de reducir o eliminar la expresión funcional de la matriptasa en una célula CHO proporciona un medio de cultivo celular acondicionado en el que el *clipping* del polipéptido secretado de interés se reduce significativamente o incluso se elimina. La matriptasa también se expresa en células humanas. De este modo, de acuerdo con una realización, la célula de vertebrado deriva de una célula humana, la cual se puede seleccionar, p. ej., del grupo constituido por una célula HEK293, una célula MCF-7, una célula PerC6, una célula CAP, células hematopoyéticas y una célula HeLa. Otra alternativa son células de mono, las cuales, p. ej., se pueden seleccionar del grupo constituido por una célula COS, COS-1, una célula COS-7 y una célula Vero. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado se proporciona como un clon celular, una línea celular o un cultivo celular.

El «polipéptido de interés» es el polipéptido recombinante que se supone que ha de ser expresado y secretado por la célula de vertebrado en gran cantidad. El polipéptido de interés está codificado por un polinucleótido heterólogo comprendido en dicha célula. Dicha célula hospedadora puede comprender más de un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés. El polipéptido de interés es secretado por la célula de vertebrado en el medio de cultivo celular a partir del cual se puede recolectar, p. ej., aislar y purificar.

Un «polinucleótido heterólogo» o «ácido nucleico heterólogo» y expresiones similares utilizadas en la presente se refieren en particular a una secuencia de polinucleótido que ha sido introducida en la célula de vertebrado, p. ej., mediante el uso de técnicas recombinantes tales como la transfección. Un «polinucleótido» se refiere en particular a un polímero de nucleótidos que están unidos normalmente desde una desoxirribosa o ribosa hasta otra y se refiere a ADN así como también ARN, dependiendo del contexto. El término «polinucleótido» no comprende ningunas restricciones de tamaño.

La célula de vertebrado puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable y/o polinucleótido heterólogo que codifica un indicador, además de dicho al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés. Esto simplifica la selección de células hospedadoras que son transfectadas con éxito y, por lo tanto, expresan el polinucleótido de interés. Además, la célula de vertebrado puede comprender varios polinucleótidos que codifican diferentes marcadores seleccionables y/o polipéptidos indicadores.

Un «marcador seleccionable» permite, en unas condiciones de cultivo selectivas adecuadas, la selección de células hospedadoras que expresan dicho marcador seleccionable. Un marcador seleccionable proporciona el portador de dicho marcador en condiciones selectivas con una ventaja de supervivencia y/o crecimiento. Habitualmente, un gen marcador seleccionable conferirá resistencia a un agente de selección tal como un fármaco, p. ej., un antibiótico u otro agente tóxico, o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula hospedadora. Puede ser un marcador de selección positivo o negativo. De acuerdo con una realización, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a un fármaco que codifica una proteína que confiere resistencia a unas condiciones de selección en las que participa dicho fármaco. Se han descrito varios genes marcadores seleccionables (remítase, p. ej., a WO 92/08796, WO 94/28143, WO2004/081167, WO2009/080759, WO2010/097240). P. ej., se puede utilizar al menos un marcador seleccionable, el cual confiere resistencia frente a uno o más agentes antibióticos. El marcador seleccionable puede ser, de acuerdo con una realización, un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable permite la selección de un vector que contiene células hospedadoras y puede propiciar la amplificación génica de dicho vector en las células hospedadoras. Los genes marcadores seleccionables empleados habitualmente con células de vertebrado incluyen los genes para la aminoglicósido-fosfotransferasa (APH), higromicina-fosfotransferasa (hyg), dihidrofolato-reductasa (DHFR), timidín cinasa (tk), glutamina-sintetasa, asparagina-sintetasa y genes que codifican resistencia a la neomicina (G418), puromicina, higromicina, zeocina, ouabaina, blasticidina, histidinol D, bleomicina, fleomicina y ácido micofenólico. De acuerdo con una realización, se utiliza un receptor de folato como marcador seleccionable conjuntamente con las células de vertebrado novedosas descritas en la presente (remítase, p. ej., a WO2009/080759), las cuales son preferentemente células de mamífero. El receptor de folato también se puede utilizar combinado con DHFR como marcador seleccionable según se describe en WO10/097240. Un «polipéptido indicador» permite la identificación de una célula que expresa dicho polipéptido indicador basándose en las características indicadoras (p. ej., fluorescencia). Los genes indicadores normalmente no proporcionan a las células hospedadoras una ventaja de supervivencia. A pesar de ello, la expresión del polipéptido indicador se puede utilizar para diferenciar las células que expresan el polipéptido indicador y aquellas células que no lo expresan. Por consiguiente, un gen indicador también permite la selección de las células hospedadoras transfectadas con éxito. Los polipéptidos indicadores adecuados incluyen, sin carácter limitante, p. ej., la proteína de fluorescencia verde (GFP), YFP, CFP y luciferasa. De acuerdo con una realización, el polipéptido indicador tiene características que hacen posible la selección mediante citometría de flujo.

De acuerdo con una realización, dicho al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés se integra en el genoma de dicha célula y donde, opcionalmente, al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable o polipéptido indicador se integra adicionalmente en el genoma de dicha célula.

Se puede utilizar un vector de expresión para introducir un polinucleótido heterólogo en la célula hospedadora. Los polinucleótidos pueden estar comprendidos en un casete de expresión. El o los polinucleótidos que codifican el polipéptido de interés y el o los polinucleótidos que codifican un marcador seleccionable o polipéptido indicador pueden estar localizados en el mismo vector de expresión o en diferentes vectores de expresión. Si están localizados en diferentes vectores de expresión, los vectores de expresión se cotransfectan en la célula hospedadora. Tales estrategias de cotransfección permiten del mismo modo la selección según existe amplia constancia en la técnica anterior. La introducción en la célula de vertebrado se puede conseguir, p. ej., transfectando un vector de expresión adecuado que comprenda el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en las células hospedadoras. El vector de expresión se integra preferentemente en el genoma de la célula hospedadora (transfección estable). En el caso de que el ácido nucleico heterólogo no se inserte en el genoma, el ácido nucleico heterólogo se puede perder en un estadio posterior, p. ej., cuando las células experimenten mitosis (transfección transitoria). Se prefiere la transfección estable para generar clones celulares de alta expresión con el fin de producir un polipéptido de interés a escala industrial. Esto resulta particularmente importante para polipéptidos de interés terapéuticamente activos o de diagnóstico. En la técnica anterior se conocen varios métodos adecuados para introducir un ácido nucleico heterólogo tal como un vector de expresión en células hospedadoras de vertebrado, las cuales son preferentemente células hospedadoras de mamífero y, por lo tanto, no se requiere ninguna descripción detallada en la presente. Los métodos respectivos incluyen, sin carácter limitante, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transferencia de genes mediada por polímeros y biolística, y similares. Además de los métodos tradicionales basados en una integración aleatoria, también se pueden utilizar estrategias mediadas por recombinación con el fin de transferir el polinucleótido heterólogo en el genoma de la célula hospedadora. Ya que los métodos respectivos son muy conocidos en la técnica anterior, no requieren ninguna descripción detallada en la presente. Posteriormente también se describen realizaciones no limitantes de diseños de vectores adecuados y se hace referencia a la divulgación respectiva.

Los vectores de expresión utilizados para conseguir la expresión de un polipéptido de interés en la célula hospedadora contienen normalmente elementos de control de la transcripción adecuados para dirigir la transcripción tales como, p. ej., promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, señales de terminación o pausa de la transcripción, normalmente como elemento de un casete de expresión. Preferentemente, en el vector se incluyen elementos adecuados de control de la traducción tales como, p. ej., regiones no traducidas 5' que conducen a estructuras de caperuza 5' adecuadas para captar ribosomas y codones de parada con el fin de terminar el proceso de traducción. Los transcritos resultantes contienen elementos funcionales de traducción que facilitan la expresión (es decir, traducción) de las proteínas y la terminación adecuada de la traducción. Una unidad de expresión funcional, capaz de dirigir adecuadamente la expresión de un polinucleótido incorporado también se denomina «casete de expresión». Un

experto sabrá cómo se debe diseñar un casete de expresión con el fin de permitir la expresión y secreción de un polipéptido de interés en una célula de vertebrado.

- 5 Para conseguir la secreción del polipéptido recombinante de interés en el medio de cultivo celular, se proporciona un péptido líder adecuado en el polipéptido de interés. Los diseños de los casetes de expresión y las secuencias líder para conseguir la secreción del polipéptido de interés son muy conocidos en la técnica anterior y, por consiguiente, no es necesario que se describan en la presente.

- 10 Se puede expresar cualquier polipéptido de interés en la célula de vertebrado de acuerdo con la invención. El término «polipéptido» se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre sí mediante uno o más enlaces peptídicos. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluidas las proteínas (p. ej., que tienen más de 50 aminoácidos) y los péptidos (p. ej., 2- 49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad, función o tamaño, y pueden incluir, p. ej., enzimas (p. ej., cinasas, fosfatasas), receptores, transportadores, proteínas bactericidas y/o de unión a endotoxinas, polipéptidos estructurales, polipéptidos unidos a la membrana, glicopolipéptidos, proteínas globulares, polipéptidos inmunitarios, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, factores sanguíneos, vacunas, glicopolipéptidos víricos y similares. El polipéptido de interés que se expresa de acuerdo con las doctrinas descritas en la presente también puede ser una subunidad o dominio de un polipéptido tal como, p. ej., una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado de este. La expresión «polipéptido de interés» se puede referir a una subunidad o dominio individual de este tipo o a la proteína final que está compuesta por las respectivas subunidades o dominios, dependiendo del contexto.

- 25 De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés se selecciona entre un polipéptido terapéutico o de diagnóstico. Los polipéptidos terapéuticos y, por lo tanto, terapéuticamente activos son particularmente importantes. La expresión «polipéptidos terapéuticos» también engloba polipéptidos profilácticos, p. ej., utilizados para la vacunación. El polipéptido se puede seleccionar del grupo constituido por hormonas peptídicas, interleucinas, activadores tisulares del plasminógeno, citocinas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas, en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpos funcionales o variantes o derivados de estos y proteínas de fusión-Fc. En una realización, el polipéptido de interés es una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo. El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, se refiere en particular a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas mediante enlaces de disulfuro. El término «anticuerpo» incluye anticuerpos de origen natural, así como también todas las formas recombinantes de los anticuerpos, p. ej., anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada está constituida normalmente por una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está constituida normalmente por una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL). A pesar de ello, el término «anticuerpo» también incluye otros tipos de anticuerpos tales como anticuerpos de dominio único, anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos constituidos únicamente por una o más, en particular dos, cadenas pesadas, y nanocuerpos, es decir, anticuerpos constituidos únicamente por un solo dominio monomérico variable. Los nanocuerpos también se pueden conectar para formar estructuras multivalentes. Según se ha expuesto anteriormente, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés también puede codificar una o más subunidades o dominios de un anticuerpo, p. ej., una cadena pesada o ligera o un fragmento funcional o derivado de este, como polipéptido de interés. Dichas subunidades o dominios se pueden expresar tanto a partir del mismo casete de expresión como de casetes de expresión diferentes.

- 45 Un «fragmento funcional o derivado» de un anticuerpo se refiere en particular a un polipéptido que deriva de un anticuerpo y que es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular al mismo epítipo que el anticuerpo. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser ejecutada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o derivados de este. Los ejemplos de fragmentos o derivados de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes constituidos por la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas ligera y pesada; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd constituidos por la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv constituidos por la región variable de la cadena ligera y cadena pesada de un único brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv constituidos por una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ constituidos por dos fragmentos Fv unidos entre sí covalentemente; (vii) un dominio variable de la cadena pesada; y (viii) multicuerpos constituidos por una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera unidas entre sí covalentemente de manera que la asociación de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueda producir únicamente de forma intermolecular y no intramolecular.

- 60 De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés que es expresado por la célula de vertebrado alterada es propenso a experimentar *clipping* por acción de proteasas. De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés comprende al menos un sitio de *clipping* que es reconocido por la matriptasa. Se ha identificado que varios polipéptidos, seleccionados del grupo constituido por glicoproteínas, anticuerpos, proteínas que no son IgG, fragmentos Fab, complejos proteicos, peptidasas, péptidos señal, proteínas de fusión-Fc, nanocuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, glicopolipéptidos víricos, factores sanguíneos y enzimas, son propensos a experimentar *clipping*. Muchos de estos polipéptidos contienen más de un sitio de *clipping* y son particularmente

sensibles al *clipping*. El hecho de expresar un polipéptido que es propenso a experimentar *clipping* como polipéptido de interés en una célula de vertebrado alterada de acuerdo con la presente divulgación resulta favorable ya que el *clipping* del polipéptido secretado de interés en el medio de cultivo celular se reduce significativamente o incluso se elimina según demuestran los ejemplos.

La célula de vertebrado puede comprender o no un polinucleótido endógeno correspondiente, que es respectivamente idéntico, al polinucleótido que codifica el polipéptido de interés. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado no comprende ningún gen endógeno correspondiente al polipéptido de interés.

De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés no es o no comprende matriptasa. De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés no es o no comprende HAI-1.

El vector de expresión o la combinación de vectores de expresión que están comprendidos en la célula de vertebrado pueden comprender adicionalmente otros elementos del vector. P. ej., pueden comprender al menos un polinucleótido adicional que codifica un producto de interés adicional. Según se ha explicado anteriormente y según resulta evidente a partir de los ejemplos descritos anteriormente de polipéptidos que se pueden expresar de acuerdo con las doctrinas de la presente, el polipéptido final que ha de ser producido y secretado por la célula hospedadora también puede ser una proteína que esté constituida por varias subunidades o dominios individuales. Un ejemplo de una proteína respectiva es una molécula de inmunoglobulina, en particular un anticuerpo que comprende, p. ej., cadenas ligeras y pesadas. Existen varias opciones para producir una proteína respectiva que esté constituida por diferentes subunidades o dominios individuales y en la técnica se conocen diseños de vectores adecuados. De acuerdo con una realización, se expresan dos o más subunidades o dominios de dicha proteína a partir de un casete de expresión. En esta realización, se obtiene un transcrito largo a partir del casete de expresión respectivo que comprende las regiones codificantes de las subunidades o dominios individuales de la proteína. De acuerdo con una realización, al menos un elemento IRES (siglas en inglés referentes al sitio de entrada interna de ribosomas) está localizado funcionalmente entre las regiones codificantes de las subunidades o dominios individuales y cada región codificante va precedida por una secuencia líder secretora. De este modo, se garantiza que se obtengan productos de traducción por separado a partir de dicho transcrito y que la proteína final se pueda agrupar y secretar correctamente. En la técnica anterior existe constancia de las tecnologías respectivas y, por lo tanto, no requieren ninguna descripción detallada en la presente. Para algunas realizaciones tales como la expresión de anticuerpos, se prefiere incluso expresar las subunidades o dominios individuales a partir de diferentes casetes de expresión. De acuerdo con una realización, el casete de expresión utilizado para expresar el producto de interés es un casete de expresión monocistrónico. Todos los casetes de expresión comprendidos en el vector de expresión o combinación de vectores de expresión pueden ser monocistrónicos. Por consiguiente, de acuerdo con una realización, cada casete de expresión diseñado para expresar un producto de interés comprende un polinucleótido que codifica una subunidad o dominio de la proteína que se ha de expresar como polipéptido de interés. P. ej., en el caso de anticuerpos, un casete de expresión puede codificar la cadena ligera del anticuerpo y otro casete de expresión puede codificar la cadena pesada del anticuerpo. Tras la expresión de las subunidades o dominios individuales a partir de los casetes de expresión individuales, la proteína final tal como un anticuerpo se agrupa a partir de dichas subunidades o dominios y es secretada por la célula hospedadora. Esta realización es particularmente adecuada para expresar moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos.

Según se ha descrito anteriormente, el o los polinucleótidos que codifican el polipéptido de interés y los polinucleótidos que codifican el o los marcadores seleccionables y/o el o los polipéptidos indicadores están preferentemente comprendidos en casetes de expresión. Varias realizaciones son adecuadas. Por ejemplo, cada uno de dicho(s) polinucleótido(s) puede(n) estar comprendido(s) en un casete de expresión por separado. También se hace referencia a esto como una configuración monocistrónica. A pesar de ello, también se encuentra dentro del alcance de la presente invención el hecho de que al menos dos de los polinucleótidos respectivos estén comprendidos en un casete de expresión. De acuerdo con una realización, al menos un elemento de sitio de entrada interno de ribosomas (IRES) está funcionalmente localizado entre los polinucleótidos que se expresan a partir del mismo casete de expresión. Las tecnologías de expresión respectivas basadas en IRES y otros sistemas bi- y policistrónicos son muy conocidos y, por lo tanto, no requieren ninguna descripción adicional en la presente.

B. Método para producir una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para producir una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto, comprendiendo dicho método alterar una célula de vertebrado para debilitar el efecto de la matriptasa e introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en dicha célula, donde dicho polipéptido de interés es secretado a continuación por la célula de vertebrado. El método para producir una célula de vertebrado de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 10.

Las realizaciones adecuadas y preferidas para debilitar la función de la proteasa endógena matriptasa se han descrito anteriormente conjuntamente con las células de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto y se hace referencia a la divulgación anterior, que también se aplica aquí. Por consiguiente, el método puede comprender debilitar el efecto de la matriptasa según se ha descrito anteriormente conjuntamente con las células de vertebrado alteradas de acuerdo con el primer aspecto. En lo sucesivo se describirán brevemente de nuevo realizaciones no limitantes.

De acuerdo con una realización, el método comprende reducir o eliminar la expresión funcional del gen de la matriptasa, con lo que se debilita de este modo el efecto de la matriptasa. De acuerdo con las reivindicaciones, el efecto de la matriptasa se debilita debido a que la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en dicha célula de vertebrado mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores. Según se ha descrito anteriormente, este debilitamiento tiene el efecto de que hay unas cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional presentes en forma activa en el medio de cultivo celular que contiene las células alteradas, p. ej., debido a que unas cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional son presentadas sobre la superficie celular y/o son liberadas, p. ej., desprendidas, por la célula alterada. Por consiguiente, hay una cantidad de matriptasa menor o nula presente en forma proteolíticamente activa en el medio de cultivo celular en el que se secreta el polipéptido recombinante de interés. Debido a que la presente divulgación muestra que la matriptasa es una proteasa clave responsable del *clipping* del polipéptido secretado de interés, esta alteración de la célula reduce de forma favorable o incluso elimina el *clipping* del polipéptido de interés. Los modos adecuados para reducir o eliminar la expresión funcional de la matriptasa se han descrito anteriormente conjuntamente con las células de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto y se hace referencia a ello. De acuerdo con una realización, el genoma de la célula de vertebrado se altera para reducir o eliminar la expresión funcional del gen de la matriptasa. Por ejemplo, se puede introducir una supresión génica en el gen de la matriptasa. De acuerdo con una realización, tal supresión génica se introduce en todas las copias del gen de la matriptasa. De acuerdo con una realización, el gen de la matriptasa se elimina o suprime mediante la introducción de una o más mutaciones tales como, p. ej., mutaciones de desplazamiento del marco y/o del codón de parada. Se pueden alterar correspondientemente todas las copias del gen de la matriptasa en el genoma.

De acuerdo con una realización, dicha una o más mutaciones están comprendidas en una región codificante del gen de la matriptasa y dan como resultado un producto de expresión no funcional o menos funcional. Los detalles se han descrito anteriormente conjuntamente con las células de vertebrado alteradas de acuerdo con el primer aspecto y se hace referencia a la divulgación respectiva que también se aplica aquí. De acuerdo con una realización, se introducen una o más mutaciones en una región del gen de la matriptasa que codifica una secuencia de aminoácidos presente en una o más de una variante de corte y empalme catalíticamente activa de la matriptasa. Se han encontrado varios de los exones de la matriptasa en la mayoría o incluso todas las variantes de corte y empalme catalíticamente activas identificadas. Según se ha descrito anteriormente y se demuestra en los ejemplos, la secuencia de polinucleótido del gen de la matriptasa que codifica el exón 2 de la matriptasa es una diana adecuada para introducir una o más mutaciones tales como, p. ej., mutaciones de desplazamiento del marco, debido a que el exón 2 se expresa en la mayoría de variantes de corte y empalme de la matriptasa y una mutación respectiva proporciona un producto de expresión no funcional o menos funcional. Además, los exones cercanos al extremo N de la matriptasa tales como el exón 2 son dianas favorables para introducir una o más mutaciones de desplazamiento del marco que conduzcan a la expresión de una proteína truncada no funcional o menos funcional. Además, se pueden introducir una o más mutaciones en el dominio catalítico con el fin de alterar la función de la matriptasa.

De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado es una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado es una célula de roedor. Preferentemente, la célula de roedor es una célula de hámster tal como una célula CHO. De acuerdo con una realización, se utiliza una célula CHO, preferentemente derivada de la línea celular K1, con el fin de proporcionar una línea celular de vertebrado alterada donde el efecto de la proteasa endógena matriptasa esté debilitado, preferentemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa.

Si el genoma de la célula hospedadora se altera para conseguir el debilitamiento, se prefiere en primer lugar alterar la célula de vertebrado para debilitar básicamente de forma permanente el efecto y, por lo tanto, la función de la proteasa endógena matriptasa y a continuación introducir el polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés. En el caso de que la alteración no sea permanente como es, p. ej., el caso cuando se silencia de forma transitoria el gen de la matriptasa, p. ej., mediante iARN, se puede en primer lugar introducir el polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés y a continuación alterar la célula de vertebrado para debilitar la función de la proteasa endógena matriptasa, p. ej., mediante un silenciamiento génico postranscripcional. Los métodos adecuados se han descrito anteriormente y son conocidos por el experto. Según se ha descrito anteriormente, de acuerdo con una realización preferida, el genoma de la célula de vertebrado se altera para conseguir el debilitamiento. El método de acuerdo con el séptimo aspecto se puede utilizar con el fin de identificar y seleccionar una célula hospedadora en la que el efecto de la matriptasa esté debilitado.

De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el segundo aspecto comprende además introducir en una célula de vertebrado que está alterada de manera que la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina, al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y preferentemente al menos un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable. De acuerdo con una realización, el polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica un marcador seleccionable están localizados en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión diferentes. Las realizaciones adecuadas y preferidas se han descrito anteriormente y se hace referencia a la divulgación respectiva, que también se aplica aquí. La introducción se puede conseguir mediante transfección, donde se prefiere una transfección estable. Una célula hospedadora de vertebrado que expresa con éxito el polipéptido de interés se puede seleccionar utilizando, p. ej., el método de acuerdo con el quinto aspecto. Se hace referencia a la divulgación posterior.

C. Métodos para producir de forma recombinante un polipéptido de interés

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende utilizar una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto como célula hospedadora para la expresión recombinante del polipéptido de interés. El método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 11. Según se ha descrito anteriormente, debido al menor nivel de degradación proteolítica del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular que se consigue cuando se utilizan estas células de vertebrado novedosas para la expresión recombinante, estas células de vertebrado novedosas, las cuales son preferentemente células de mamífero, son particularmente adecuadas como células hospedadoras para producir de forma recombinante un polipéptido de interés. Los ejemplos adecuados y preferidos de la célula hospedadora de vertebrado, que se altera para debilitar el efecto de la matriptasa, preferentemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa, así como también ejemplos adecuados y preferidos del polipéptido de interés se han descrito en detalle anteriormente y se hace referencia a la divulgación anterior que también se aplica aquí.

De acuerdo con una realización, el método comprende introducir en una célula hospedadora de vertebrado que se altera de modo que el efecto de la proteasa endógena matriptasa se debilita al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y seleccionar una célula hospedadora de vertebrado que exprese de forma recombinante el polipéptido de interés. La introducción se puede conseguir mediante transfección, según existe amplia constancia y también se describe en la presente. La selección se puede producir utilizando el método de acuerdo con el quinto aspecto de la presente divulgación. Preferentemente, se seleccionan células hospedadoras en las que el polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés se integra de forma estable en el genoma de la célula hospedadora.

De acuerdo con una realización, el método comprende

- (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto en unas condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés;
- (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.

Por lo tanto, como realización preferida del método de acuerdo con el tercer aspecto, se proporciona un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

- (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto en unas condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular;
- (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.

Dichas células hospedadoras se pueden cultivar en unas condiciones exentas de suero. El polipéptido se expresa y secreta en el medio de cultivo y se puede obtener a partir de este. A los efectos de la secreción, se proporciona un péptido líder adecuado de modo que se secrete el polipéptido de interés. Los diseños de los casetes de expresión y las secuencias líder para conseguir la secreción son muy conocidos en la técnica anterior y, por consiguiente, no es necesario que se describan en la presente.

Según se ha descrito anteriormente, cuando se utilizan las células de vertebrado alteradas de acuerdo con el primer aspecto para producir células hospedadoras, unas cantidades nulas o reducidas de matriptasa funcional son eficaces en el medio de cultivo celular que contiene dichas células, con lo que la degradación proteolítica del polipéptido recombinante de interés que se secreta en el medio de cultivo celular se reduce significativamente o incluso se evita completamente. Así, debido a que se descubrió sorprendentemente que entre los cientos de diferentes proteasas expresadas por las células de vertebrado, la matriptasa es la proteasa clave que provoca el *clipping* de los polipéptidos expresados de forma recombinante en el medio de cultivo celular. Por consiguiente, cuando se utilizan las células hospedadoras de vertebrado novedosas de acuerdo con la presente divulgación como células hospedadoras de producción, no es necesario aplicar medidas adicionales para reducir o evitar la degradación proteolítica y, por lo tanto, el *clipping* del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular. Por consiguiente, de acuerdo con una realización, no se añade ningún inhibidor de proteasas al medio de cultivo celular. De acuerdo con una realización, la temperatura de cultivo no se reduce para disminuir la actividad proteolítica en el medio de cultivo celular. La presente divulgación engloba métodos en los que el polipéptido de interés se modifica de nuevo genéticamente para eliminar uno o más motivos propensos a experimentar *clipping* por acción de las proteasas. A pesar de ello, de acuerdo con una realización, el polipéptido de interés no se modifica de nuevo genéticamente con el fin de eliminar uno o más motivos de aminoácidos que son propensos a experimentar *clipping* por acción de la matriptasa con el fin de reducir o prevenir el *clipping*. De acuerdo con esta realización, se puede llevar a cabo una modificación genética respectiva de nuevo si se desea con el fin de eliminar uno o más motivos de aminoácidos que son propensos a experimentar *clipping* por acción de una proteasa diferente de la matriptasa. A pesar de ello, de acuerdo con una realización, el polipéptido de interés no se modifica de nuevo genéticamente en absoluto con el fin de eliminar uno o más motivos de aminoácidos que son propensos a experimentar *clipping* por acción de una proteasa con el fin de reducir o prevenir el *clipping*. Según muestran los ejemplos, el *clipping* se reduce de forma eficaz o incluso se elimina completamente cuando se utilizan las células alteradas descritas en la presente de modo que una estrategia de modificación genética respectiva de nuevo se vuelve básicamente obsoleta.

Los ejemplos de polipéptidos de interés que se pueden producir con la célula de vertebrado alterada se han descrito anteriormente conjuntamente con el primer aspecto de la invención y se hace referencia a la divulgación respectiva, que también se aplica aquí. De acuerdo con una realización, el método de producción se utiliza para producir un polipéptido de interés que presenta una o más de las siguientes características:

- a) es un polipéptido terapéutico o de diagnóstico;
- b) es sensible al *clipping* por acción de las proteasas;
- c) comprende al menos un sitio de *clipping* para la matriptasa;
- d) es un glicopolipéptido;
- e) se selecciona del grupo constituido por glicoproteínas, anticuerpos, proteínas que no son IgG, fragmentos Fab, complejos proteicos, peptidasas, péptidos señal, proteínas de fusión-Fc, nanocuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, factores sanguíneos y enzimas;
- f) no es o no comprende matriptasa; y/o
- f) no es o no comprende HAI-1.

El polipéptido de interés que se produce se aísla del medio de cultivo celular y opcionalmente se procesa de forma adicional utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar a partir del medio de nutrientes mediante procedimientos convencionales que incluyen, sin carácter limitante, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción o precipitación. Se pueden llevar a cabo pasos de procesamiento adicionales tales como pasos de purificación utilizando varios procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, sin carácter limitante, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de proteína A o proteína G y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato de amonio) o extracción. Además, el polipéptido aislado y purificado de interés se puede procesar adicionalmente tal como, p. ej., se puede modificar y/o formular en una composición, p. ej., una composición farmacéutica.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la divulgación, se describe un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

- (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado que comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés en unas condiciones que permiten la expresión y secreción del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular, donde el medio de cultivo celular comprende un inhibidor de proteasas que es selectivo para la matriptasa;
- (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.

El método de acuerdo con el cuarto aspecto de la divulgación también se basa en el importante descubrimiento descrito en la presente de que la matriptasa es la proteasa clave responsable de la degradación proteolítica del polipéptido recombinante secretado de interés en el medio de cultivo celular. En el método de acuerdo con el cuarto aspecto, la degradación proteolítica del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular, a la cual también se hace referencia como «*clipping*» (remítase más arriba) se evita al añadir un inhibidor de proteasas que es selectivo para la matriptasa al medio de cultivo celular. También se hace referencia en la presente a un inhibidor de proteasas que es selectivo para la matriptasa como inhibidor selectivo de la matriptasa. Obviamente, también se puede añadir más de un inhibidor selectivo de la matriptasa. Según se demuestra en el Ejemplo 4, el hecho de añadir un inhibidor selectivo de la matriptasa al medio de cultivo celular permite reducir de forma significativa o incluso eliminar el *clipping* del polipéptido de interés incluso cuando se utilizan células de vertebrado que expresan normalmente la matriptasa. Por lo tanto, esta realización permite utilizar células de vertebrado inalteradas en las que, por consiguiente, el efecto de la matriptasa no está debilitado ya que el debilitamiento se consigue en el medio de cultivo celular.

El inhibidor selectivo de la matriptasa presente en el medio de cultivo celular conduce a una reducción o eliminación de la actividad proteolítica de la matriptasa en el medio de cultivo celular. El inhibidor de la matriptasa puede ser, p. ej., un inhibidor competitivo que compite con el sustrato por el sitio activo de la matriptasa o un inhibidor alostérico que modifica la estructura de la matriptasa para reducir su actividad. Se considera que un inhibidor de la matriptasa es selectivo si su actividad inhibitoria frente a la matriptasa es superior a su actividad inhibitoria frente a otras serín proteasas, en particular otras serín proteasas de transmembrana de tipo II.

El inhibidor selectivo de la matriptasa puede ser de cualquier tipo siempre que no presente efectos perjudiciales en la célula hospedadora que se utiliza para producir el polipéptido recombinante de interés. El inhibidor selectivo de la matriptasa se puede seleccionar entre i) inhibidores biológicos de la matriptasa que incluyen, sin carácter limitante, inhibidores selectivos de la matriptasa basados en anticuerpos o derivados de anticuerpos, péptidos o proteínas y ii) inhibidores químicos de la matriptasa tales como moléculas de bajo peso molecular.

De acuerdo con una realización descrita, el inhibidor selectivo de la matriptasa es al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 250 veces más selectivo y, por lo tanto, específico para la matriptasa que para otras proteasas. Sin embargo, la selectividad también puede ser sustancialmente mayor tal como, p. ej., al menos 500 veces, al menos 5000 veces, al menos 10 000 veces, al menos

50 000 veces, al menos 500 000 veces y al menos 5 000 000 veces. Los intervalos incluyen, sin carácter limitante, de 5 veces a 10 000 000 veces, de 10 veces a 5 000 000 veces, de 25 veces a 1 000 000 veces, de 50 veces a 5 000 000 veces. Se puede conseguir una selectividad mayor de, p. ej., al menos 5000 veces o al menos 10 000 veces y superior, p. ej., con inhibidores biológicos selectivos de la matriptasa tales como, p. ej., fragmentos Fab o anticuerpos específicos para la matriptasa.

La selectividad se puede determinar, p. ej., basándose en el valor de k_i , el cual es inferior para un inhibidor selectivo de la matriptasa que para otras proteasas evaluadas. De acuerdo con una realización, el inhibidor de la matriptasa inhibe la matriptasa de forma selectiva con un valor de k_i de 200 nM o inferior, 150 nM o inferior, 100 nM o inferior, 50 nM o inferior, 25 nM o inferior, 20 nM o inferior, 15 nM o inferior, 10 nM o inferior, 7.5 nM o inferior, 5 nM o inferior, 2.5 nM o inferior, 1 nM o inferior o 0.75 nM o inferior.

Según se ha mencionado anteriormente, en la técnica anterior se describen varios inhibidores selectivos de la matriptasa. P. ej., Faraday *et al.* describen diferentes inhibidores selectivos de la matriptasa basados en anticuerpos, a saber, un fragmento Fab (Farady *et al.*, 2008 *J.Mol.Biol.* (2008) 380, 351-360) y dos inhibidores de tipo anticuerpo scFv (*J Mol Biol.* 15 de junio de 2007; 369 (4): 1041-1051). Se describió que los inhibidores de tipo anticuerpo que eran fragmentos variables de cadena única (scFv) E2 y S4, con valores de K_i de 12 pM y 160 pM, eran particularmente selectivos. Un inhibidor selectivo de la matriptasa basado en un anticuerpo puede ser activo contra la matriptasa derivada de diferentes especies. Según demuestra el Ejemplo 4, p. ej., el fragmento Fab contra la matriptasa humana también fue eficaz contra la matriptasa derivada de ratón y hámster. A pesar de ello, también se pueden generar inhibidores selectivos de la matriptasa basados en un anticuerpo respectivos contra la matriptasa específica expresada por la célula hospedadora de interés con el fin de garantizar un efecto inhibidor máximo y hacer posible el uso de concentraciones más bajas del inhibidor selectivo de la matriptasa en el medio de cultivo celular. Es más, se han descrito anticuerpos específicos para el sitio catalítico de la matriptasa (US 2006/171884 A1). Los inhibidores selectivos de la matriptasa que son moléculas peptidomiméticas tales como las moléculas de tipo 3-amidinofenilalanina CJ-730 y CJ-697 presentan valores de k_i para la matriptasa de 46 nM y 26 nM, respectivamente (se describen en Förbs *et al. International Journal of Oncology* 27: 1061-1070 2005). Según se describe en el artículo de Förbs, la adición de estos compuestos al cultivo celular de líneas de células tumorales reduce la actividad de la matriptasa de forma significativa sin que se vea afectada la proliferación de las células. También se describen inhibidores selectivos de la matriptasa en Steinmetzer *et al.*, *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4116-4126 y Goswami *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013 4 (12) págs. 1152-1157. Además, se han identificado variantes estructurales de la eglina c, una proteína monomérica de bajo peso molecular que es un inhibidor de serín proteasas, como inhibidores respectivos de la matriptasa (Desilets *et al. FEBS Letters* 580 (2006) 2227-2232). En la presente, en un ensayo de cribado se crearon diferentes variantes estructurales de la eglina c y se evaluaron para determinar su especificidad para la matriptasa. El intercambio de un único aminoácido (L45R) en el bucle del sitio reactivo hace que la eglina c sea específica para la matriptasa ($k_i = 18$ nM). Por lo tanto, se conocen muchos inhibidores selectivos de la matriptasa que se pueden utilizar a los efectos de la presente divulgación con el fin de inhibir la matriptasa de forma selectiva en el medio de cultivo celular, con lo que se reduce o evita de este modo el *clipping* del polipéptido de interés que es expresado de forma recombinante y secretado en el medio de cultivo celular por la célula hospedadora de vertebrado.

Para debilitar el efecto de la matriptasa en el medio de cultivo celular, se puede añadir el inhibidor selectivo de la matriptasa al medio de cultivo celular en el que se cultivan las células hospedadoras de expresión. La concentración de un inhibidor selectivo de la matriptasa individual requerida para conseguir una inhibición suficiente de la matriptasa en el medio de cultivo celular de modo que se reduzca la degradación proteolítica del polipéptido de interés se puede determinar basándose en experimentos rutinarios. El inhibidor selectivo de la matriptasa se puede añadir al medio de cultivo celular antes o después de la adición de las células hospedadoras. De acuerdo con una realización descrita, el inhibidor selectivo de la matriptasa se añade al empezar el cultivo celular. De acuerdo con una realización descrita, el inhibidor selectivo de la matriptasa se añade en un momento en el tiempo en el que las células hospedadoras empiezan a secretar el polipéptido de interés. El inhibidor selectivo de la matriptasa también se puede añadir de forma continua. Por ejemplo, en un cultivo discontinuo alimentado, el inhibidor selectivo de la matriptasa se puede incluir en la alimentación.

Los detalles referentes al polipéptido de interés, el aislamiento del polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular, así como también el procesamiento posterior se han descrito anteriormente, p. ej., conjuntamente con el método de acuerdo con el tercer aspecto y se hace referencia a la divulgación anterior que también se aplica aquí.

Teniendo en cuenta el volumen de cultivo celular requerido para una producción a gran escala, se deben añadir grandes cantidades del (uno o más) inhibidor selectivo de la matriptasa al medio de cultivo celular incluso si se utiliza un inhibidor de la matriptasa con una selectividad elevada con el fin de reducir o evitar de forma eficaz el *clipping* del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular. Esto puede resultar costoso desde un punto de vista económico. Además, para muchos polipéptidos de interés tales como los productos biofarmacéuticos, el inhibidor selectivo de la matriptasa añadido se debe eliminar durante el aislamiento y la purificación posteriores del polipéptido de interés para evitar contaminaciones del polipéptido final de interés con el inhibidor de la matriptasa. Tal paso de eliminación puede comprender cualquier paso de purificación conocido tal como cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño o fase inversa. El método idóneo para la eliminación depende del tipo de inhibidor selectivo de la matriptasa utilizado. Debido a que tales pasos pueden resultar laboriosos y pueden incrementar los costes, se prefiere el método

de acuerdo con el tercer aspecto que implica el uso de células de vertebrado alteradas de acuerdo con el primer aspecto.

D. Método de selección

5 De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende

(a) proporcionar células de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto de la invención como células hospedadoras; y

(b) seleccionar una o más células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés.

10 El método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un polipéptido de interés de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 12.

Las células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto, incluidas las realizaciones adecuadas y preferidas, así como también sus ventajas se han descrito en detalle anteriormente y se hace referencia a la divulgación respectiva que también se aplica aquí. Preferentemente, la célula de vertebrado es una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, la etapa (a) del método de selección de acuerdo con el quinto aspecto comprende transfectar células de vertebrado, las cuales están alteradas para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa, con al menos un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés, con el fin de proporcionar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto. De acuerdo con una realización, las células no comprenden ningún polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés antes de la transfección del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés que ha de ser expresado y secretado por la célula hospedadora. Según se ha descrito, se utilizan preferentemente células de mamífero como células hospedadoras de vertebrado. El polinucleótido que codifica el producto de interés puede estar comprendido en un vector de expresión que se transfecta a continuación en la célula de vertebrado.

De acuerdo con una realización, dichas células hospedadoras proporcionadas en la etapa (a) comprenden adicionalmente al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable y la etapa (b) comprende cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en condiciones selectivas para el marcador seleccionable. La etapa de selección (b) puede ser un proceso de selección de múltiples pasos que comprende varios pasos de selección con el fin de seleccionar e identificar de este modo células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la etapa de selección (b) puede comprender varios pasos de selección. Por ejemplo, la etapa (b) puede incluir uno o más pasos de selección para seleccionar células que se hayan transfectado con éxito, así como también uno o más pasos de selección posteriores para seleccionar células de expresión elevada a partir de la agrupación de células transfectadas con éxito. La estrategia de selección adecuada depende del diseño del vector de expresión que se utiliza para introducir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés y en particular depende del o los marcadores de selección y/o del o los indicadores utilizados. En lo sucesivo se describirán realizaciones no limitantes.

Según se ha descrito anteriormente, las células hospedadoras de vertebrado pueden comprender al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable. El polinucleótido que codifica el marcador seleccionable se puede introducir en la célula hospedadora junto con el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés utilizando ya sea el mismo vector de expresión o un vector de expresión cotransfectado diferente. A continuación, la etapa (b) comprende cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en unas condiciones que proporcionen una presión de selección para las células hospedadoras con el fin de seleccionar células hospedadoras transfectadas con éxito, p. ej., utilizando un medio de selección adecuado. Un «medio de selección», tal como se utiliza en la presente, se refiere en particular a un medio de cultivo celular útil para la selección de células hospedadoras que expresan el marcador seleccionable. Puede incluir, p. ej., un agente de selección tal como un agente tóxico que hace posible la selección de células hospedadoras transfectadas con éxito. Como alternativa, en el medio de selección puede haber un compuesto esencial ausente o se puede reducir su concentración. De acuerdo con una realización, las células hospedadoras que no se transfectaron con éxito y, por lo tanto, no expresan el o los marcadores de selección o donde la expresión es baja no pueden proliferar o mueren en las condiciones de cultivo selectivas. Por el contrario, las células hospedadoras que se transfectaron con éxito con el o los vectores de expresión y las cuales expresan el o los marcadores de selección (y por consiguiente el polipéptido de interés cointroducido) con un rendimiento suficiente son resistentes a la presión de selección o se ven menos afectadas por esta y, por consiguiente, pueden proliferar, con lo que sobrepasan de este modo a las células hospedadoras que no han sido transfectadas con éxito o en las que el sitio de integración en el genoma de la célula no es favorable. El marcador seleccionable se puede seleccionar del grupo constituido por marcadores de resistencia a antibióticos, marcadores de resistencia a fármacos y marcadores metabólicos. Los ejemplos adecuados de marcadores seleccionables y principios de selección se han descrito anteriormente conjuntamente con el primer aspecto y las condiciones de selección adecuadas para los marcadores seleccionables individuales también son muy conocidas por el experto. Según se ha descrito anteriormente, como alternativa o de forma adicional, se puede llevar a cabo una selección basada en un polipéptido indicador.

De acuerdo con una realización, las células de vertebrado proporcionadas en la etapa (a) son células de mamífero. De acuerdo con una realización, las células de mamífero son células de roedor, preferentemente células de hámster tales como células CHO. Las realizaciones preferidas y adecuadas se han descrito anteriormente conjuntamente con

el primer aspecto y se hace referencia a la descripción anterior. Del mismo modo, anteriormente se han descrito en detalle otras realizaciones preferidas, en particular respecto a las células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto, el vector de expresión o la combinación de vectores de expresión. Se hace referencia a la divulgación anterior.

Las células obtenidas como resultado del método de selección de acuerdo con el quinto aspecto se pueden aislar y cultivar como células individuales. Sin embargo, es posible utilizar una población enriquecida de células hospedadoras genéticamente diferentes, es decir, una agrupación celular, en el proceso posterior. Las células hospedadoras obtenidas también se pueden someter a análisis cuantitativos o cualitativos adicionales, o se pueden utilizar, p. ej., en el desarrollo de una línea celular clonal para la producción de proteínas. Una línea celular clonal se puede establecer a partir de una célula hospedadora seleccionada que exprese de forma estable el polipéptido de interés con rendimiento elevado.

De acuerdo con una realización, las células seleccionadas se cultivan para proporcionar clones celulares, en particular en forma de cultivos celulares clonales. Un cultivo celular clonal es un cultivo celular derivado de una célula ancestral única. En un cultivo celular clonal, todas las células son clones unas de las otras. Preferentemente, todas las células en un cultivo celular contienen la misma o sustancialmente la misma información genética. En ciertas realizaciones, se determina la cantidad o concentración del polipéptido de interés en el cultivo celular para evaluar la productividad. P. ej., se puede cuantificar el título analizando el sobrenadante del cultivo. Además, se puede llevar a cabo un estudio de estabilidad con los clones celulares obtenidos.

E. Uso de células de vertebrado alteradas para la producción recombinante

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona el uso de una célula de vertebrado aislada para la producción recombinante de un polipéptido de interés que se secreta a partir de la célula de vertebrado, donde la célula utilizada se altera para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa. De acuerdo con una realización del sexto aspecto, el efecto de la matriptasa se debilita según se ha descrito en detalle anteriormente conjuntamente con el primer aspecto, preferentemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa según se ha descrito anteriormente en más detalle. La célula de vertebrado es preferentemente una célula de mamífero. El uso de acuerdo con la presente invención se define en la reivindicación 15. El efecto de la matriptasa se debilita debido a que la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en dicha célula de vertebrado mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el efecto de la proteasa endógena matriptasa se debilita según se ha descrito anteriormente conjuntamente con las células de vertebrado alteradas de acuerdo con el primer aspecto. De acuerdo con una realización, un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se introduce en dicha célula. Tras la introducción, se proporciona una célula de vertebrado que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés que se secreta a continuación a partir de la célula de vertebrado en el medio de cultivo celular. De este modo, el uso puede comprender la introducción de un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés en dicha célula de vertebrado, donde dicho polipéptido de interés es secretado por la célula de vertebrado. Del mismo modo, los detalles referentes al polipéptido de interés se han descrito en detalle anteriormente y se hace referencia a la divulgación respectiva que también se aplica aquí. Los métodos para introducir un polinucleótido en una célula de vertebrado son conocidos por el experto y también se han descrito de forma breve anteriormente.

De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado no comprende ningún polipéptido heterólogo que codifica un polipéptido de interés antes de introducir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés que se ha de expresar. De acuerdo con una realización, dicha célula tampoco comprende ningún polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable y/o ningún polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido indicador. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado no comprende ningún polinucleótido heterólogo antes de introducir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés. Una célula de vertebrado «vacía» respectiva que se altera para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa se puede utilizar, p. ej., como línea celular de clonación para tecnologías de producción recombinante. Una línea celular respectiva se puede transfectar con un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés, p. ej., utilizando un vector de expresión adecuado. Tales células de vertebrado «vacías» que todavía no expresan ni secretan ningún producto recombinante se pueden transfectar de este modo con diferentes vectores de expresión, dependiendo del polipéptido de interés deseado que se supone que se ha de producir de forma recombinante. Por lo tanto, tal línea celular de vertebrado se puede utilizar para diferentes proyectos, es decir, para la producción de diferentes polipéptidos de interés. De acuerdo con una realización, la célula de vertebrado es una célula de vertebrado de acuerdo con el primer aspecto. Los detalles se han descrito anteriormente y se hace referencia a la divulgación anterior.

F. Método para seleccionar células hospedadoras de vertebrado con una función debilitada de la matriptasa

De acuerdo con un séptimo aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para seleccionar una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés, que comprende analizar si la proteasa endógena matriptasa se expresa de forma funcional en la célula de vertebrado y seleccionar una célula de vertebrado en la que el efecto de tal matriptasa endógena esté debilitado para la producción recombinante del polipéptido de interés. El método para seleccionar una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés se define en la reivindicación 14. De acuerdo con la reivindicación 14, el método comprende seleccionar una célula de vertebrado en la cual el efecto de tal matriptasa endógena se debilita mediante la reducción o eliminación de

la expresión funcional del gen de la matriptasa mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores para la producción recombinante del polipéptido de interés. Este proceso de selección permite identificar una célula hospedadora que es capaz de expresar y secretar un polipéptido recombinante de interés, donde se reduce el *clipping* del polipéptido de interés secretado en el medio de cultivo celular. Las células hospedadoras respectivas son particularmente adecuadas para la producción recombinante.

Este método analítico se puede utilizar favorablemente, p. ej., combinado con el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente divulgación con el fin de identificar si se ha producido una célula de vertebrado en la que el efecto del gen de la matriptasa esté debilitado. De acuerdo con una realización preferida, el método comprende analizar si la expresión funcional del gen de la matriptasa se ha reducido o eliminado en dichas células. En lo sucesivo se describen realizaciones no limitantes. Qué método analítico es adecuado también depende de cómo se alteran las células para conseguir una reducción o eliminación de la expresión funcional de la matriptasa.

Por ejemplo, cuando se introduce una supresión génica en el gen de la matriptasa con el fin de reducir o eliminar la expresión funcional de la matriptasa, se puede amplificar la sección de ADN correspondiente y secuenciar el ADN amplificado con el fin de confirmar que la supresión génica se haya introducido en el gen de la matriptasa. La introducción de una o más mutaciones se puede detectar, p. ej., mediante secuenciación. Si la expresión funcional de la matriptasa se reduce o elimina mediante la delección completa o parcial de dicho gen, se puede detectar la delección a nivel de ADN, p. ej., utilizando métodos de detección basados en la amplificación adecuados para detectar la delección (tales métodos son conocidos por el experto).

Además, el método se puede utilizar con el fin de seleccionar una línea celular adecuada en la que se reduce o elimina la expresión funcional natural de la matriptasa, p. ej., porque la expresión global se reduce o elimina y/o porque la actividad de la matriptasa expresada se reduce o elimina, p. ej., debido a al menos una mutación. Las células respectivas se pueden identificar utilizando el método de acuerdo con el séptimo aspecto según se describe en la presente. P. ej., la expresión de la matriptasa se puede analizar utilizando técnicas basadas en PCR tales como RT-PCR y/o secuenciación. Como alternativa o de forma adicional, la actividad de la matriptasa se puede analizar utilizando medio acondicionado obtenido a partir de las células que se han de analizar.

De acuerdo con una realización, las células con una cantidad reducida o nula de matriptasa en la superficie celular se seleccionan mediante citometría de flujo. P. ej., se puede utilizar un anticuerpo u otro agente de detección que se une a la matriptasa para marcar las células que expresan la matriptasa. A continuación, las células respectivas se pueden marcar añadiendo un agente marcado que se une al anticuerpo u otro agente de detección, o el anticuerpo u otro agente de detección se puede marcar directamente. De acuerdo con una realización, la marca es una marca fluorescente. De este modo, las células se marcan de acuerdo con su nivel de expresión de la matriptasa, lo cual permite identificar y clasificar a continuación las células que muestran una expresión reducida o nula de la matriptasa, p. ej., mediante una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

De acuerdo con una realización, se analiza el perfil de expresión de las células de vertebrado para determinar si la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina. Por ejemplo, el análisis puede comprender llevar a cabo una PCR de RT (transcripción inversa) cuantitativa o cualitativa con el fin de detectar la presencia, ausencia, cantidad o longitud del ARNm de la matriptasa. De forma adicional o como alternativa al análisis de la expresión de la matriptasa funcional en la célula, el proceso de selección puede comprender un paso para evaluar si existe actividad de matriptasa en el medio acondicionado obtenido a partir de dicha célula. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo experimentos de adición (*spike-in*) según se describe en los ejemplos. Por consiguiente, se puede recolectar el medio de cultivo celular a partir de varias líneas celulares potenciales con el fin de analizar si existe actividad de matriptasa en el medio acondicionado obtenido correspondientemente. P. ej., el medio acondicionado se puede evaluar para determinar su actividad de *clipping* sobre un polipéptido que es propenso a experimentar *clipping*. Utilizando uno o más polipéptidos de los que existe constancia que experimentan *clipping* como patrón para evaluar la actividad de *clipping*, es posible cuantificar o cualificar la actividad de *clipping* de las líneas celulares potenciales unas respecto a otras o respecto a una línea celular estándar.

De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el séptimo aspecto es para seleccionar células de mamífero, en particular células de roedor tales como células de hámster, preferentemente células CHO.

De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el séptimo aspecto comprende seleccionar al menos una célula en la que la función de la matriptasa está debilitada, preferentemente mediante la reducción o eliminación de la expresión funcional del gen de la matriptasa para la expresión recombinante de un polipéptido de interés. Las células que presentan las características respectivas son particularmente adecuadas para la expresión recombinante según muestran los ejemplos. También se han descrito en detalle anteriormente otras realizaciones de células respectivas y se hace referencia a la divulgación respectiva.

Los intervalos numéricos que se describen en la presente incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en la presente no son limitaciones de los varios aspectos o realizaciones de esta divulgación, los cuales se pueden leer haciendo referencia a la memoria descriptiva como un todo. De acuerdo con

una realización, la materia en cuestión descrita en la presente que comprende ciertos elementos también se refiere a la materia en cuestión constituida por los elementos respectivos. En particular, los polinucleótidos descritos en la presente que comprenden ciertas secuencias también pueden estar constituidos por las secuencias respectivas. Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en la presente y la materia en cuestión específica que surge a partir de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención sin limitar de ningún modo el alcance de esta. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente invención.

I. Materiales y métodos

1. Cultivo celular

A menos que se describa lo contrario en la presente, como cultivo celular, se cultivaron células CHO en crecimiento en suspensión derivadas de CHO-K1 en frascos de agitación en un medio estándar y siguiendo un proceso de cultivo celular según se describe, p. ej., en WO2011/134920. Se hicieron pasar las células 2 veces por semana por medio fresco y se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico a lo largo del estudio.

El mismo medio de cultivo que se utilizó para cultivar las células se utilizó como control positivo en los ejemplos.

2. Experimentos de adición (*spike-in*) utilizando medio acondicionado

Se hicieron pasar células que no comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés con una densidad de 2×10^5 células viables/ml por medio estándar (30 ml de cultivo) y se cultivaron a 37 °C. Al alcanzar el máximo de densidad de las células viables (normalmente 7 u 8 días después del pasaje; viabilidad todavía por encima de un 95%) las células se retiraron del medio. En estas condiciones y en este estadio del crecimiento celular, cabe esperar que las cantidades máximas de proteasas secretadas sean activas en el medio de cultivo celular sin que se liberen proteasas intracelulares debido a la apoptosis celular. También cabe esperar la cantidad máxima de polipéptido secretado de interés en estas condiciones si las células se transfectaron para expresar un polipéptido recombinante de interés. Para obtener medio acondicionado, los cultivos celulares se centrifugaron durante 15 min a 90 g (con cuidado suficiente para que las células no liberen proteasas intracelulares debido a estrés por centrifugación). Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió y se hizo pasar a través de un filtro de 0.22 µm para eliminar las partículas celulares remanentes del medio acondicionado.

El polipéptido de interés se añadió al medio acondicionado obtenido de este modo con una concentración final de 0.7µM y se incubó a 37 °C con agitación continua a 500 rpm. El tiempo de incubación para cada polipéptido de interés se determinó previamente tomando alícuotas de forma periódica en la muestra de origen natural y analizándolas utilizando SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western. Para cada polipéptido de interés, se seleccionó un punto de evaluación en el que se observó al menos un 50% de degradación en el medio acondicionado de origen natural. Tras la incubación, todas las muestras del polipéptido de interés se analizaron mediante SDS-PAGE seguida normalmente de un análisis por inmunotransferencia de Western para determinar la cantidad de *clipping*. En los ejemplos, se utilizaron diferentes polipéptidos terapéuticos como polipéptido de interés con el fin de analizar el *clipping*.

3. SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western

Las muestras proteicas se diluyeron en tampón de muestras reductor de marcador para carriles Pierce (DTT 10 mM, cat. 39000) y se hirvieron durante 5 min a 95 °C. Se añadieron aproximadamente 0.1-0.6 µg de proteína/carril en un gel de Bis-Tris al 4-12% premoledado (Invitrogen, cat. NP0322BOX). Tras la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, LC2001) utilizando un sistema de electrotransferencia húmeda de Bio-Rad. El polipéptido de interés se detectó utilizando un anticuerpo específico acoplado a HRP y ECL (Pierce, cat. 32109).

II. Ejemplo 1: *Clipping* de diferentes polipéptidos de interés cuando se silencia la expresión de diferentes proteasas mediante interferencia por ARN (iARN)

En primer lugar, el o los sitios de escisión proteolítica de diferentes proteínas recombinantes que son propensas a experimentar *clipping* se analizaron utilizando diferentes técnicas, que incluyeron análisis por CE-SDS, espectrometría de masas y análisis *in silico* (no se muestran los datos). Este análisis combinado con otros análisis que utilizaron diferentes inhibidores de proteasas reveló que la mayoría de proteínas evaluadas que son propensas a experimentar *clipping* fueron escindidas por proteasas de tipo tripsina, las cuales son una subfamilia de las serín proteasas. El experimento de iARN del ejemplo 1 se configuró para demostrar que la matriptasa es la proteasa clave responsable del *clipping* y que el silenciamiento del gen de la matriptasa reduce de forma significativa el *clipping* mientras que el silenciamiento de otros genes que codifican diferentes proteasas no reduce el *clipping* del polipéptido de interés. Los ARNip se diseñaron contra los siguientes ARNm diana expresados en células CHO: 1. Matriptasa (MT-SP1; también se denomina en la presente St14), 2. C1r (componente del complemento activado C1r; también se denomina Ctra), 3. C1s (componente del complemento C1sB; también se denomina Gm5077), 4. Plat (activador del plasminógeno t) y 5.

Prss35 (proteasa, serina, 35). Estos genes diana codifican proteasas de tipo tripsina que son proteínas o bien secretadas o de transmembrana y, por lo tanto, podrían participar en el *clipping* de las proteínas expresadas de forma recombinante que se secretan en el medio de cultivo celular. Se confirmó por adelantado que estas proteínas son expresadas por las células CHO. La Tabla 2 proporciona un resumen de los genes diana respectivos:

Tabla 2

Símbolo del gen	ID del gen según NCBI (CriGri_1.0 (BioProyecto: PRJNA72741))	ID de la secuencia de referencia de ARNm según NCBI (línea celular CHO)	ID del gen según Ensembl (Mus musculus)
St14	100755225	XM_007644507.1; XM_007644511.1 (XM_003495842.1 fue reemplazado por NCBI como resultado de un procesamiento de anotación del genoma estándar)	ENSMUSG00000031995
C1ra/C1r	100768476	XM_003496099.1	ENSMUSG00000055172
Gm5077 (C1s)	100759777	XM_007613477.1; XM_007646821	ENSMUSG00000079343
Plat	100750775	XM_003503315.1	ENSMUSG00000031538
Prss35	100761989	XM_003495638	ENSMUSG00000033491

Las secuencias sentido y antisentido del ARNip contra la matriptasa y las otras proteasas diana se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3

Gen diana	Secuencia sentido de ARNip	Secuencia antisentido de ARNip
Matriptasa (MT-SP1, también se denomina St14)	GCAAGAUCACUGUUCGCUUTT (SEQ ID NO: 6)	AAGCGAACAGUGAUCUUGCTG (SEQ ID NO: 7)
C1ra (también se denomina C1r)	GAUGUCUUUUCUAAAAUATT (SEQ ID NO: 8)	UAUUUUGAGAAAAGACAUCAT (SEQ ID NO: 9)
Gm5077 (también se denomina C1s)	CGCUGAACGUGUGAUUAUUTT (SEQ ID NO: 10)	AAUAAUCACACGUUCAGCGGT (SEQ ID NO: 11)
Plat (las secuencias de ARNip se diseñaron basándose en información interna de la secuencia del transcrito para hámster chino)	GAAACAAGAUGAAGACAGATT (SEQ ID NO: 12)	UCUGUCUUCUUCUUGUUUCCC (SEQ ID NO: 13)
Prss35	GGCCUUAGACUACGACUAUTT (SEQ ID NO: 14)	AUAGUCGUAGUCUAAGGCCGG (SEQ ID NO: 15)

En lo sucesivo se describe la configuración detallada de los experimentos.

1.1. Transfección de ARNip

Se llevó a cabo la transfección por iARN de células derivadas de CHO-K1 utilizando el reactivo RNAiMAX Lipofectamine® (Life Technology, cat. 13778), siguiendo el «Protocolo de transfección inversa» del manual MAN0001182, escalado para placas de 6 pocillos. Para cada diana de ARNm, se utilizaron las dos concentraciones más eficaces de las moléculas de dúplex de iARN entre 100, 125 y 150 pmol: 125 y 150 pmol para MT-SP1 (St14), 125 y 150 pmol para C1r (C1ra), 100 y 125 pmol para C1s (Gm5077), 125 y 150 pmol para Plat y 100 y 125 pmol para Prss35. Las moléculas de dúplex de iARN de las dos concentraciones seleccionadas se diluyeron en 1ml de Opti-MEM® (Gibco, cat. 31985-062). Como control negativo de iARN (control negativo de ARNip), se utilizó el ARNip de control negativo Silencer® N.º 1 (AM4611) (concentración de 125 pmol). Se añadieron 5µl del reactivo RNAiMAX Lipofectamine® en cada pocillo. Se añadieron 2 ml de una suspensión celular con una concentración de 0.5×10^6 células/ml y las placas se incubaron a 37 °C y con un 10% de CO₂. Tres días después de la transfección, se midió la densidad celular, se extrajo el ARN total de 3×10^6 células viables utilizando el kit *RNeasy Plus Mini* (Qiagen, cat. 74134) y se recolectó el medio acondicionado de cada pocillo. Para controlar el efecto silenciador sobre los genes diana, se determinó la expresión del ARNm mediante RT-PCR de tiempo real.

Tabla 4: Secuencias de los cebadores y la sonda para determinar la expresión de los ARNm de las proteasas

Secuencia del cebador directo para la matriptasa/MT-SP1	CGCTGAGTACCTGTCCTACGA (SEQ ID NO: 16)
Secuencia del cebador inverso para la matriptasa/MT-SP1	ACCGTCCAGTGTTACACATGAAC (SEQ ID NO: 17)

Secuencia del indicador 1 para la matriptasa/MT-SP1	CCAATGACCCATGCCC (SEQ ID NO: 18)
Secuencia del cebador directo para C1ra (C1r)	ACCTGCAAACAAGGCTACCA (SEQ ID NO: 19)
Secuencia del cebador inverso para C1ra (C1r)	TGGCAAACAGCTGTGAAGGA (SEQ ID NO: 20)
Secuencia del indicador 1 para C1ra (C1r)	CAGCACCTGGTTTCC (SEQ ID NO: 21)
Secuencia del cebador directo para Gm5077 (C1s)	TGCGAGGAGCCATATTACTACATG (SEQ ID NO: 22)
Secuencia del cebador inverso para Gm5077 (C1s)	GCAGCGCAGCGATACTC (SEQ ID NO: 23)
Secuencia del indicador 1 para Gm5077 (C1s)	CCGCCGTGTTCTTCAT (SEQ ID NO: 24)
Secuencia del cebador directo para Plat	AGCTGACATGGGAATACTGTGATG (SEQ ID NO: 25)
Secuencia del cebador inverso para Plat	CCTTTAATTCGAAACTGTGGCTGTT (SEQ ID NO: 26)
Secuencia del indicador 1 para Plat	CCGTGCTCCACCTGC (SEQ ID NO: 27)
Secuencia del cebador directo para Prss35	AGGAGAGCACCACACAAAGAC (SEQ ID NO: 28)
Secuencia del cebador inverso para Prss35	ACACGAGTCCACTGGAAGGA (SEQ ID NO: 29)
Secuencia del indicador 1 para Prss35	CCCCGGACCCCTCCTG (SEQ ID NO: 30)

La expresión del gen de la proteasa residual respecto a la expresión del gen de la proteasa en las células de control negativo de ARNip que se fijó como un 100% fue la siguiente: MT-SP1: 125 pmol (18.6%) y 150 pmol (18.2%), C1r (C1ra): 125 pmol (6.3%) y 150 pmol (6.7%), C1s (Gm5077): 100 pmol (11.9%) y 125pmol (14.4%), Plat: 125 pmol (8.3%) y 150 pmol (5.1%) y Prss35: 100 pmol (18.4%) y 125 pmol (14.8%).

1.2. Experimentos de adición (*spike-in*) en medio acondicionado

Para recolectar el medio acondicionado, se centrifugaron 200 µl de medio de cultivo celular procedente de las placas de 6 pocillos (300 g durante 3 min) y el sobrenadante obtenido se utilizó como medio acondicionado para los experimentos de adición según se ha descrito anteriormente en Materiales y métodos. El polipéptido de interés era o bien un anticuerpo IgG monoclonal (mAb) o una proteína de fusión-Fc. Según se ha descrito anteriormente, para cada polipéptido de interés, se seleccionó un punto de evaluación en el que se observó al menos un 50% de degradación en el medio acondicionado de origen natural. Los resultados llevaron a un tiempo de incubación de 3 días para la proteína de fusión-Fc (donde, a pesar de ello, la degradación ya estaba muy por encima del 50%) y a un tiempo de incubación de 7 días para el mAb. Después de la incubación, las muestras del polipéptido de interés en medio acondicionado se analizaron mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western para determinar la cantidad de *clipping* según se ha descrito en Materiales y métodos.

1.3. *Clipping* de la proteína: Resultados de los experimentos de adición (*spike-in*)

La **Fig. 1** muestra la inmunotransferencia de Western de los diferentes polipéptidos de interés analizados tras la incubación según se ha definido anteriormente, en el panel superior se encuentra el mAb y en el panel inferior se encuentra la proteína de fusión-Fc.

El primer carril de la inmunotransferencia de Western en el panel superior muestra el mAb después de la incubación durante 7 días en medio no tratado (químicamente definido) (el mismo medio también se utilizó para cultivar las células), donde correspondientemente no debería producirse *clipping* ya que el medio de cultivo celular no estuvo en contacto con las células y, por lo tanto, no hay proteasas celulares presentes en dicho medio (control positivo (+)). El mAb se muestra como una única banda proteica fuerte (marcada con una flecha) y no se produjo *clipping*.

El segundo carril indica la muestra de mAb después de 7 días de incubación en el medio acondicionado de las células de control negativo ((-)), las cuales se transfectaron con un control negativo de ARNip (sin efecto sobre la expresión génica). Ya que el control negativo de ARNip no ejerce ningún efecto sobre la expresión génica, el medio acondicionado corresponde esencialmente al medio acondicionado que se obtiene después de la incubación de las células inalteradas y, por lo tanto, células que muestran una expresión del gen diana normal y en las que, por consiguiente, las proteasas codificadas se expresan de forma normal. Según se puede observar, además de la banda proteica del mAb intacto, aparece una segunda banda proteica fuerte por debajo que representa el mAb degradado proteolíticamente (marcado con una flecha). Ambas bandas proteicas tienen una intensidad similar, por lo tanto, se puede asumir que aproximadamente un 50% del mAb se degradó proteolíticamente. El mismo resultado -*clipping* significativo- se observa para el mAb incubado en el sobrenadante celular de células en las que se silenció C1r (C1ra),

C1s (Gm5077), Plat y Prss35 mediante iARN (remítase a los carriles 5-12). El hecho de que los genes diana fueran silenciados de forma eficaz se confirmó mediante RT-PCR de tiempo real. Para C1r (C1ra) se observó la reducción de ARNm más pronunciada, con un 93.7% y un 93.3%. La reducción observada para Plat fue de un 91.7% y un 94.9%, para C1s (Gm5077) un 88.1% y un 85.6% y para Prss35 un 81.6% y un 85.2%. Por consiguiente, todos estos genes diana fueron silenciados con éxito en más de un 80%. A pesar de ello, en todos estos casos, la banda proteica del mAb degradado proteolíticamente presentó al menos aproximadamente la misma intensidad de la señal que la banda proteica del mAb intacto. Por lo tanto, como en el control negativo (-), al menos aproximadamente un 50% del mAb se degradó proteolíticamente. Por consiguiente, la reducción de la expresión de estos genes de proteasas no redujo el *clipping* del polipéptido de interés en el medio acondicionado.

Por el contrario, el hecho de reducir la expresión de la matriptasa (MT-SP1) en las células mediante iARN (remítase a los carriles 3 y 4) redujo de forma considerable el *clipping* del mAb. En ambas configuraciones en las que MT-SP1 se suprimió en un 81.4% y un 81.8% en comparación con el control negativo (expresión de MT-SP1 restante de un 18.6% y un 18.2%), la banda proteica del mAb degradado proteolíticamente es mucho más débil que la banda proteica del mAb intacto. Esto demuestra que una cantidad significativamente menor de mAb se degradó proteolíticamente e indica que el hecho de alterar una célula de vertebrado para reducir la expresión funcional del gen de la matriptasa, en la presente mediante iARN, reduce de forma significativa la cantidad de *clipping* de un polipéptido de interés en el medio de cultivo celular acondicionado obtenido a partir de dichas células.

En el panel inferior de la **Fig. 1** se muestran los resultados para la proteína de fusión-Fc como ejemplo adicional de un polipéptido de interés. A diferencia del mAb, la muestra comparativa «(+)» de la proteína de fusión-Fc contiene, además de la banda proteica de la proteína intacta, una segunda banda fuerte correspondiente a la porción Fc sola, que es también el principal producto de *clipping* (ambas bandas se marcan con una flecha). La porción Fc degradada proteolíticamente también se encuentra en el control positivo, porque el material de partida (proteína de fusión-Fc que se produce en las células CHO) contiene, incluso después de la purificación, un porcentaje elevado de la proteína de fusión-Fc degradada proteolíticamente. Durante el proceso de purificación de la proteína-Fc, no se puede eliminar todo el material degradado proteolíticamente. Por consiguiente, la proteína de fusión-Fc que se utiliza en el control positivo como material de partida ya contiene cantidades significantes de la porción Fc degradada proteolíticamente como impureza. En el medio acondicionado de células en las que se silenció la expresión de C1r (C1ra), C1s (Gm5077), Plat o Prss35, la señal para la proteína de fusión-Fc intacta varía desde débil (Plat) hasta muy débil (Prss35). Por consiguiente, el *clipping* de la proteína de fusión-Fc fue muy elevado en estos casos y alcanzó valores de hasta casi un 100% aunque se había suprimido la expresión de estas proteasas. Por consiguiente, el silenciamiento de estos genes de proteasas fue ineficaz a la hora de reducir el *clipping*. Por el contrario, en el medio acondicionado obtenido a partir de células en las que se silenció la expresión de la matriptasa (MT-SP1) (se utilizó solo una concentración de ARNip), se observa aproximadamente la misma intensidad de la proteína intacta que en el control positivo (+). Por consiguiente, el *clipping* se redujo de forma significativa. El carril que representa el control negativo de ARNip (-) también comprende proteína intacta. A pesar de ello, este resultado es una contaminación del carril de control negativo de ARNip por parte del control positivo que se derramó al añadirlo.

En resumen, este experimento de iARN demuestra que el hecho de silenciar la expresión de la matriptasa en las células hospedadoras da como resultado una reducción significativa del *clipping* de diferentes polipéptidos de interés ilustrativos en el medio acondicionado obtenido a partir de dichas células. Por el contrario, el hecho de silenciar la expresión de otras proteasas de tipo tripsina expresadas por las células hospedadoras no ejerce ningún efecto positivo sobre el *clipping*. Por consiguiente, el Ejemplo 1 recalca la importancia del descubrimiento de que la matriptasa es la principal proteasa responsable del *clipping* de polipéptidos expresados de forma recombinante y secretados de interés. Además, se observó que las células en las que se había reducido la expresión de la matriptasa mediante iARN presentaban las mismas características de crecimiento que las células de control negativo de ARNip. Por consiguiente, la reducción de la expresión de la matriptasa no afectó al crecimiento celular.

III. Ejemplo 2: La supresión (KO) del gen de la matriptasa en células CHO conduce a una reducción del *clipping*

A. KO llevada a cabo con tecnología TALEN

Se generaron nueve clones celulares con supresión de la matriptasa (MT-SP1) basados en células derivadas de CHO-K1 utilizando tecnología TALEN (siglas en inglés referentes a nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción). Para la supresión, se fijó como diana el exón 2 de la matriptasa en una región localizada antes de la región codificante del dominio de transmembrana. Se seleccionó el exón 2 porque cubre diferentes variantes de corte y empalme alternativas. El hecho de añadir mutaciones de desplazamiento del marco en el exón 2 tiene la ventaja de que la proteína trunca será corta y estará localizada intracelularmente y, además, será inestable y atóxica para las células.

2.A.1. Diseño/producción y uso de TALEN que son específicas para el exón 2 de la matriptasa

El exón 2 de la matriptasa y los intrones flanqueantes se secuenciaron en la línea celular progenitora derivada de CHO-K1 (remítase a la Fig. 2, SEQ ID NO: 31).

Se diseñaron dos TAL FokI truncados que tenían como diana el exón 2 de la matriptasa. Cada TALEN tiene como diana y se une a 19 nucleótidos ya sea en la hebra de ADN 5' (en la directa) o la 3' (en la inversa), respectivamente. Los dos sitios de unión están separados por los 16 nucleótidos del sitio de corte. Cada TAL que se diseñó se sintetizó y clonó en un vector de entrada Gateway® y se subclonó en un vector de destino pEXP3-DEST_A302. Los métodos y la descripción del producto están disponibles en Life Technology/GeneArt. Se produjeron plásmidos que codificaban la TALEN que reconoce la hebra 5' (izquierda) o la 3' (derecha) (que se subclonó en el vector estructural pEXP3-DEST). pEXP3-DEST contiene un promotor T7 antes de la secuencia codificante de TALEN, lo cual hace posible la transcripción *in vitro* (IVT) de ARNm que codifica TAL-FokI.

2.A.2. Transcripción *in vitro* de los vectores de TALEN

Se produjo ARNm de TALEN mediante la transcripción *in vitro* (IVT) de los vectores de TALEN. Los vectores de TALEN se linearizaron previamente con la enzima de restricción HindIII (Roche, cat. 10656321001) y se purificaron utilizando precipitaciones con isopropanol seguido de etanol al 70%. El ARNm se generó utilizando procedimientos conocidos por el experto en la técnica. El producto de IVT con caperuza se purificó mediante precipitación con NH₄-Ac y el ARNm generado (que contenía una cola de poliA y una caperuza cinco prima) se purificó utilizando el kit *RNeasy Micro* de Qiagen (cat. 74004).

2.A.3. Transfección del ARNm de TALEN

Para la transfección, se utilizaron células CHO-K1 progenitoras en fase de crecimiento exponencial con una viabilidad por encima de un 95%. Se realizó una electroporación (nucleofección) utilizando la tecnología Amaxa™, Nucleofector™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lonza). Las células transfectadas se expandieron el día 4 después de la transfección y las células individuales se separaron el día 7 en placas de 30 x 96 pocillos. La monoclonalidad y la confluencia se controlaron con el formador de imágenes CloneSelect™ (Genetix).

2.A.4. Ensayo de Cel-I y estrategia de cribado

El ensayo de Cel-I se llevó a cabo de acuerdo con el manual de SAFC Biosciences. El ensayo de Cel-I es un ensayo estándar que tiene como objetivo determinar la eficacia de corte. Resumiendo, 3 días después de la transfección, se aisló el ADN genómico a partir de las células y se llevó a cabo una PCR utilizando los siguientes cebadores:

Dir: tttttgccagctcctggtt (SEQ ID NO: 32)

Inv: cccttggctgtcctctga (SEQ ID NO: 33)

El producto de amplificación se desnaturalizó y se dejó que se volviera a naturalizar. A continuación, se añadió nucleasa S y potenciador de la nucleasa S, y se incubaron. Se analizó el producto digerido. Había dos bandas más pequeñas presentes, lo cual indica que hay actividad de TALEN en esa región del genoma y, por consiguiente, está a favor de la presencia de células en las que el gen de la matriptasa está alterado por mutación en las agrupaciones celulares analizadas. A partir de las agrupaciones celulares más positivas (intensidad más fuerte de las dos bandas más pequeñas), se clasificaron células individuales en placas de 96 pocillos.

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) a partir de cada clon en placas de 96 pocillos utilizando los kits de PCR en sangre Extract-N-Amp™ (cat. XNAB2R, Sigma). Los extractos de ADNg se utilizaron para realizar un cribado en busca de los clones mutados, en un ensayo de «PCR de sitio de corte» utilizando el cebador inverso (Inv) que se ha mostrado anteriormente (SEQ ID NO: 33) combinado con un cebador que se une al sitio de corte (al cual se hace referencia como Cebador de corte), el cual tenía la siguiente secuencia:

Cebador de corte: GTGGAGTTTCTGCCTGTGAA (SEQ ID NO: 34)

Si en la región del sitio de corte se produce una mutación debida a las actividades de las TALEN, el Cebador de corte no se unirá, lo cual dará como resultado el hecho de que no se obtenga ningún producto de PCR. Los clones sin producto de PCR se analizaron mediante secuenciación para determinar la mutación introducida. Como alternativa o de forma adicional, se llevó a cabo el ensayo de detección de mutaciones Surveyor (Transgenomics, cat. 706025) utilizando los cebadores Directo (Dir) e Inverso (Inv) que se han mostrado anteriormente. Los clones con mutaciones se transfirieron en frascos de agitación de 125 ml y se secuenciaron. En dichos ensayos de cribado, se identificó el clon Δ7/Δ15. Además, después de la primera ronda de transfección y cribado utilizando el ensayo de Cel-I, se generó un clon con el genotipo wt/Δ4, el cual tenía una mutación de desplazamiento del marco en un alelo de la matriptasa.

Para obtener clones de supresión que comprendieran mutaciones de desplazamiento del marco en ambos alelos, se llevaron a cabo dos rondas de transfección y clonación del ARNm de TALEN. Para obtener clones de supresión con mutaciones de desplazamiento del marco en ambos alelos de MT-SP1, se utilizó el clon con el genotipo wt/Δ4 en una segunda ronda de transfección - clonación del ARNm de TALEN según se ha descrito anteriormente para generar mutaciones de desplazamiento del marco también en el segundo alelo. En total, se generaron nueve clones con supresión de la matriptasa (de KO-1 a KO-9) que contenían mutaciones de desplazamiento del marco en ambos alelos. Los genotipos de los nueve clones se presentan en la Tabla 5. Las secuencias del exón 2 de MT-SP1 que hacen referencia al de origen natural y estas mutaciones se muestran en la Tabla 6. Las secuencias parciales del producto

MT-SP1 resultantes de las mutaciones se muestran en la Tabla 7. Los aminoácidos codificados por el exón 2 se resaltan en negrita.

De acuerdo con la Tabla 5, hay cuatro clones, KO-1, KO-4 y KO-7 y KO-9, con el genotipo $\Delta 4/\Delta 4$. El genotipo de la matriptasa de estos clones es idéntico. KO-1, KO-4 y KO-7 derivan de la misma agrupación retransfectada de TALEN, KO-9 deriva de una diferente. El análisis de FISH de los clones mostró que hay algunas diferencias en el cariograma de KO-1, KO-4 y KO-7. Por lo tanto, cabe asumir que no derivan de la misma célula madre.

Se ha insertado una mutación de desplazamiento del marco en ambos alelos del gen de la matriptasa en todos los clones de KO-1 a KO-9. Además, se obtuvo el clon mutado $\Delta 7/\Delta 15$, el cual tenía el genotipo $\Delta 7/\Delta 15$ y tenía una mutación de desplazamiento del marco en solo un alelo ($\Delta 7$). En el segundo alelo, la mutación $\Delta 15$, una delección de 15 pares de bases, da como resultado la delección de cinco aminoácidos en el dominio intracelular corto de la matriptasa. A pesar de ello, no se produce desplazamiento del marco debido a la delección $\Delta 15$. No parece que el dominio afectado sea necesario para la función catalítica, ya que permanece unido a la membrana cuando se desprende la parte extracelular que comprende el dominio catalítico de la proteasa. Por consiguiente, se asume que la matriptasa espesada partir del alelo $\Delta 15$ sigue siendo catalíticamente activa. Por consiguiente, en el clon celular $\Delta 7/\Delta 15$, la expresión funcional de la matriptasa se reduce, pero no se suprime. Se asume además que aprox. la mitad del ARNm restante expresado por dicho clon contiene la mutación de desplazamiento del marco.

Tabla 5: Mutaciones en el exón 2 de ambos alelos del gen de la matriptasa

N.º de clon	Genotipo
KO-1	$\Delta 4 / \Delta 4$
KO-2	$\Delta 4 / \Delta 4'$
KO-3	$\Delta 4 / \Delta 17$
KO-4	$\Delta 4 / \Delta 4$
KO-5	$\Delta 4 / \Delta 14$
KO-6	$\Delta 4 / \Delta 4'$
KO-7	$\Delta 4 / \Delta 4$
KO-8	$\Delta 4 / \Delta 11$
KO-9	$\Delta 4 / \Delta 4$
$\Delta 7 / \Delta 15$	$\Delta 7 / \Delta 15$

Tabla 6: Secuencias del gen de la matriptasa que codifican el exón 2 de WT derivado de CHO-K1 y los diferentes clones KO. Δ indica una delección. El número detrás de Δ indica cuántos nucleótidos se han eliminado. Los nucleótidos eliminados se muestran entre paréntesis y marcados en negrita.

WT	aacatgaatggcttggaggagggtgtggagtttctgcctgtgaataatgccaagaaagtggagaagcgaggccccggcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctggtctcttgggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 35)
$\Delta 4$	aacatgaatggcttggaggagggtgtggagtt(Δtctg)cctgtgaataatgccaagaaagtggagaa gcgaggccccggcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctggc ttctgggtgtggcacttctct (SEQ ID NO:36)
$\Delta 4'$ KO-2 intercambio de nucleótidos (c/t)	aacatgaatggcttggaggagggtgtggagtt(Δtctg)tctgtgaataatgccaagaaagtggagaa gcgaggccccggcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctggc ttctgggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 37)
$\Delta 17$	aacatgaatggcttggaggagggtg(Δtggagtttctgcctgtg[#])aataatgccaagaaagtggag aagcgaggccccggcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctg gcttctgggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 38) [#] (SEQ ID NO: 39)

Δ14	aacatgaatggctttgaggaggggtgtgga(Δgtttctgcctgtga [#])ataatgccaagaaagtggag aagcgaggcccccgcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctg gcttctggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 40) [#] (SEQ ID NO: 41)
Δ4' KO-6 intercambio nucleótidos (t/g)	aacatgaatggctttgaggaggggtgtggagt(Δtctg)cctgtgaataatgccaagaaagtggaga agcgaggcccccgcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctgg cttctggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 42)
Δ11	aacatgaatggctttgaggaggggtgtggagt(Δttctgcctgtg [#])aataatgccaagaaagtggaga agcgaggcccccgcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctgg cttctggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 43) [#] (SEQ ID NO: 44)
Δ7	aacatgaatggctttgaggaggggtgtgg(Δagtttct)gcctgtgaataatgccaagaaagtggagaa gagcgaggcccccgcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctggc ttctggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 45)
Δ15	aacatgaatggctttgaggaggggtgtg(Δgagtttctgcctgtg [#])aataatgccaagaaagtggag aagcgaggcccccgcgctgtgtggtgctgtggtcctgctggtcagtttctcttctcactcgtggctg gcttctggtgtggcacttctct (SEQ ID NO: 46) [#] (SEQ ID NO: 47)

Tabla 7: Secuencias de aminoácidos de la matriptasa parciales de CHO WT y los clones KO que incluyen los exones 1, 2 y 3 con los aminoácidos del exón 2 en negrita. Una estrella * representa un codón de parada en la Tabla 7.

WT	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegveflpvnnakkvekr gprrcvvlv vllvsflflslvagflvw hfly snvriqkvfnghlrvtnefnldayensnstefkdlanqvkeal... exon 4 (SEQ ID NO: 48)
Δ4	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegvefl *imprkwrseapgavwclw scwsvssfshswlasw cgts stqmfgskrsmvi*gsqmrftwmpmrtqtpqssktwpt r* (SEQ ID NO: 49-51)
Δ4' KO-2	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegvefl *imprkwrseapgavwclw scwsvssfshswlasw cgts stqmfgskrsmvi*gsqmrftwmpmrtqtpqssktwpt r*rkr* (SEQ ID NO: 52-54)
Δ17	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegve *cquesgearppalcgacgpagq fplsltrgwlp gval pllkcsdpkglqwsseghk*elsgcl*elklhrvqrpqpggsaeavv q* (SEQ ID NO: 55-58)
Δ14	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegve *cquesgearppalcgacgpag qfplsltrgwlp gval pllkcsdpkglqwsseghk*elsgcl*elklhrvqrpqpggsaeav vq* (SEQ ID NO: 59-62)
Δ4' KO-6	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegvecl *imprkwrseapgavwclw scwsvssfshswlasw cgts stqmfgskrsmvi*gsqmrftwmpmrtqtpqssktwpt r*rkr* (SEQ ID NO: 63-65)
Δ11	mgsnrgrkaggsskdfgarlkyssglenmng feegve **cquesgearppalcgacgpa gqfplsltrgwlp gval pllkcsdpkglqwsseghk*elsgcl*elklhrvqrpqpggsae avvq* (SEQ ID NO: 66-69)

5 2.A.5. Expresión del ARNm de la matriptasa

Con el fin de evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la expresión de la matriptasa, se llevó a cabo una PCR a tiempo real de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). La expresión del ARNm de la matriptasa medida en los clones individuales mediante qRT-PCR se comparó con la expresión del ARNm en una célula derivada de CHO-K1 de origen natural. El resultado de este experimento se muestra en la **Fig. 3**. De acuerdo con la **Fig. 3**, en los clones celulares con matriptasa mutada, el ARNm se expresa únicamente en el intervalo de un 5 a un 40% en comparación con el de origen natural. Este resultado sugiere que la expresión de la matriptasa mutada se ha reducido. Por lo tanto, las células expresan menos proteína matriptasa (no funcional). El clon celular Δ7/Δ15 también muestra únicamente una expresión baja del ARNm de la matriptasa en las células.

10

2.A.6. Experimentos de adición (*slope-in*) con sobrenadante celular procedente de los nueve clones con supresión de la matriptasa (MT-SP1)

Para evaluar el efecto de la supresión de la matriptasa, se llevaron a cabo experimentos de adición (*slope-in*) con cinco polipéptidos de interés diferentes, los cuales son propensos a experimentar *clipping*. El medio acondicionado de los cultivos celulares procedentes de los clones de CHO con supresión se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y métodos. Para los experimentos de adición (*slope-in*), el polipéptido de interés se añadió al medio acondicionado con una concentración final de 0.7 µM y se incubó a 37 °C con agitación continua a 500 rpm. El tiempo de incubación dependió del tipo de polipéptido de interés evaluado. Después de la incubación, las muestras del polipéptido de interés en medio acondicionado se analizaron mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western según se ha descrito en Materiales y métodos.

La **Fig. 4A** muestra el análisis por inmunotransferencia de Western de un experimento de adición (*slope-in*) con un anticuerpo IgG monoclonal (mAb) como polipéptido de interés. Como control de referencia, el primer carril partiendo de la izquierda de la inmunotransferencia de Western (que se indica con «(+))» muestra el mAb tras la incubación en un medio químicamente definido (también se utilizó el mismo medio de cultivo para obtener el medio acondicionado). No se detecta *clipping* del producto; la proteína intacta se marca con una flecha. El segundo carril (WT) muestra el anticuerpo monoclonal después de 48 h de incubación en medio acondicionado obtenido a partir de células derivadas de CHO-K1 que normalmente expresan la matriptasa. En este caso, se detecta una segunda banda fuerte, que representa el anticuerpo degradado proteolíticamente (marcado con una flecha). Cuando la banda proteica del anticuerpo degradado proteolíticamente es más fuerte que la banda proteica de la proteína intacta, más de un 50% de la proteína está degradada proteolíticamente. Por el contrario, tras la incubación del anticuerpo monoclonal en el medio acondicionado obtenido a partir de las nueve líneas celulares con supresión de KO-1 a KO-9 (de 1 a 9 en la **Fig. 4**), respectivamente, no se detecta producto degradado proteolíticamente. Por consiguiente, una supresión del gen de la matriptasa en la célula hospedadora de vertebrado supone una mejora significativa, ya que el *clipping* del mAb en el medio de cultivo celular se podría evitar de forma eficaz.

Los resultados de un experimento de adición (*slope-in*) correspondiente con una proteína de fusión-Fc se muestran en la **Fig. 4B**. El tiempo de incubación fue de 24 h. A diferencia del anticuerpo monoclonal, el control positivo en medio químico definido (+) ya contenía una gran porción de proteína degradada proteolíticamente (marcada con una flecha). Esto se debe a que la proteína de fusión-Fc que se añadió como polipéptido de interés se había producido en células CHO y se degrada proteolíticamente en gran medida en el medio de cultivo a partir del cual se recolecta. No se pudo eliminar toda la proteína degradada proteolíticamente durante el proceso de purificación, de modo que el material de partida ya contenía cierta contaminación de proteína degradada proteolíticamente. Mientras que en los experimentos con los clones con supresión de la matriptasa (de 1 a 9) las cantidades de proteína intacta y proteína degradada proteolíticamente son comparables a las del material de partida incubado en el control positivo (+), la incubación en el medio acondicionado de las células de origen natural (WT) derivadas de CHO-K1 no alteradas eliminó completamente y, por lo tanto, degradó la proteína intacta. De este modo, se observó básicamente un 100% de *clipping* en el medio acondicionado procedente de células que no estaban alteradas para debilitar la función de la matriptasa.

Se observa un resultado comparable para una proteína terapéutica recombinante adicional que se incubó en el medio acondicionado durante 1 h (**Fig. 4C**). Hay presentes dos glicovariantes de la proteína. De nuevo, en el medio acondicionado de las células CHO-K1 de origen natural (WT) más de un 50% de ambas glicovariantes de la proteína están degradadas proteolíticamente (se marcan con flechas), mientras que la incubación en el medio acondicionado de las células de KO-1 a KO-9 (de 1 a 9), donde la función de la proteasa endógena matriptasa está debilitada debido a la supresión del gen, conservó el estado de la proteína intacta, que se observó tras la incubación en un medio químico definido (control positivo (+)).

Los clones KO también se analizaron durante varios meses con el fin de analizar si la prevención, correspondientemente reducción, del *clipping* es una característica estable de las células de vertebrado alteradas en las que se suprimió el gen de la matriptasa. Por consiguiente, el experimento de adición (*slope-in*) con el mAb se repitió con medio acondicionado obtenido a partir de los clones celulares con supresión de la matriptasa que se habían cultivado durante 3 meses. El resultado del experimento, de nuevo comparado con el medio acondicionado procedente de la célula de origen natural CHO como control negativo «(WT)» y medio químicamente definido como control positivo «(+))», se muestra en la **Fig. 4D**. La inmunotransferencia de Western revela el mismo patrón exacto de bandas proteicas que el observado en la **Fig. 4A**. También se observó el mismo resultado después de 3 meses para la proteína de fusión-Fc (no se muestran los datos). Por lo tanto, se confirmó que, con los clones KO, no aparecía *clipping* después de varios meses. Es más, se observó que las líneas celulares KO crecían bien y que el crecimiento celular incluso mejoró después de un cultivo de 3 meses.

Los resultados de los experimentos de adición (*slope-in*) con dos proteínas víricas glicosiladas utilizando medio acondicionado de los clones de supresión de la matriptasa de KO-1 a KO-3 (1-3) se muestran en la **Fig. 5** después de 24 h (D1) y 48 h de incubación (D2). En el primer carril de la inmunotransferencia de Western (**Fig. 5A**) que representa la proteína después de la incubación en medio químico definido (+), se observan dos bandas proteicas. La banda superior representa la proteína intacta, la banda inferior una versión degradada proteolíticamente de la proteína que constituye aproximadamente un 5% de la proteína total en la muestra. En el medio acondicionado de CHO-K1 de origen natural (carriles WT), hay una cantidad muy reducida de proteína intacta presente después de 24 h (D1) de

incubación. Después de 48 h (D2), la banda proteica es casi invisible, es decir, casi toda la proteína se había degradado proteolíticamente. Además, la banda proteica de la proteína degradada proteolíticamente desapareció completamente, lo cual sugiere que la proteína se degradó adicionalmente. Por el contrario, no se observó ninguna diferencia en el patrón de las bandas proteicas para las proteínas incubadas durante 24 h o 48 h en los medios acondicionados de los clones con supresión de la matriptasa de KO-1 a KO-3 (remítase a 1-3). Por consiguiente, con el medio acondicionado obtenido a partir de las líneas celulares con supresión de la matriptasa, se detectó una degradación proteolítica significativamente reducida o nula de las proteínas terapéuticas. La segunda proteína vírica muestra un resultado comparable (**Fig 5B**). Por lo tanto, la proteína intacta está representada por la única banda proteica mostrada en el carril «(+»». Después de 24 h de incubación en medio acondicionado de células de origen natural derivadas de CHO-K1 (WT, D1) ya casi no se puede detectar ninguna traza de la proteína intacta. En su lugar, aparecen dos bandas proteicas inferiores, que representan versiones degradadas proteolíticamente de la proteína. Estas bandas proteicas también se observan en el experimento con el medio obtenido a partir de los clones con supresión de la matriptasa de KO-1 a KO-3. A pesar de ello, la mayoría de la proteína vírica se conserva con todos los clones de supresión evaluados incluso después de 48 h de incubación.

Para confirmar los experimentos anteriores, se realizó un experimento de adición (*spike-in*) con cinco proteínas de fusión-Fc adicionales, las cuales son propensas a experimentar *clipping*, según se ha descrito anteriormente. El sobrenadante recolectado exento de células se capturó mediante cromatografía líquida de afinidad con proteína A utilizando 1 mL de HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare). Se aplicó un tiempo de residencia de 2 minutos para la equilibración, carga y lavado. Para la dilución, se aplicó un tiempo de residencia de 4 minutos. El eluato se tituló hasta un pH de 5 con Tris 1 M antes de la filtración estéril con una unidad de filtro en jeringa Millex-GV (0.22 µm, PVDF, 13 mm; Millipore). La concentración de la proteína se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con una longitud de onda de 280 nm. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La Tabla 8 muestra los datos del análisis por espectrometría de masas. Según se puede observar, todas las proteínas de fusión-Fc evaluadas se degradaron proteolíticamente de forma completa o casi completa cuando se expresaron en las células progenitoras. Por el contrario, el *clipping* se redujo de forma considerable cuando se expresaron en la línea celular con supresión.

Tabla 8: Análisis del *clipping* para diferentes proteínas de fusión-Fc

Candidatos	WT Proteína de fusión-Fc degradada proteolíticamente [%]	KO-4 Proteína de fusión-Fc degradada proteolíticamente [%]
Proteína de fusión-Fc 1	100 %	81 %
Proteína de fusión-Fc 2	97 %	48 %
Proteína de fusión-Fc 3	98 %	63 %
Proteína de fusión-Fc 4	100 %	68 %
Proteína de fusión-Fc 5	100 %	67 %

Estos ejemplos demuestran que las células de vertebrado alteradas de acuerdo con la presente divulgación, donde la función de la proteasa endógena matriptasa está debilitada, presentan o liberan cantidades reducidas o nulas de matriptasa funcional en el medio de cultivo celular. Por consiguiente, la degradación proteolítica del polipéptido recombinante de interés que está presente (normalmente secretado) en el medio de cultivo celular se reduce de forma significativa cuando se utilizan estas células alteradas para producir un polipéptido de interés.

2.A.7. Experimentos de adición (*spike-in*) con sobrenadante celular procedente del clon mutado de la matriptasa Δ7/Δ15

Para evaluar el efecto de la expresión de la matriptasa funcional reducida, los experimentos de adición (*spike-in*) con la proteína de fusión-Fc y el anticuerpo IgG monoclonal (mAb) se repitieron con medio acondicionado obtenido a partir del clon Δ7/Δ15. El medio acondicionado del cultivo celular se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y métodos. Para el experimento de adición (*spike-in*), el polipéptido de interés se añadió al medio acondicionado con una concentración final de 0.7 µM y se incubó a 37 °C con agitación continua a 500 rpm. La proteína de fusión-Fc se incubó durante 2 h, el mAb durante 24 h. Después de la incubación, las muestras de los polipéptidos de interés en medio acondicionado se analizaron mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western según se ha descrito en Materiales y métodos.

Los resultados del experimento de adición (*spike-in*) con la proteína de fusión-Fc se muestran en la **Fig. 6A**. Como referencia, el primer carril de la inmunotransferencia de Western muestra la proteína de fusión-Fc tras la incubación en medio químicamente definido (que se indica con «(+»»). El segundo y el tercer carril («WT1» y «WT2») muestran la proteína de fusión-Fc tras la incubación en medio acondicionado de dos líneas celulares de origen natural derivadas de CHO-K1 diferentes que expresan normalmente la matriptasa funcional no modificada. Según se ha expuesto anteriormente, el material de partida contenía la proteína de fusión-Fc intacta, así como también proteína de fusión-Fc degradada proteolíticamente como impureza. En las muestras proteicas derivadas de la incubación con medio acondicionado de células CHO con matriptasa de origen natural («WT1» y «WT2»), básicamente no se observó proteína de fusión-Fc intacta. Por el contrario, en la incubación en medio acondicionado obtenido a partir del clon celular Δ7/Δ15 («Δ7/Δ15») donde la expresión funcional de la matriptasa se ha reducido de forma significativa (para

consultar los detalles respecto al clon, remítase al Ejemplo 2.4), el *clipping* se reduce de forma significativa, según se puede concluir a partir de la banda proteica fuerte que representa la proteína de fusión-Fc intacta.

La **Fig. 6B** muestra el análisis por inmunotransferencia de Western de un experimento de adición (*spike-in*) con el mAb IgG como polipéptido de interés. Como referencia, el primer carril de la inmunotransferencia de Western (que se indica con «(+))» muestra el mAb tras la incubación en medio químicamente definido. Se observa una banda proteica fuerte que representa el anticuerpo intacto. El segundo y el tercer carril («WT1» y «WT2») muestran el anticuerpo monoclonal tras la incubación en medio acondicionado de dos líneas celulares de origen natural derivadas de CHO-K1 diferentes que expresan la matriptasa no modificada. En este segundo y tercer carril, aparece una banda proteica fuerte adicional que tiene un peso molecular inferior, la cual representa el anticuerpo degradado proteolíticamente. De acuerdo con la intensidad de la señal, al parecer más de un 50% del anticuerpo se ha degradado proteolíticamente. En el cuarto carril («Δ7/Δ15») que muestra el mAb después de la incubación en medio acondicionado procedente del clon celular Δ7/Δ15, las intensidades de las señales se han invertido. De este modo, aunque no se ha eliminado completamente el *clipping*, se ha reducido significativamente en comparación con los clones celulares de origen natural de la matriptasa. Este resultado confirma que el hecho de reducir la expresión funcional de la matriptasa reduce significativamente el *clipping* del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular.

Estos experimentos muestran que, cuando se utiliza un clon celular donde solo se suprime un alelo de la matriptasa y donde se reduce la expresión de la matriptasa funcional, también se obtiene un *clipping* reducido del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular. Por lo tanto, se puede concluir que la actividad de *clipping* es proporcional al grado de expresión de la matriptasa funcional.

B. KO realizada con tecnología ZFN

Se generó un clon celular con supresión (MT-SP1) ZFN basándose en células progenitoras CHO utilizando tecnología de ZFN (siglas en inglés referentes a nucleasas con dedos de zinc). Para la supresión, se fijó como diana el exón 2 de la matriptasa en una región localizada antes de la región codificante del dominio de transmembrana (según se ha descrito en el Ejemplo 2 A).

2.B.1. Diseño/producción y uso de TALEN que son específicas para el exón 2 de la matriptasa

Se diseñaron un par de ZFN que tenían como diana el exón 2 de la matriptasa. Una ZFN tiene como diana y se une a 12 nucleótidos, la otra tiene como diana 18 nucleótidos. Los dos sitios de unión están separados por los cinco nucleótidos del sitio de corte.

2.B.2 Transcripción *in vitro* de los vectores de TALEN

El ARNm de ZFN se produjo mediante la transcripción *in vitro* (IVT) de los vectores ZFN. El ARNm se generó utilizando procedimientos conocidos por el experto en la técnica. El producto de IVT con caperuza se purificó mediante precipitación con NH₄-Ac y el ARNm generado (que contenía una cola de poliA y una caperuza cinco prima) se purificó utilizando el kit *RNeasy Micro* de Qiagen (cat. 74004).

2.B.3. Transfección del ARNm de ZFN

Para la transfección, se utilizaron células CHO progenitoras en fase de crecimiento exponencial con una viabilidad por encima de un 95%. Se realizó una electroporación (nucleofección) utilizando la tecnología Amaxa™, Nucleofector™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lonza).

2.B.4. Ensayo de Cel-I y estrategia de cribado

El ensayo de Cel-I se llevó a cabo de acuerdo con el manual de SAFC Biosciences y se realizó un cribado similar al descrito en el ejemplo 2A.4.

Para obtener un clon de supresión que comprendiera mutaciones de desplazamiento del marco en ambos alelos, se llevaron a cabo dos rondas de transfección y clonación del ARNm de ZFN. Se generó un clon con supresión de la matriptasa (KO-10) que contenía mutaciones de desplazamiento del marco en ambos alelos (Δ13/Δ13).

2.B.5. Experimentos de adición (*spike-in*) con sobrenadante celular procedente del clon con supresión de la matriptasa (MT-SP1)

Para evaluar el efecto de la supresión de la matriptasa, se llevaron a cabo experimentos de adición (*spike-in*) con dos polipéptidos de interés diferentes, los cuales son ambos propensos a experimentar *clipping*. El medio acondicionado de los cultivos celulares procedentes de los clones de CHO con supresión se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y métodos. Para los experimentos de adición (*spike-in*), los polipéptidos de interés (una proteína de fusión-Fc y una proteína terapéutica recombinante) se añadieron al medio acondicionado con una concentración final de 0.7 μM y se incubaron a 37 °C con agitación continua a 500 rpm. El tiempo de incubación dependió del tipo de polipéptido de interés evaluado. Después de la incubación, las muestras del polipéptido de interés en medio acondicionado se analizaron mediante SDS-PAGE según se ha descrito en Materiales y métodos.

Los resultados se corresponden con los experimentos de adición (*spike-in*) realizados con los clones KO generados con tecnología TALEN. Se utilizó una proteína de fusión-Fc y una proteína terapéutica recombinante según se ha

descrito en la sección 2.A.6 de los ejemplos. Mientras que, en los experimentos con el clon con supresión de la matriptasa, las cantidades de proteínas intactas y proteínas degradadas proteolíticamente son comparables a las del material de partida incubado en el control positivo (+), la incubación en el medio acondicionado de las células de origen natural (WT) derivadas de CHO-K1 no alteradas eliminó completamente y, por lo tanto, degradó las proteínas intactas.

Los clones KO también se analizaron durante varios meses con el fin de analizar si la prevención, correspondientemente reducción, del *clipping* es una característica estable de las células de vertebrado alteradas en las que se suprimió el gen de la matriptasa. Por consiguiente, el experimento de adición (*spike-in*) con la proteína de fusión-Fc se repitió con medio acondicionado obtenido a partir de los clones celulares con supresión de la matriptasa que se habían cultivado durante 6 meses. El resultado del experimento confirmó que, con el clon KO, no aparecía *clipping* incluso después de varios meses. Es más, se observó que la línea celular KO crecía bien y que el crecimiento celular incluso mejoró con el tiempo de cultivo.

IV. Ejemplo 3: Las proteínas recombinantes son escindidas directamente por la matriptasa

Con el fin de demostrar adicionalmente que la matriptasa escinde directamente proteínas expresadas de forma recombinante y secretadas (dianas del *clipping*), se utilizaron proteasas que se pueden adquirir de proveedores comerciales, a saber, MT-SP1 de ratón y Htra1 humana. Se incubó un anticuerpo IgG monoclonal mAb (**Fig. 7A**), una proteína de fusión-Fc (**Fig. 7B**) y una proteína recombinante adicional (**Fig. 7C**) durante 24 h, 2 h y 1 h, respectivamente, con las dos proteasas de tipo tripsina MT-SP1 de ratón y Htra1 humana, las cuales se añadieron al medio de cultivo químicamente definido. La coincubación se llevó a cabo a 37 °C con agitación continua a 500 rpm. Los polipéptidos de interés se utilizaron, cada uno de ellos, con una concentración de 0.7 µM. Cada polipéptido de interés se evaluó con cantidades cada vez menores de las proteasas MT-SP1 y Htra1: Las relaciones molares de proteasa/polipéptido de interés son, de izquierda a derecha, 1/10, 1/100 y 1/1000 para MT-SP1 y 1/3, 1/10 y 1/100 para Htra1. Como controles, se incubaron muestras adicionales del polipéptido de interés con medio acondicionado procedente de células derivadas de CHO-K1 de origen natural como control negativo (carril «(-)») y un medio definido químicamente que no se puso en contacto con las células como control positivo (carril «(+))».

A partir de las inmunotransferencias de Western de la **Fig. 7A a C**, resulta evidente que la Htra1 recombinante que se añadió al medio de cultivo celular no escinde ninguno de los polipéptidos de interés evaluados. Incluso para unas concentraciones de Htra1 más elevadas, las bandas proteicas tenían exactamente el mismo aspecto que en el control positivo («(+))»). Por el contrario, todos los polipéptidos recombinantes de interés fueron degradados proteolíticamente de manera significativa incluso con la concentración más baja de MT-SP1 añadida. La banda proteica o bien se pareció a la del control negativo («(-)») o fue incluso peor. Por consiguiente, se produjeron grados significativos de *clipping* en todas las condiciones evaluadas cuando se añadió MT-SP1.

En el experimento con la proteína de fusión-Fc, se observó un efecto dependiente de la concentración para la proteasa MT-SP1 (**Fig. 7B**). Mientras que con la concentración más baja de matriptasa/MT-SP1 la banda proteica de la proteína de fusión-Fc intacta a aproximadamente 85 kDa se reduce tan solo ligeramente en comparación con el control positivo, con concentraciones más elevadas de MT-SP1 la banda proteica a aprox. 85 kDa desaparece completamente. Como consecuencia, el grado de *clipping* de la proteína de fusión-Fc se correlaciona con la concentración de matriptasa/MT-SP1 en el medio de cultivo celular.

Para determinar el sitio de *clipping* inducido por la MT-SP1 de ratón comercial utilizada en este ejemplo, la muestra de anticuerpo (mAb) con una concentración de MT-SP1 1/100 se sometió a espectrometría de masas. El sitio de *clipping* identificado fue el mismo que cuando el mAb fue producido por la línea celular CHO de origen natural. Esto muestra que el sitio de *clipping* de la matriptasa de ratón sobre el mAb es el mismo que el sitio de *clipping* de la proteasa responsable del *clipping* cuando se produce el mAb en células CHO. Estos resultados confirman adicionalmente que la matriptasa es la proteasa del *clipping*.

V. Ejemplo 4: Inhibición de la acción de *clipping* de la matriptasa por parte de un inhibidor selectivo de la matriptasa

Para confirmar adicionalmente que el *clipping* del polipéptido recombinante de interés está provocado por la matriptasa como proteasa clave responsable del *clipping*, se llevaron a cabo experimentos de adición (*spike-in*) con un fragmento Fab anti-MT-SP1 específico que inhibe específicamente la matriptasa/MT-SP1 humana. La estructura del Fab inhibidor y los detalles de unión sobre MT-SP1 humana están publicados en Farady *et al.*, 2008 *J. Mol. Biol.* (2008) 380, 351-360).

Los polipéptidos terapéuticos de interés como dianas del *clipping* fueron en este caso un anticuerpo IgG monoclonal (mAb) y una glicoproteína recombinante que no era un anticuerpo con dos glicovariantes. El polipéptido de interés se añadió con una concentración de 0.7 µM en cada caso. La Tabla 9 describe los detalles adicionales de la configuración experimental que se corresponde con los resultados de la inmunotransferencia de Western que se muestra en la **Fig. 8** para el mAb (**Fig. 8**, panel superior) y la proteína recombinante (**Fig. 8**, panel inferior):

Tabla 9

Carril 1	Marcador
----------	----------

Carril 2	Medio químicamente definido (+)
Carril 3	Medio acondicionado obtenido a partir de células de origen natural derivadas de CHO-K1 (-)
Carril 4	Medio químicamente definido con una concentración añadida de 3.45 nM de MT-SP1 de ratón recombinante
Carril 5	Medio químicamente definido con una concentración añadida de 3.45 nM de MT-SP1 de ratón recombinante y una concentración añadida de 1 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1
Carril 6	Medio químicamente definido con una concentración añadida de 3.45 nM de MT-SP1 de ratón recombinante y una concentración añadida de 10 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1
Carril 7	Medio químicamente definido con una concentración añadida de 3.45 nM de MT-SP1 de ratón recombinante y una concentración añadida de 50 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1
Carril 8	Medio acondicionado obtenido a partir de células de origen natural derivadas de CHO-K1
Carril 9	Medio acondicionado obtenido a partir de células de origen natural derivadas de CHO-K1 y una concentración añadida de 1 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1
Carril 10	Medio acondicionado obtenido a partir de células de origen natural derivadas de CHO-K1 y una concentración añadida de 10 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1
Carril 11	Medio acondicionado obtenido a partir de células de origen natural derivadas de CHO-K1 y una concentración añadida de 50 μ M de fragmento Fab anti-MT-SP1

El medio acondicionado se preparó según se ha descrito en Materiales y métodos. El tiempo de incubación fue de 24 h en el caso del anticuerpo IgG monoclonal y de 1 h para la proteína recombinante que no era un anticuerpo.

- 5 La **Fig. 8** (remítase al panel superior) muestra que hay una banda proteica fuerte del mAb intacto presente en el control positivo (+) (remítase al carril 2). No se observó mAb degradado proteolíticamente. En el control negativo (-) (remítase a los carriles 3 y 8), aparece una segunda banda proteica de mayor intensidad un poco más abajo de la proteína intacta, lo cual indica que el anticuerpo monoclonal se degrada proteolíticamente de forma significativa en el medio acondicionado de células de origen natural derivadas de CHO-K1. El mAb intacto y el degradado proteolíticamente se marcan con flechas. En el medio químicamente definido en el que se añadió MT-SP1 de ratón (remítase al carril 4), se observa el mismo patrón que en el control negativo (-). Respecto a la proteína recombinante que no es un anticuerpo (remítase a la **Fig. 8**, panel inferior), en el control positivo (+) (remítase al carril 2), se observa una banda fuerte para las dos glicovariantes de la proteína intactas a aproximadamente 37 kDa. Estas bandas proteicas para las glicovariantes de la proteína intactas observadas en el control positivo desaparecieron en el control negativo (-) y aparecieron nuevas bandas proteicas para las glicovariantes de la proteína degradadas proteolíticamente (remítase a los carriles 3 y 8).

Respecto a las muestras que se incubaron en presencia de Fab anti-MT-SP1, una concentración de 1 μ M del Fab ya fue suficiente para eliminar completamente la degradación del mAb por parte de MT-SP1 de ratón (**Fig. 8**, panel superior, carril 5). Una concentración de 1 μ M del Fab anti-MT-SP1 también redujo pero no pudo evitar completamente el *clipping* del mAb en medio condicionado (remítase al panel superior, carril 9). El *clipping* del mAb se suprimió en medio acondicionado con una concentración de Fab de 10 μ M y 50 μ M (**Fig. 8**, panel superior, carriles 10 y 11). Para la proteína recombinante incubada con MT-SP1 de ratón recombinante en medio químicamente definido, el *clipping* ya se redujo con una concentración de Fab 1 μ M (remítase a la **Fig. 8**, panel inferior, carril 5). Se observó una reducción adicional del *clipping* con Fab 10 μ M y se observó una detención completa del *clipping* con Fab 50 μ M en el medio químicamente definido con MT-SP1 de ratón recombinante añadida, así como también en el medio acondicionado (remítase a la **Fig. 8**, panel inferior, carriles 6, 7 y 10 y 11). Por consiguiente, el Fab producido contra la matriptasa humana también inhibió de forma eficaz la matriptasa de ratón, así como también la de hámster. A pesar de ello, fueron necesarias unas concentraciones más elevadas para observar una inhibición completa de la matriptasa de ratón y hámster. Se asume que esto se puede atribuir a las diferencias de aminoácidos entre la matriptasa humana y la de ratón y hámster dentro del sitio de unión del epítipo, de modo que el Fab inhibidor contra la matriptasa humana es menos potente en la matriptasa de ratón y hámster, por lo tanto, son necesarias unas concentraciones más elevadas del Fab para inhibirlas.

35 VI. Ejemplo 5: Producción de proteínas en líneas celulares con supresión de la matriptasa

Con el fin de confirmar los resultados de los experimentos de adición (*spike-in*), se expresaron varios polipéptidos de interés en un clon celular con supresión de la matriptasa en un cultivo discontinuo alimentado y el *clipping* del polipéptido de interés expresado y secretado se analizó y se comparó con los resultados obtenidos con una línea celular de origen natural CHO correspondiente que expresa de forma endógena la matriptasa intacta.

5.1. Transfección del vector que codifica mAb

Una línea celular de origen natural CHO que expresa la matriptasa (derivada de CHO-K1) y el clon celular de CHO con supresión de la matriptasa 4 (KO-4, remítase a la Tabla 5) se transfectaron con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal (mAb) y dos genes de marcadores seleccionables, a saber, neo y DHFR. Para la transfección, las células se cultivaron hasta la fase exponencial y se transfectaron 5×10^6 células con $3 \mu\text{g}$ de vector de ADN. Se llevaron a cabo cinco réplicas de la transfección utilizando la línea celular de origen natural y se llevaron a cabo cuatro réplicas de la transfección utilizando la línea celular KO-4. La selección de las células transfectadas de forma estable con el vector que codifica la proteína de interés se llevó a cabo con G418 (concentración de G418 de 0.8 mg/ml) y a continuación se realizaron dos pasos consecutivos de selección con MTX (MTX 500 nM y $1 \mu\text{M}$). Las condiciones de selección fueron idénticas para todas las agrupaciones y ambas líneas celulares. Al final de la selección (viabilidad celular $> 95\%$), las células se congelaron. Durante el proceso de selección, se determinaron las titulaciones de mAb expresado en el medio. La titulación en el sobrenadante de las células con supresión de la matriptasa se comparó con la titulación de las células de origen natural CHO. Los resultados demostraron que la supresión de la matriptasa no ejerció ningún efecto negativo sobre la capacidad de producción de las células, sino que incluso presentaron una tendencia a incrementar la titulación.

5.2. Procedimiento de producción discontinua alimentada

Para la producción discontinua alimentada, se seleccionaron las cuatro agrupaciones del clon con supresión de la matriptasa KO-4 y tres agrupaciones de la línea celular de origen natural CHO con la titulación de anticuerpo más elevada. Las células congeladas de las siete agrupaciones se descongelaron a la vez y, antes de la inoculación, se hicieron pasar una vez por los reactores discontinuos alimentados individuales.

Las células se cultivaron en agitadores discontinuos alimentados que contenían un medio químico definido enriquecido en aminoácidos, vitaminas y oligoelementos (medio discontinuo alimentado). El cultivo discontinuo alimentado se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y con agitación. Durante el cultivo discontinuo alimentado, se añadió de forma regular a lo largo del proceso una alimentación que contenía glucosa y aminoácidos (alimentación discontinua alimentada). Durante el proceso de cultivo discontinuo alimentado, se tomaron de forma regular muestras del material del cultivo discontinuo alimentado para determinar la densidad de células viables (vcd, por sus siglas en inglés) utilizando un analizador de viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter) y para determinar las titulaciones de la proteína en el medio de cultivo celular. Al final del lote alimentado (día 13 o 14), se detuvo el proceso de cultivo. El medio acondicionado procedente del frasco de agitación (cultivo de 100 ml) se recolectó y se filtró utilizando un filtro Steriflip de $0.22 \mu\text{m}$. El anticuerpo monoclonal se purificó a partir del medio acondicionado filtrado utilizando cromatografía líquida de afinidad con proteína A (minicolumnas de proteína A, Proteus, cat. PUR008). La purificación se llevó a cabo utilizando el protocolo del proveedor. La concentración de proteína de las muestras tras la purificación con proteína A se determinó utilizando un sistema NanoDrop™ (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo del proveedor. El análisis de los cultivos discontinuos alimentados reveló que, durante el periodo de cultivo de 14 días, la titulación del mAb expresado en el medio de cultivo para las agrupaciones de KO-4 fue similar o incluso superior a la del medio de cultivo de las agrupaciones de células de origen natural CHO. Además, la viabilidad celular fue similar o incluso superior para las agrupaciones de células KO-4. Las células KO también crecieron con unas densidades celulares similares o incluso mejores. Estos resultados indican que la supresión de la matriptasa no ejerce ninguna influencia negativa sobre la tasa de expresión de la proteína e incluso puede potenciarla. Además, el crecimiento celular no se vio afectado de forma negativa sino que incluso se puede mejorar.

5.3. Análisis del clipping

Para el análisis del *clipping*, se utilizaron dos estrategias en paralelo: electroforesis en microchip (ME) - SDS y espectrometría de masas.

Electroforesis en microchip

Para la preparación de la muestra, se utilizan $5 \mu\text{L}$ de la proteína purificada. Dependiendo de la concentración de las muestras, la cantidad de proteína es diferente. Para la preparación de la muestra del ensayo en microchip reductor, se mezclan $5 \mu\text{L}$ con $35 \mu\text{L}$ de tampón de muestra reductor. A continuación, la solución mezclada se incuba en la placa térmica durante 15 min a 70°C . Después de enfriarla, se añaden $70 \mu\text{L}$ de agua MilliQ para obtener un volumen final de $110 \mu\text{L}$. Se utilizó como sistema el instrumento LabChip® GX II de PerkinElmer. El protocolo utilizado es una versión revisada del protocolo del proveedor. La principal diferencia es la relación de muestra/tampón de muestra reductor, que es de 1:7 en el protocolo de la presente para obtener una desnaturalización mejor, en lugar de 1:3.5 en el protocolo del proveedor.

La **Fig. 9** muestra el resultado de la electroforesis en microchip. Los primeros tres carriles partiendo de la izquierda (identificados como WT 1, 2 y 3) representan la composición de la muestra de proteína para el cultivo celular purificado con proteína A procedente de las tres producciones con agrupaciones celulares de origen natural CHO. En cada muestra, se observa el mismo patrón de bandas proteicas. Se observó una banda proteica ancha que representa la cadena pesada (HC) intacta del anticuerpo monoclonal (el tamaño del ensayo de Labchip no es exacto y habitualmente está sobrestimado). Inmediatamente por debajo de esta banda proteica, se observa una segunda banda proteica más delgada que representa la cadena pesada degradada proteolíticamente. La especie de HC degradada proteolíticamente comigra con la HC no glicosilada. Además, se observa una tercera banda proteica que

representa la cadena ligera a aproximadamente 29 kDa. En las muestras proteicas del anticuerpo monoclonal producido en las agrupaciones celulares con supresión de la matriptasa (identificadas como KO-4 1, 2, 3 y 4), tanto la banda proteica de la cadena pesada intacta como la de la cadena ligera son al menos comparables, o incluso más fuertes, en comparación con las bandas proteicas encontradas en las muestras producidas por las líneas celulares de origen natural CHO. A pesar de ello, la banda de la cadena pesada degradada proteolíticamente identificada con la segunda flecha desde la parte superior en la **Fig. 9** casi no es visible en las cuatro muestras de anticuerpo KO4-1, KO4-2, KO4-3 y KO4-4. Esto demuestra que el *clipping* del mAb casi se ha eliminado cuando se produce en líneas celulares con supresión de la matriptasa.

Con el fin de cuantificar el resultado, se determinó la intensidad de las bandas proteicas de la cadena pesada del anticuerpo degradado proteolíticamente y de la cadena pesada del anticuerpo intacto y, partir de esto, se calculó el porcentaje de *clipping*. El resultado de este análisis se resume en la Tabla 10. Muestra que la cantidad de *clipping* del anticuerpo monoclonal se reduce drásticamente cuando se utiliza el clon con supresión de la matriptasa como línea celular de producción. De acuerdo con el análisis, un promedio de un 16.1% de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producida por las tres agrupaciones celulares de origen natural CHO se degradó proteolíticamente. Por el contrario, se produjo tan solo un 1% o menos de *clipping* de promedio para la HC del mAb producida en los cuatro cultivos discontinuos alimentados con supresión de la matriptasa. Debido a la comigración de la HC no glicosilada, no se pueden determinar unos valores exactos basándose en el análisis de LabChip®.

Tabla 10 Análisis del *clipping* basado en la intensidad de las bandas proteicas

Muestra	Cadena pesada del mAb degradada proteolíticamente [%]
WT 1	20.2
WT 2	15.6
WT 3	12.4
KO-4 1	0.9
KO-4 2	0.9
KO-4 3	1.0
KO-4 4	0.7

Por lo tanto, utilizando electroforesis en microchip, se detecta apenas un 1% o menos de *clipping* en el mAb expresado por células con KO de la matriptasa, mientras que se detecta de un 12% a un 20% de *clipping* en células WT que expresan el mismo mAb (*clipping* detectado en la HC).

Análisis por espectrometría de masas

Las muestras se deglicosilaron y redujeron antes del análisis por espectrometría de masas. Para cada una de las siete muestras proteicas purificadas con proteína A, se incubó una alícuota con una proteína total de 50 µg durante toda la noche a 37 °C con 1.25 µl de PNGasa F con una concentración de 0.3 mg/ml en Tris/HCl 50 mM de pH 7.5. La concentración final de la muestra fue de aproximadamente 0.5 mg/ml. Después de la deglicosilación, 88 µl de las muestras digeridas con PNGasa F se redujeron añadiendo 112 µl de tampón reductor (GuHCl 8 M, 10 µl de Tris/HCl 1 M de pH 7.5 y 2 µl de DTT 1 M) y se incubaron durante una hora a 37 °C. La reducción se desactivó mediante la adición de 2 µl de ácido trifluoroacético al 10%.

Las muestras obtenidas de este modo con un volumen total de 202 µl y una concentración de aproximadamente 0.22 mg/ml de proteína se utilizaron a continuación para el análisis mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas combinadas. El instrumento de LC/MS era un sistema Waters Synapt G2 acoplado con UPLC (software: MassLynx 4.1). El método de LC utilizó una tasa de flujo de 0.2 mL/min y los tampones MPA (0.1% de TFA en agua) y MPB (0.09% de TFA en acetonitrilo). Se llevó a cabo una detección UV a 214 nm y 280 nm. La temperatura de la muestra fue de ~5 °C. Se introdujeron 14 µl de la muestra deglicosilada y reducida (cantidad de proteína 3 µg) en una columna BEH C4 1.7 µm, 2.1 X 100 mm (Waters). La temperatura de la columna fue de 80 °C. Antes de introducir la muestra, la columna se equilibró con el tampón MPA. La elución se llevó a cabo con el tampón MPB.

La proteína eluida se analizó adicionalmente a continuación mediante espectrometría de masas. Utilizando los datos de LC/MS, se identificaron los sitios de *clipping* y se cuantificó el porcentaje de las especies degradadas proteolíticamente. La Tabla 11 muestra el porcentaje de cadenas pesadas del anticuerpo degradadas proteolíticamente basándose en el ensayo de LC/MS para cada muestra proteica. Mientras que en las muestras de origen natural se observó un *clipping* de un 20 a un 29%, tan solo un 2% o menos de la cadena pesada del anticuerpo se degradó proteolíticamente cuando se utilizaron las células con supresión de la matriptasa para la producción. Los resultados calculados basándose en los datos de UV214nm son ligeramente más elevados en comparación con los obtenidos a partir del ensayo reductor en LabChip (remítase a la Tabla 10). A pesar de ello, la fuerte reducción del *clipping* que se consigue cuando se aplican las doctrinas de la presente divulgación se confirma de nuevo. Los resultados de LC/MS demuestran una reducción de 15 veces en el *clipping* para los mAb producidos en las líneas celulares con supresión de la matriptasa. El análisis del sitio de *clipping* reveló que la cadena pesada del mAb producida en las células con supresión de la matriptasa se degrada proteolíticamente en la misma posición que en la HC del mAb producida en las líneas celulares de origen natural CHO. La modelización de la proteína reveló

además que el sitio de *clipping* está localizado en un área muy flexible del mAb, que está expuesta al medio de cultivo celular. Por lo tanto, incluso las proteasas con una afinidad baja por este sitio de *clipping* pueden acceder a este con facilidad y escindirlo. Estos descubrimientos pueden explicar los eventos de *clipping* residual en las cepas con supresión de la matriptasa.

5

Tabla 11: Análisis del *clipping* basándose en un ensayo de LC/MS

Muestra	Cadena pesada de mAb degradada proteolíticamente [%]
WT 1	28.5
WT 2	23.5
WT 3	19.6
KO-4 1	2.0
KO-4 2	1.5
KO-4 3	1.8
KO-4 4	1.7

5.4. Transfección de WT y KO-4 con otras glicoproteínas

10

Se realizaron otros ejemplos para demostrar de nuevo que la supresión de la matriptasa introducida no afecta de forma negativa al nivel de producción y la calidad del producto de las glicoproteínas recombinantes. Se expresaron dos glicoproteínas que no eran un anticuerpo (en la presente, una proteína de fusión-Fc, así como también una proteína terapéutica recombinante). La línea celular con supresión de la matriptasa KO-4 y la línea celular de origen natural CHO a partir de la cual se obtuvo el clon KO-4 se transfectaron con vectores de expresión adecuados. Tras la transfección y selección, se llevaron a cabo titulaciones y análisis de las proteínas (p. ej., según se ha descrito anteriormente en el capítulo 5.3).

15

Las titulaciones de las proteínas conseguidas con la línea celular con KO de la matriptasa KO-4 estuvieron en el mismo intervalo o fueron superiores en comparación con la línea celular WT correspondiente a partir de la cual se obtuvo el clon KO-4 (remítase también a la Tabla 12). De nuevo, el *clipping* se redujo significativamente en proteínas tales como la proteína de fusión-Fc obtenida a partir de las células KO en comparación con proteínas tales como la proteína de fusión-Fc obtenida a partir de las células WT (remítase también a la Tabla 13). Esto muestra claramente que una KO del gen de la matriptasa redujo la degradación proteolítica para varios polipéptidos adicionales.

20

Tabla 12: Análisis de la expresión de una proteína de fusión-Fc y una proteína terapéutica recombinante

Candidatos	WT	KO-4
Proteína de fusión-Fc	1.32 g/L	1.24 g/L
Proteína terapéutica recombinante	0.59 g/L	1.11 g/L

25

Tabla 13: Análisis del *clipping* de una proteína de fusión-Fc y una proteína terapéutica recombinante

Candidatos	WT Proteína proteolíticamente [%]	KO-4 Proteína proteolíticamente [%]
Proteína de fusión-Fc	12.4 %	4.5 %
Proteína terapéutica recombinante	70.2 %	53.9 %

En general, la línea celular con KO de la matriptasa mostró unas características similares o incluso mejoradas para la producción de glicoproteínas. Por consiguiente, las líneas celulares respectivas son adecuadas para la producción de polipéptidos sensibles a la proteólisis, así como también para la producción de polipéptidos que no son sensibles a la proteólisis. Por lo tanto, se proporciona una línea celular universal que simplifica la producción de diferentes polipéptidos de interés.

30

VII. Ejemplo 6: Idoneidad del proceso previo y escalado en un biorreactor

35

Con el fin de mostrar la idoneidad de la línea celular con supresión de la matriptasa para ser escalada para la producción terapéutica a gran escala, se evaluaron 12 clones progenitores derivados de dos estrategias de KO de la matriptasa diferentes (tecnología ZFN y TALEN) en una estrategia de cribado de tres etapas. Para comparar, se utilizó la línea celular de origen natural CHO.

40

6.1. Evaluación del rendimiento del clon progenitor

6.1.1. Comparación del rendimiento del clon progenitor durante la expansión celular

45

Con el fin de evaluar el rendimiento de 12 clones KO no transfectados (siete subclones ZFN (generados mediante una única clasificación celular del clon KO ZFN descrito en el Ejemplo 2b) y cinco derivados de TALEN) y la línea celular de origen natural comparadora durante la expansión para la producción a gran escala, la multiplicación del

inóculo se evaluó en frascos de agitación utilizando dos medios de expansión del cultivo celular, que diferían en la concentración de una vitamina esencial. Por consiguiente, los clones se inocularon en ambos medios de expansión con una densidad de células viables definida y se cultivaron durante cuatro días a 36.5 °C. Los clones se analizaron respecto a las densidades de células viables finales y tasas de crecimiento promedio, según se describe en la Tabla 14. Teniendo en cuenta los resultados procedentes de la evaluación de la idoneidad de los clones progenitores utilizando medio de la etapa de producción (Capítulo 6.1.2), se seleccionaron los siete clones de mejor rendimiento para realizar una comparación adicional respecto a sus capacidades de producción (remítase al Capítulo 6.2).

Tabla 14: Resultados de los rendimientos de los clones progenitores durante la expansión celular

ID del clon	Mue [d ⁻¹] en expansión. medio N.º 1	Mue [d ⁻¹] en expansión. medio N.º 2	VCD [células/ml] en expansión. medio N.º 1	VCD [células/ml] en expansión. medio N.º 2
ZFN KO1	0.87	0.83	6.75E+06	4.57E+06
ZFN KO1	0.83	0.80	5.50E+06	6.88E+06
ZFN KO3	0.79	0.84	4.06E+06	8.90E+06
ZFN KO4	0.73	0.91	6.00E+06	7.70E+06
ZFN KO5	0.86	0.86	8.99E+06	5.03E+06
ZFN KO6	0.85	0.84	7.23E+06	5.57E+06
ZFN KO7	0.78	0.90	4.08E+06	6.48E+06
TALEN KO-1	0.87	0.85	6.24E+06	6.35E+06
TALEN KO-2	0.88	0.80	4.97E+06	6.01E+06
TALEN KO-3	0.85	0.81	5.55E+06	4.11E+06
TALEN KO-4	0.80	0.86	5.91E+06	7.08E+06
TALEN KO-7	0.84	N.A.	6.19E+06	N.A.
Origen natural	0.81	N.A.	6.18E+06	N.A.

6.1.2. Comparación del rendimiento de los clones progenitores en condiciones de producción

Los 12 clones progenitores y la línea celular de origen natural de referencia se compararon adicionalmente en un proceso de producción discontinua alimentada en frascos de agitación. Las células del estudio de expansión descrito en el capítulo 6.1.1. se cultivaron a 36.5 °C durante 14 días utilizando dos condiciones de cultivo diferentes (dos medios de producción químicamente definidos, densidades de células de inoculación y regímenes de alimentación diferentes). Se llevó a cabo una alimentación con dos soluciones de alimentación independientes a lo largo de todo el proceso siguiendo un perfil predefinido y se aplicó un desplazamiento de la temperatura. Se monitorizaron las densidades celulares, viabilidades y metabolitos clave a diario y se utilizaron para comparar los clones KO con los clones WT respecto a su idoneidad para la producción. Se identificaron siete clones que consiguieron un rendimiento de crecimiento similar o superior al de la línea celular de origen natural, a la vez que los perfiles de metabolitos eran comparables.

6.2. Cribado en frascos de agitación de agrupaciones transfectadas

Los 7 clones progenitores mejores, que se identificaron en el Capítulo 6.1, y los de origen natural CHO se transfectaron por triplicado con un anticuerpo IgG monoclonal como polipéptido de interés del que se sabe que es sensible a la degradación proteolítica en el entorno de la línea celular de origen natural. Las células transfectadas se evaluaron utilizando un cultivo en frascos de agitación y dos condiciones diferentes, según se ha descrito en el Capítulo 6.1.2. Durante el cultivo, se monitorizó el crecimiento celular (densidades de células viables, viabilidades celulares) y la formación del producto. Las células derivadas de la estrategia de supresión TALEN mostraron un crecimiento celular similar o mayor en comparación con las células de origen natural CHO, mientras que las agrupaciones derivadas de ZFN mostraron un crecimiento celular ligeramente inferior durante la fase exponencial en comparación con las agrupaciones derivadas de TALEN. A pesar de ello, la viabilidad celular al final del cultivo fue comparable para todos los clones. La productividad volumétrica al final del cultivo fue un 19% superior de promedio para TALEN y un 9% superior de promedio para las agrupaciones de nucleasas con dedos de zinc en comparación con la productividad de las agrupaciones de origen natural CHO.

Al final del cultivo (día 14), el anticuerpo IgG monoclonal se analizó para determinar su integridad. Por consiguiente, los sobrenadantes se recolectaron mediante centrifugación y se filtraron de forma estéril. El anticuerpo IgG monoclonal se capturó a partir de los sobrenadantes y se analizó mediante CE-SDS (siglas en inglés referentes a electroforesis capilar-dodecilsulfato sódico) para determinar la degradación proteolítica y mediante CEC (siglas en inglés referentes a cromatografía de intercambio catiónico) para evaluar la distribución variante de cargas. Todas las agrupaciones derivadas de los clones con supresión mostraron un nivel similarmente bajo de aprox. 1% de *clipping* del polipéptido, mientras que las de origen natural CHO fueron escindidas en aproximadamente un 21%.

6.3. Cribado en un biorreactor de subclones progenitores y agrupaciones transfectadas

Los cuatro clones progenitores de mejor rendimiento y las agrupaciones transfectadas que se identificaron en los capítulos 6.1. y 6.2. se seleccionaron para realizar una caracterización exhaustiva utilizando unas condiciones de cultivo controladas en biorreactores de vidrio de 7 L. El proceso de cultivo fue esencialmente como se ha descrito en el Capítulo 6.1.2., aunque se utilizaron únicamente las condiciones de cultivo preferidas que se identificaron en el Capítulo 6.2. Se observó un crecimiento ligeramente inferior para las agrupaciones transfectadas en comparación con los clones progenitores no transfectados, lo cual es un fenómeno conocido atribuido a la carga metabólica provocada por la expresión del polipéptido. A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas en el comportamiento de crecimiento celular en comparación con la línea celular WT. Los metabolitos tales como el lactato y el amonio se encontraron dentro de los intervalos habituales y fueron similares a los de la línea celular de origen natural.

La calidad del producto se evaluó analíticamente para determinar la pureza mediante SEC, CEC y CE-SDS y la N-glicosilación mediante un método propio. Los resultados mostraron que todos los clones KO consiguieron una calidad del producto comparable en cuanto a productos de agregación y degradación, distribución variante de cargas y patrón de glicosilación. Los resultados reducidos de CE-SDS mostraron que hay especies degradadas proteolíticamente presentes en todos los subclones KO, con un nivel bajo de un 0.7%. Todos los clones KO no solo mostraron unas características de crecimiento similares o preferidas en comparación con la línea celular de origen natural de referencia, sino que también produjeron un polipéptido de calidad sistemáticamente mejor.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Células de vertebrado novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un polipéptido de interés

<130> PAT056118-WO-PCT

<150> US 61/985,589

<151> 2014-04-29

<150> US 61/994,310

<151> 2014-05-16

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 855

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Ala Lys Lys Val Glu
35 40 45

Lys Arg Gly Pro Arg Arg Cys Val Val Leu Val Val Leu Leu Val Ser
50 55 60

Phe Leu Phe Leu Ser Leu Val Ala Gly Phe Leu Val Trp His Phe Leu
65 70 75 80

Tyr Ser Asn Val Arg Ile Gln Lys Val Phe Asn Gly His Leu Arg Val
85 90 95

Thr Asn Glu Asn Phe Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu
100 105 110

Phe Lys Asp Leu Ala Asn Gln Val Lys Glu Ala Leu Lys Leu Leu Tyr
115 120 125

Ser Glu Val Pro Val Leu Gly Pro Tyr His Lys Arg Ser Ala Val Thr
130 135 140

Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr Tyr Trp Ser Glu Phe Ser

ES 2 731 246 T3

145		150		155		160									
Ile	Pro	Pro	His	Leu	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Glu
				165					170					175	
Arg	Val	Val	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	Leu	Lys	Ser	Phe	Val
			180					185					190		
Leu	Thr	Ser	Val	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg
		195					200					205			
Thr	Gln	Asp	Asn	Ser	Cys	Asn	Phe	Ala	Leu	His	Ala	His	Gly	Gly	Glu
	210					215					220				
Val	Met	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ala
225					230					235					240
His	Ala	Arg	Cys	Gln	Trp	Val	Leu	Arg	Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Leu
			245						250					255	
Ser	Leu	Thr	Phe	Arg	Ser	Phe	Asp	Val	Ala	Pro	Cys	Asp	Glu	Leu	Gly
			260					265					270		
Asn	Asp	Leu	Val	Thr	Val	Tyr	Asp	Thr	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Pro	His
		275					280					285			
Ala	Val	Val	Arg	Leu	Cys	Gly	Thr	Tyr	Pro	Pro	Ser	Tyr	Asn	Leu	Thr
	290					295					300				
Phe	Leu	Ser	Ser	Gln	Asn	Val	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Thr	Asn	Thr
305					310					315					320
Asp	Arg	Arg	His	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Thr	Phe	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys
			325						330					335	
Met	Arg	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Leu	Phe	Ser
			340					345					350		
Ser	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Gly	His	Tyr	Pro	Pro	Asn	Ile	Asp	Cys	Thr	Trp
		355					360					365			
Asn	Ile	Lys	Val	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Arg	Phe	Lys	Leu
	370					375					380				
Phe	Tyr	Leu	Val	Asp	Pro	Asn	Ile	Pro	Leu	Gly	Thr	Cys	Pro	Lys	Asp
385					390					395					400

ES 2 731 246 T3

Tyr	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Glu	Arg	Tyr	Cys	Gly	Glu	Lys	Ser	Gln	Phe	
				405					410					415		
Val	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Lys	Ile	Thr	Val	Arg	Phe	His	Ser	Asp	
			420					425					430			
His	Ser	Tyr	Thr	Asp	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Asp	
		435					440					445				
Ser	Asn	Asp	Pro	Cys	Pro	Gly	Met	Phe	Met	Cys	Asn	Thr	Gly	Arg	Cys	
	450					455					460					
Ile	Arg	Lys	Asp	Leu	Arg	Cys	Asp	Gly	Trp	Ala	Asp	Cys	Pro	Asp	Tyr	
465					470					475					480	
Ser	Asp	Glu	His	Phe	Cys	Arg	Cys	Asn	Thr	Thr	His	Gln	Phe	Met	Cys	
				485					490					495		
Lys	Asn	Lys	Leu	Cys	Lys	Pro	Leu	Phe	Trp	Val	Cys	Asp	Asn	Ile	Asn	
			500					505					510			
Asp	Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Glu	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Ala	Glu	
		515					520					525				
Thr	Phe	Lys	Cys	Ser	Asn	Gly	Lys	Cys	Leu	Pro	Gln	Ser	Gln	Lys	Cys	
	530					535					540					
Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Ser	Cys	Asp	
545				550						555					560	
Arg	Val	Lys	Val	Val	Ser	Cys	Thr	Lys	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Cys	His	Asn	
				565					570					575		
Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Gly	Lys	Lys	Asp	
			580					585					590			
Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Lys	Asn	Cys	Asp	Cys	Gly	Leu	Arg	Ser	
		595					600					605				
Phe	Thr	Lys	Gln	Ala	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Thr	Asn	Ala	Asp	Glu	Gly	
	610					615					620					
Glu	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	His	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	His	Leu	
625					630					635					640	
Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asn	Trp	Leu	Val	Ser	Ala	Ala	His	
				645					650					655		

ES 2 731 246 T3

Cys Phe Met Asp Asp Arg Asn Phe Lys Tyr Ser Asp His Thr Lys Trp
660 665 670

Thr Ala Phe Leu Gly Leu Leu Asp Gln Ser Lys Arg Ser Ser Thr Gly
675 680 685

Val Gln Glu His Lys Leu Lys Arg Ile Ile Thr His Pro Leu Phe Asn
690 695 700

Glu Ile Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro
705 710 715 720

Ala Glu Tyr Ser Thr Val Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Thr Thr
725 730 735

His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
740 745 750

Thr Gln Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
755 760 765

Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asp Leu Met Pro Gln Gln Ile
770 775 780

Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
785 790 795 800

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Thr Glu Gly
805 810 815

Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln
820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Ala Val Arg Asp Trp
835 840 845

Ile Lys Glu Gln Thr Gly Val
850 855

<210> 2

<211> 855

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe
1 5 10 15

ES 2 731 246 T3

Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Tyr	Asn	Ser	Arg	His	Glu	Lys	Val	Asn	Gly	Leu	20	25	30	
Glu	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Pro	Val	Asn	Asn	Val	Lys	Lys	Val	Glu	35	40	45	
Lys	His	Gly	Pro	Gly	Arg	Trp	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Gly	50	55	60	
Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Phe	Leu	Val	Trp	His	Leu	Gln	65	70	75	80
Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Gln	Lys	Val	Phe	Asn	Gly	Tyr	Met	Arg	Ile	85	90	95	
Thr	Asn	Glu	Asn	Phe	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Glu	100	105	110	
Phe	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Tyr	115	120	125	
Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Leu	Gly	Pro	Tyr	His	Lys	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	130	135	140	
Ala	Phe	Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Glu	Phe	Ser	145	150	155	160
Ile	Pro	Gln	His	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Met	Ala	Glu	Glu	165	170	175	
Arg	Val	Val	Met	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	180	185	190	
Val	Thr	Ser	Val	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Asp	Ser	Lys	Thr	Val	Gln	Arg	195	200	205	
Thr	Gln	Asp	Asn	Ser	Cys	Ser	Phe	Gly	Leu	His	Ala	Arg	Gly	Val	Glu	210	215	220	
Leu	Met	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asp	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ala	225	230	235	240
His	Ala	Arg	Cys	Gln	Trp	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Leu	245	250	255	
Ser	Leu	Thr	Phe	Arg	Ser	Phe	Asp	Leu	Ala	Ser	Cys	Asp	Glu	Arg	Gly	260	265	270	

ES 2 731 246 T3

Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu Ser Pro Met Glu Pro His
 275 280 285
 Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro Pro Ser Tyr Asn Leu Thr
 290 295 300
 Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile Thr Leu Ile Thr Asn Thr
 305 310 315 320
 Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr Phe Phe Gln Leu Pro Arg
 325 330 335
 Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys Ala Gln Gly Thr Phe Asn
 340 345 350
 Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asp Cys Thr Trp
 355 360 365
 Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Arg Phe Lys Phe
 370 375 380
 Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
 405 410 415
 Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp
 420 425 430
 Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp
 435 440 445
 Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys
 450 455 460
 Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys
 485 490 495
 Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510
 Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln

ES 2 731 246 T3

515					520					525					
Thr	Phe	Arg	Cys	Ser	Asn	Gly	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Ser	Gln	Gln	Cys
530						535					540				
Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Ser	Cys	Pro
545					550					555					560
Lys	Val	Asn	Val	Val	Thr	Cys	Thr	Lys	His	Thr	Tyr	Arg	Cys	Leu	Asn
				565					570					575	
Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Gly	Lys	Glu	Asp
			580					585					590		
Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Lys	Asp	Cys	Asp	Cys	Gly	Leu	Arg	Ser
		595					600					605			
Phe	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Ala	Asp	Glu	Gly
610						615					620				
Glu	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	His	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	His	Ile
625					630					635					640
Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asn	Trp	Leu	Val	Ser	Ala	Ala	His
				645					650					655	
Cys	Tyr	Ile	Asp	Asp	Arg	Gly	Phe	Arg	Tyr	Ser	Asp	Pro	Thr	Gln	Trp
			660					665					670		
Thr	Ala	Phe	Leu	Gly	Leu	His	Asp	Gln	Ser	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly
		675					680					685			
Val	Gln	Glu	Arg	Arg	Leu	Lys	Arg	Ile	Ile	Ser	His	Pro	Phe	Phe	Asn
	690					695					700				
Asp	Phe	Thr	Phe	Asp	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Pro
705					710					715					720
Ala	Glu	Tyr	Ser	Ser	Met	Val	Arg	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Asp	Ala	Ser
				725					730					735	
His	Val	Phe	Pro	Ala	Gly	Lys	Ala	Ile	Trp	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	His
			740					745					750		
Thr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Leu	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile
		755					760					765			

ES 2 731 246 T3

Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile
770 775 780

Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
785 790 795 800

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly
805 810 815

Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln
820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp
835 840 845

Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val
850 855

<210> 3

<211> 855

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Gly Ser Gln Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Ala Asn Asn Ala Lys Lys Val Glu
35 40 45

Lys Arg Gly Pro Arg Arg Trp Val Val Leu Val Ala Val Leu Phe Ser
50 55 60

Phe Leu Leu Leu Ser Leu Met Ala Gly Leu Leu Val Trp His Phe His
65 70 75 80

Tyr Arg Asn Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly His Leu Arg Ile
85 90 95

Thr Asn Glu Ile Phe Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Thr Ser Thr Glu
100 105 110

Phe Ile Ser Leu Ala Ser Gln Val Lys Glu Ala Leu Lys Leu Leu Tyr
115 120 125

ES 2 731 246 T3

Asn	Glu	Val	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Tyr	His	Lys	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	130	135	140
Ala	Phe	Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Glu	Phe	Ser	145	150	155
Ile	Pro	Pro	His	Leu	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Glu	165	170	175
Arg	Val	Val	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	180	185	190
Leu	Thr	Ser	Val	Val	Ala	Phe	Pro	Ile	Asp	Pro	Arg	Met	Leu	Gln	Arg	195	200	205
Thr	Gln	Asp	Asn	Ser	Cys	Ser	Phe	Ala	Leu	His	Ala	His	Gly	Ala	Ala	210	215	220
Val	Thr	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ala	225	230	235
His	Ala	Arg	Cys	Gln	Trp	Val	Leu	Arg	Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Leu	245	250	255
Ser	Leu	Thr	Phe	Arg	Ser	Phe	Asp	Val	Ala	Pro	Cys	Asp	Glu	His	Gly	260	265	270
Ser	Asp	Leu	Val	Thr	Val	Tyr	Asp	Ser	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Pro	His	275	280	285
Ala	Val	Val	Arg	Leu	Cys	Gly	Thr	Phe	Ser	Pro	Ser	Tyr	Asn	Leu	Thr	290	295	300
Phe	Leu	Ser	Ser	Gln	Asn	Val	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Thr	Asn	Thr	305	310	315
Asp	Arg	Arg	His	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Thr	Phe	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys	325	330	335
Met	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Asp	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	340	345	350
Ser	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Gly	His	Tyr	Pro	Pro	Asn	Ile	Asn	Cys	Thr	Trp	355	360	365
Asn	Ile	Lys	Val	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Arg	Phe	Lys	Leu	370	375	380

ES 2 731 246 T3

Phe Tyr Leu Val Asp Pro Asn Val Pro Val Gly Ser Cys Thr Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
 405 410 415
 Val Val Ser Ser Asn Ser Ser Lys Ile Thr Val His Phe His Ser Asp
 420 425 430
 His Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp
 435 440 445
 Ser Asn Asp Pro Cys Pro Gly Met Phe Met Cys Lys Thr Gly Arg Cys
 450 455 460
 Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Pro Asp Tyr
 465 470 475 480
 Ser Asp Glu Arg Tyr Cys Arg Cys Asn Ala Thr His Gln Phe Thr Cys
 485 490 495
 Lys Asn Gln Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510
 Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gly
 515 520 525
 Ser Phe Lys Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Pro Gln Ser Gln Lys Cys
 530 535 540
 Asn Gly Lys Asp Asn Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Asp
 545 550 555 560
 Ser Val Asn Val Val Ser Cys Thr Lys Tyr Thr Tyr Arg Cys Gln Asn
 565 570 575
 Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Thr Asp
 580 585 590
 Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 595 600 605
 Phe Thr Lys Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asn Ala Asp Glu Gly
 610 615 620
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Leu
 625 630 635 640

ES 2 731 246 T3

Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asp Trp Leu Val Ser Ala Ala His
645 650 655

Cys Phe Gln Asp Asp Lys Asn Phe Lys Tyr Ser Asp Tyr Thr Met Trp
660 665 670

Thr Ala Phe Leu Gly Leu Leu Asp Gln Ser Lys Arg Ser Ala Ser Gly
675 680 685

Val Gln Glu Leu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Thr His Pro Ser Phe Asn
690 695 700

Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ser
705 710 715 720

Val Glu Tyr Ser Thr Val Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Thr
725 730 735

His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
740 745 750

Thr Lys Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
755 760 765

Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asp Leu Met Pro Gln Gln Ile
770 775 780

Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
785 790 795 800

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Asp Gly
805 810 815

Arg Met Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln
820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Val Val Arg Asp Trp
835 840 845

Ile Lys Glu His Thr Gly Val
850 855

<210> 4

<211> 855

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

ES 2 731 246 T3

Met Gly Asn Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Gly Ser Gln Asp Phe
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
 20 25 30
 Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Ala Lys Gln Val Glu
 35 40 45
 Lys Arg Gly Pro Arg Arg Trp Val Val Met Val Ala Val Val Phe Ser
 50 55 60
 Phe Leu Leu Leu Ser Leu Met Ala Gly Leu Leu Val Trp His Phe His
 65 70 75 80
 Tyr Arg Asn Val Arg Ile Gln Lys Val Phe Asn Gly His Leu Arg Ile
 85 90 95
 Thr Asn Glu Asn Phe Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Thr Ser Thr Glu
 100 105 110
 Phe Ile Ser Leu Ala Ser Gln Val Lys Glu Ala Leu Lys Leu Met Tyr
 115 120 125
 Ser Glu Val Pro Val Leu Gly Pro Tyr His Lys Lys Ser Thr Val Thr
 130 135 140
 Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr Tyr Trp Ser Glu Phe Ser
 145 150 155 160
 Ile Pro Pro His Leu Glu Glu Glu Val Asp Arg Ala Met Ala Val Glu
 165 170 175
 Arg Val Val Thr Leu Pro Pro Arg Ala Arg Ala Leu Lys Ser Phe Val
 180 185 190
 Leu Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Ile Asp Pro Arg Met Leu Gln Arg
 195 200 205
 Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Ala Leu His Ala Arg Gly Arg Thr
 210 215 220
 Val Thr Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro Asn Ser Pro Tyr Pro Ala
 225 230 235 240
 His Ala Arg Cys Gln Trp Val Leu Arg Gly Asp Ala Asp Ser Val Leu

ES 2 731 246 T3

245	250	255
Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Val Ala Pro Cys Asp Gly His Asp 260 265 270		
Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asp Ser Leu Ser Pro Met Glu Pro His 275 280 285		
Ala Val Val Arg Leu Cys Gly Thr Phe Ser Pro Ser Tyr Asn Leu Thr 290 295 300		
Phe Leu Ser Ser Gln Asn Val Phe Leu Val Thr Leu Ile Thr Asn Thr 305 310 315 320		
Asp Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr Phe Phe Gln Leu Pro Lys 325 330 335		
Met Ser Ser Cys Gly Gly Leu Leu Ser Glu Ala Gln Gly Thr Phe Ser 340 345 350		
Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asn Cys Thr Trp 355 360 365		
Asn Ile Lys Val Pro Asn Asn Arg Asn Val Lys Val Arg Phe Lys Leu 370 375 380		
Phe Tyr Leu Val Asp Pro Asn Ile Pro Val Gly Ser Cys Thr Lys Asp 385 390 395 400		
Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Phe Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe 405 410 415		
Val Val Ser Ser Asn Ser Ser Lys Ile Thr Val His Phe His Ser Asp 420 425 430		
His Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp 435 440 445		
Ser Asn Asp Pro Cys Pro Gly Met Phe Met Cys Lys Thr Gly Arg Cys 450 455 460		
Ile Arg Lys Asp Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Pro Asp Tyr 465 470 475 480		
Ser Asp Glu Arg His Cys Arg Cys Asn Ala Thr His Gln Phe Met Cys 485 490 495		

ES 2 731 246 T3

Lys Asn Gln Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510
 Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gly
 515 520 525
 Ser Phe Lys Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Pro Gln Ser Gln Gln Cys
 530 535 540
 Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Asp
 545 550 555 560
 Asn Val Asn Ala Val Ser Cys Thr Lys Tyr Thr Tyr Arg Cys Gln Asn
 565 570 575
 Gly Leu Cys Leu Asn Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Lys Asp
 580 585 590
 Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 595 600 605
 Phe Thr Lys Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asn Ala Asp Glu Gly
 610 615 620
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Leu
 625 630 635 640
 Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asp Trp Leu Val Ser Ala Ala His
 645 650 655
 Cys Phe Gln Asp Glu Thr Ile Phe Lys Tyr Ser Asp His Thr Met Trp
 660 665 670
 Thr Ala Phe Leu Gly Leu Leu Asp Gln Ser Lys Arg Ser Ala Ser Gly
 675 680 685
 Val Gln Glu His Lys Leu Lys Arg Ile Ile Thr His Pro Ser Phe Asn
 690 695 700
 Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro
 705 710 715 720
 Ala Glu Tyr Ser Thr Val Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Asn Thr
 725 730 735
 His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
 740 745 750

ES 2 731 246 T3

Thr Lys Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
755 760 765

Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Glu Leu Leu Pro Gln Gln Ile
770 775 780

Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
785 790 795 800

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Lys Asp Gly
805 810 815

Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln
820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Ile Pro Glu Val Arg Asp Trp
835 840 845

Ile Lys Glu Gln Thr Gly Val
850 855

<210> 5

<211> 855

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<220>

<221> característica_misc

<222> (561)..(561)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Gly Leu
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Val Lys Lys Val Glu
35 40 45

Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu Ala Ala Val Leu Ile Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Trp His Leu Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly Tyr Met Arg Ile

ES 2 731 246 T3

85										90					95				
Thr	Asn	Glu	Asn	Phe	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Glu				
			100					105						110					
Phe	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Tyr				
		115					120					125							
Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Leu	Gly	Pro	Tyr	His	Lys	Glu	Ser	Ala	Val	Thr				
	130					135					140								
Ala	Phe	Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Glu	Phe	Ser				
145					150					155					160				
Ile	Pro	Gln	His	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Met	Ala	Glu	Glu				
				165					170					175					
Arg	Val	Val	Met	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val				
			180					185						190					
Val	Thr	Ser	Val	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Asp	Ser	Lys	Thr	Val	Gln	Arg				
		195					200					205							
Thr	Gln	Asp	Asn	Ser	Cys	Ser	Phe	Gly	Leu	His	Ala	Arg	Gly	Val	Glu				
	210					215					220								
Leu	Met	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asp	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ala				
225					230					235					240				
His	Ala	Arg	Cys	Gln	Trp	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Leu				
				245					250					255					
Ser	Leu	Thr	Phe	Arg	Ser	Phe	Asp	Leu	Ala	Ser	Cys	Asp	Glu	Arg	Gly				
			260					265					270						
Ser	Asp	Leu	Val	Met	Val	Tyr	Asn	Thr	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Pro	His				
		275					280					285							
Ala	Leu	Val	Gln	Leu	Cys	Gly	Thr	Tyr	Pro	Pro	Ser	Tyr	Asn	Leu	Thr				
	290					295					300								
Phe	His	Ser	Ser	Gln	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Thr	Asn	Thr				
305					310					315					320				
Arg	Arg	Arg	His	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Thr	Phe	Phe	Gln	Leu	Pro	Arg				
				325					330					335					

ES 2 731 246 T3

Met Arg Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys Ala Gln Gly Thr Phe Asn
 340 345 350
 Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asp Cys Thr Trp
 355 360 365
 Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Arg Phe Lys Phe
 370 375 380
 Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
 405 410 415
 Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp
 420 425 430
 Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Val Ser Tyr Asp
 435 440 445
 Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys
 450 455 460
 Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Ser His Gln Phe Thr Cys
 485 490 495
 Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510
 Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln
 515 520 525
 Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys
 530 535 540
 Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 545 550 555 560
 Xaa Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn
 565 570 575
 Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp
 580 585 590

ES 2 731 246 T3

Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 595 600 605
 Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly
 610 615 620
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile
 625 630 635 640
 Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His
 645 650 655
 Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp
 660 665 670
 Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly
 675 680 685
 Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn
 690 695 700
 Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro
 705 710 715 720
 Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser
 725 730 735
 His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
 740 745 750
 Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
 755 760 765
 Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile
 770 775 780
 Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
 785 790 795 800
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly
 805 810 815
 Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln
 820 825 830
 Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp
 835 840 845
 Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val
 850 855

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Matriptasa/MT-SP1 - Secuencia sentido de ARNip

<400> 6
gcaagaucac uguucgcuut t 21

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Matriptasa/MT-SP1 - Secuencia antisentido de ARNip

<400> 7
aagcgaacag ugaucuugct g 21

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> C1ra - Secuencia sentido de ARNip

<400> 8
gaugucuuuu cucaaaauat t 21

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> C1ra - Secuencia antisentido de ARNip

<400> 9
uauuuugaga aaagacauca t 21

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gm5077 - Secuencia sentido de ARNip

<400> 10
cgcugaacgu gugauuuuut t 21

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gm5077 - Secuencia antisentido de ARNip

<400> 11

aauaaucaca cguucagcgg t	21
<210> 12	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Plat - Secuencia sentido de ARNip	
<400> 12	
gaaacaagau gaagacagat t	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Plat - Secuencia antisentido de ARNip	
<400> 13	
ucugucuuca ucuuguuucc c	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Prss35 - Secuencia sentido de ARNip	
<400> 14	
ggccuuagac uacgacuaut t	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Prss35 - Secuencia antisentido de ARNip	
<400> 15	
auagucguag ucuaaggccg g	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Matriptasa/MT-SP1 - Secuencia de cebador directo	
<400> 16	
cgctgagtac ctgtcctacg a	21
<210> 17	

<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Matriptasa/MT-SP1 - Secuencia de cebador inverso	
<400> 17	
accgtccagt gttacacatg aac	23
<210> 18	
<211> 16	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Matriptasa/MT-SP1 - Secuencia del indicador 1	
<400> 18	
ccaatgaccc atgccc	16
<210> 19	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> C1ra - Secuencia de cebador directo	
<400> 19	
acctgcaaac aaggctacca	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> C1ra - Secuencia de cebador inverso	
<400> 20	
tggcaaacag ctgtgaagga	20
<210> 21	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> C1ra - Secuencia del indicador 1	
<400> 21	
cagcacctgg tttcc	15
<210> 22	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	

<220>	
<223> Gm5077 - Secuencia de cebador directo	
<400> 22	
tgcgaggagc catattacta catg	24
<210> 23	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Gm5077 - Secuencia de cebador inverso	
<400> 23	
gcagcgcagc gatactc	17
<210> 24	
<211> 16	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Gm5077 - Secuencia del indicador 1	
<400> 24	
ccgccgtgtt cttcat	16
<210> 25	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Plat - Secuencia de cebador directo	
<400> 25	
agctgacatg ggaatactgt gatg	24
<210> 26	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Plat - Secuencia de cebador inverso	
<400> 26	
cctttaattc gaaactgtgg ctgtt	25
<210> 27	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Plat - Secuencia del indicador 1	

<400> 27 ccgtgctcca cctgc	15
<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Prss35 - Secuencia de cebador directo	
<400> 28 aggagagcac cacacaaaga c	21
<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Prss35 - Secuencia de cebador inverso	
<400> 29 acacgagtcc actggaagga	20
<210> 30 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Prss35 - Secuencia del indicador 1	
<400> 30 ccccggaccc ctcctg	16
<210> 31 <211> 345 <212> ADN <213> Cricetulus griseus	
<400> 31 ttttttgcc agtcctgggt cttccaaact cacaggtgtc actgaacctc cggggctggg	60
aagctattgt cggggagcgt ctctgagtc tgaatatct ttctgtttag aacatgaatg	120
gctttgagga ggggtgtggag tttctgcctg tgaataatgc caagaaagtg gagaagcgag	180
gcccccgagg ctgtgtgggtg cttgtggtcc tgctggtcag tttcctcttt ctctcactcg	240
tggctggcct cctgggtgtgg cacttcctct gtgagtacag tgggggctgt gggagggcga	300
cagaggggta gtgttctctc ttctctcaga ggacagacca aaggg	345
<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220>	

<223> Secuencia de cebador directo

<400> 32

ttttttgccc agtcctgggtt

20

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador inverso

<400> 33

ccctttgggtc tgcctctga

20

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de corte

<400> 34

gtggagtttc tgcctgtgaa

20

<210> 35

<211> 160

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 35

aacatgaatg gctttgagga ggggtgtggag tttctgcctg tgaataatgc caagaaagtg 60

gagaagcgag gccccggcg ctgtgtggtg cttgtgggtcc tgctggtcag tttcctcttt 120

ctctcaactg tggtgtggctt cctggtgtgg cacttctctt 160

<210> 36

<211> 156

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 36

aacatgaatg gctttgagga ggggtgtggag ttctgtgaa taatgccaaag aaagtggaga 60

agcgaggccc ccggcgctgt gtgggtgctt tggtcctgct ggtcagtttc ctctttctct 120

cactcgtggc tggcttctct gtgtggcaact tctctt 156

<210> 37

<211> 156

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 37

ES 2 731 246 T3

aacatgaatg gctttgagga ggggtgtggag tttctgtgaa taatgccaaag aaagtggaga	60	
agcgaggccc ccggcgctgt gtgggtgcttg tggctctgct ggtcagtttc ctctttctct	120	
cactcgtggc tggcttcctg gtgtggcact tcctct	156	
<210> 38		
<211> 143		
<212> ADN		
<213> Cricetulus griseus		
<400> 38		
aacatgaatg gctttgagga ggggtgaataa tgccaagaaa gtggagaagc gagggccccc	60	
gcgctgtgtg gtgcttgtgg tcctgctggt cagtttcttc tttctctcac tcgtggctgg	120	
cttcctggtg tggcacttcc tct	143	
<210> 39		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Cricetulus griseus		
<400> 39		
tggagtttct gcctgtg		17
<210> 40		
<211> 146		
<212> ADN		
<213> Cricetulus griseus		
<400> 40		
aacatgaatg gctttgagga ggggtgtggaa taatgccaaag aaagtggaga agcgaggccc	60	
ccggcgctgt gtgggtgcttg tggctctgct ggtcagtttc ctctttctct cactcgtggc	120	
tggcttcctg gtgtggcact tcctct	146	
<210> 41		
<211> 14		
<212> ADN		
<213> Cricetulus griseus		
<400> 41		
gtttctgcct gtga		14
<210> 42		
<211> 156		
<212> ADN		
<213> Cricetulus griseus		
<400> 42		
aacatgaatg gctttgagga ggggtgtggag tgcctgtgaa taatgccaaag aaagtggaga	60	
agcgaggccc ccggcgctgt gtgggtgcttg tggctctgct ggtcagtttc ctctttctct	120	
cactcgtggc tggcttcctg gtgtggcact tcctct	156	
<210> 43		
<211> 149		
<212> ADN		

<213> Cricetulus griseus

<400> 43
aacaatgaatg gctttgagga ggggtgtggag taataatgcc aagaaagtgg agaagcgagg 60
ccccccggcgc tgtgtggtgc ttgtggtcct gctggtcagt ttctcttttc tctcactcgt 120
ggctggcttc ctggtgtggc acttcctct 149

<210> 44

<211> 11

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 44
ttctgcctgt g 11

<210> 45

<211> 153

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 45
aacaatgaatg gctttgagga ggggtgtggc ctgtgaataa tgccaagaaa gtggagaagc 60
gaggcccccg gcgctgtgtg gtgcttgtgg tcctgctggc cagtttcctc tttctctcac 120
tcgtggctgg cttcctgggt tggcacttcc tct 153

<210> 46

<211> 145

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 46
aacaatgaatg gctttgagga ggggtgtgaat aatgccaaaga aagtgagaaa gcgaggcccc 60
cggcgctgtg tgggtgcttg ggtcctgctg gtcagtttcc tctttctctc actcgtggct 120
ggcttcctgg tgtggcactt cctct 145

<210> 47

<211> 15

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 47
gagtttctgc ctgtg 15

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 48

ES 2 731 246 T3

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Ala Lys Lys Val Glu
35 40 45

Lys Arg Gly Pro Arg Arg Cys Val Val Leu Val Val Leu Leu Val Ser
50 55 60

Phe Leu Phe Leu Ser Leu Val Ala Gly Phe Leu Val Trp His Phe Leu
65 70 75 80

Tyr Ser Asn Val Arg Ile Gln Lys Val Phe Asn Gly His Leu Arg Val
85 90 95

Thr Asn Glu Asn Phe Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu
100 105 110

Phe Lys Asp Leu Ala Asn Gln Val Lys Glu Ala Leu
115 120

<210> 49

<211> 39

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 49

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu
35

<210> 50

<211> 52

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 50

Ile Met Pro Arg Lys Trp Arg Ser Glu Ala Pro Gly Ala Val Trp Cys
1 5 10 15

Leu Trp Ser Cys Trp Ser Val Ser Ser Phe Ser His Ser Trp Leu Ala
20 25 30

Ser Trp Cys Gly Thr Ser Ser Thr Gln Met Phe Gly Ser Lys Arg Ser
35 40 45

Ser Met Val Ile
50

<210> 51

ES 2 731 246 T3

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 51
 Gly Ser Gln Met Arg Thr Phe Trp Met Pro Met Arg Thr Gln Thr Pro
 1 5 10 15

Gln Ser Ser Lys Thr Trp Pro Thr Arg
 20 25

<210> 52
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 52
 Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
 20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu
 35

<210> 53
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 53
 Ile Met Pro Arg Lys Trp Arg Ser Glu Ala Pro Gly Ala Val Trp Cys
 1 5 10 15

Leu Trp Ser Cys Trp Ser Val Ser Ser Phe Ser His Ser Trp Leu Ala
 20 25 30

Ser Trp Cys Gly Thr Ser Ser Thr Gln Met Phe Gly Ser Lys Arg Ser
 35 40 45

Ser Met Val Ile
 50

<210> 54
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 54
 Gly Ser Gln Met Arg Thr Phe Trp Met Pro Met Arg Thr Gln Thr Pro
 1 5 10 15

Gln Ser Ser Lys Thr Trp Pro Thr Arg
 20 25

<210> 55
 <211> 36

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 55

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Glu
35

<210> 56

<211> 55

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 56

Cys Gln Glu Ser Gly Glu Ala Arg Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Gln Phe Pro Leu Ser Leu Thr Arg Gly Trp Leu Pro
20 25 30

Gly Val Ala Leu Pro Leu Leu Lys Cys Ser Asp Pro Lys Gly Leu Gln
35 40 45

Trp Ser Ser Glu Gly His Lys
50 55

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 57

Glu Leu Ser Gly Cys Leu
1 5

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 58

Glu Leu Lys Leu His Arg Val Gln Arg Pro Gly Gln Pro Gly Glu Gly
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Val Val Gln
20

<210> 59

<211> 37

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 59

ES 2 731 246 T3

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu
35

<210> 60

<211> 55

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 60

Cys Gln Glu Ser Gly Glu Ala Arg Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Gln Phe Pro Leu Ser Leu Thr Arg Gly Trp Leu Pro
20 25 30

Gly Val Ala Leu Pro Leu Leu Lys Cys Ser Asp Pro Lys Gly Leu Gln
35 40 45

Trp Ser Ser Glu Gly His Lys
50 55

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 61

Glu Leu Ser Gly Cys Leu
1 5

<210> 62

<211> 23

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 62

Glu Leu Lys Leu His Arg Val Gln Arg Pro Gly Gln Pro Gly Glu Gly
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Val Val Gln
20

<210> 63

<211> 39

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 63

ES 2 731 246 T3

Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Cys Leu
35

<210> 64
<211> 52
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 64
Ile Met Pro Arg Lys Trp Arg Ser Glu Ala Pro Gly Ala Val Trp Cys
1 5 10 15

Leu Trp Ser Cys Trp Ser Val Ser Ser Phe Ser His Ser Trp Leu Ala
20 25 30

Ser Trp Cys Gly Thr Ser Ser Thr Gln Met Phe Gly Ser Lys Arg Ser
35 40 45

Ser Met Val Ile
50

<210> 65
<211> 25
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 65
Gly Ser Gln Met Arg Thr Phe Trp Met Pro Met Arg Thr Gln Thr Pro
1 5 10 15

Gln Ser Ser Lys Thr Trp Pro Thr Arg
20 25

<210> 66
<211> 37
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 66
Met Gly Ser Asn Arg Gly Arg Lys Ala Gly Gly Ser Ser Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Ala Arg Leu Lys Tyr Ser Ser Gly Leu Glu Asn Met Asn Gly Phe
20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu
35

<210> 67
<211> 55

ES 2 731 246 T3

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 67

Cys Gln Glu Ser Gly Glu Ala Arg Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Gln Phe Pro Leu Ser Leu Thr Arg Gly Trp Leu Pro
20 25 30

Gly Val Ala Leu Pro Leu Leu Lys Cys Ser Asp Pro Lys Gly Leu Gln
35 40 45

Trp Ser Ser Glu Gly His Lys
50 55

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 68

Glu Leu Ser Gly Cys Leu
1 5

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 69

Glu Leu Lys Leu His Arg Val Gln Arg Pro Gly Gln Pro Gly Glu Gly
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Val Val Gln
20

REIVINDICACIONES

1. Una célula de vertebrado aislada adecuada para la expresión recombinante de un polipéptido de interés, donde la célula de vertebrado se altera para debilitar el efecto de la matriptasa, donde el efecto de la matriptasa se debilita porque la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en dicha célula mediante expresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores, y donde la célula de vertebrado comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de interés, donde la célula de vertebrado secreta el polipéptido de interés.
2. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde el genoma de la célula de vertebrado se altera para debilitar la función de la proteasa endógena matriptasa y/o donde al menos una o todas las copias del gen de la matriptasa se eliminan o desactivan funcionalmente.
3. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene una o más de las siguientes características
 - a) la célula de vertebrado comprende una o más mutaciones en al menos una copia o todas las copias del gen de la matriptasa para proporcionar un producto de expresión no funcional o menos funcional; y/o
 - b) la célula de vertebrado comprende una o más mutaciones en el promotor, en 5'UTR, 3'UTR y/u otros elementos reguladores del gen de la matriptasa.
4. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha una o más mutaciones están comprendidas en una región codificante del gen de la matriptasa y dan como resultado un producto de expresión no funcional o menos funcional, donde opcionalmente dicha una o más mutaciones están comprendidas en una secuencia de polinucleótido del gen de la matriptasa que codifica el exón 2 de la matriptasa o donde dicha una o más mutaciones están comprendidas en una secuencia de polinucleótido del gen de la matriptasa que codifica al menos parte del dominio catalítico de la matriptasa con lo que se obtiene un producto de expresión no funcional o menos funcional.
5. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, donde la matriptasa endógena no alterada comparte al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 1 a 5 como proteína de referencia de la matriptasa y presenta la misma actividad proteolítica que dicha proteína de referencia de la matriptasa.
6. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, donde la célula de vertebrado tiene una o más de las siguientes características:
 - a) la célula de vertebrado es una célula de mamífero;
 - b) la célula de vertebrado es una célula humana;
 - c) la célula de vertebrado es una célula de roedor;
 - d) la célula de vertebrado es una célula de hámster;
 - e) la célula de vertebrado es una célula CHO; y/o
 - f) la célula de vertebrado es una célula de mamífero proporcionada como clon celular o línea celular.
7. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde la célula de vertebrado es una célula CHO que comprende una o más mutaciones de desplazamiento del marco en el exón 2 de uno o ambos alelos del gen de la matriptasa.
8. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, donde el polipéptido de interés tiene una o más de las siguientes características:
 - a) es un polipéptido terapéuticamente activo o de diagnóstico;
 - b) es sensible al *clipping* por acción de las proteasas;
 - c) comprende al menos un sitio de *clipping* para la matriptasa;
 - d) es un glicopolipéptido; y/o
 - e) se selecciona del grupo constituido por glicoproteínas, anticuerpos, proteínas que no son IgG, proteínas de fusión-Fc, fragmentos Fab, complejos proteicos, peptidasas, péptidos señal, nanocuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, factores sanguíneos y enzimas.
9. La célula de vertebrado aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés se integra en el genoma de dicha célula y donde, opcionalmente, al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable o polipéptido indicador se integra adicionalmente en el genoma de dicha célula.
10. Un método para producir una célula de vertebrado de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende alterar una célula de vertebrado para debilitar el efecto de la matriptasa reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa en dicha célula mediante expresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores, e introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, donde dicho polipéptido de interés es secretado por la célula de vertebrado.

11. Un método para producir de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende
 5 (a) cultivar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9 en unas condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés en el medio de cultivo celular;
 (b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
 (c) opcionalmente procesar el polipéptido aislado de interés.
12. Un método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un polipéptido de interés, que comprende
 10 (a) proporcionar células de vertebrado de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9 como células hospedadoras; y
 (b) seleccionar una o más células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés;
 donde opcionalmente la etapa (a) comprende transfectar células de vertebrado en las que la función de la proteasa endógena matriptasa está debilitada con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés para
 15 proporcionar células hospedadoras de vertebrado de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene una o más de las siguientes características
 20 a) las células de vertebrado son células de mamífero;
 b) dichas células hospedadoras proporcionadas en la etapa (a) comprenden adicionalmente al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador seleccionable y la etapa (b) comprende cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en condiciones selectivas para el marcador seleccionable;
 c) los polinucleótidos se introducen en las células de vertebrado transfectando uno o más vectores de expresión;
 25 d) la etapa (b) comprende un paso de selección o múltiples pasos de selección; y/o
 e) la etapa (b) comprende llevar a cabo una selección basada en citometría de flujo.
14. Método para seleccionar una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés, que comprende analizar si la proteasa endógena matriptasa se expresa de forma funcional en la célula de vertebrado y seleccionar una célula de vertebrado en la cual el efecto de tal matriptasa endógena se debilita mediante la reducción o eliminación de la expresión funcional del gen de la matriptasa mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores para la producción recombinante del polipéptido de interés.
 30
15. Uso de una célula de vertebrado para la producción recombinante de un polipéptido de interés que se secreta a partir de la célula de vertebrado, donde la célula utilizada se altera para debilitar el efecto de la proteasa endógena matriptasa, donde el efecto de la matriptasa se debilita porque la expresión funcional del gen de la matriptasa se reduce o elimina en dicha célula mediante supresión génica, mutación génica, delección génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores.
 35
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde la célula de vertebrado es una célula de vertebrado según se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9.
 40

Fig. 1

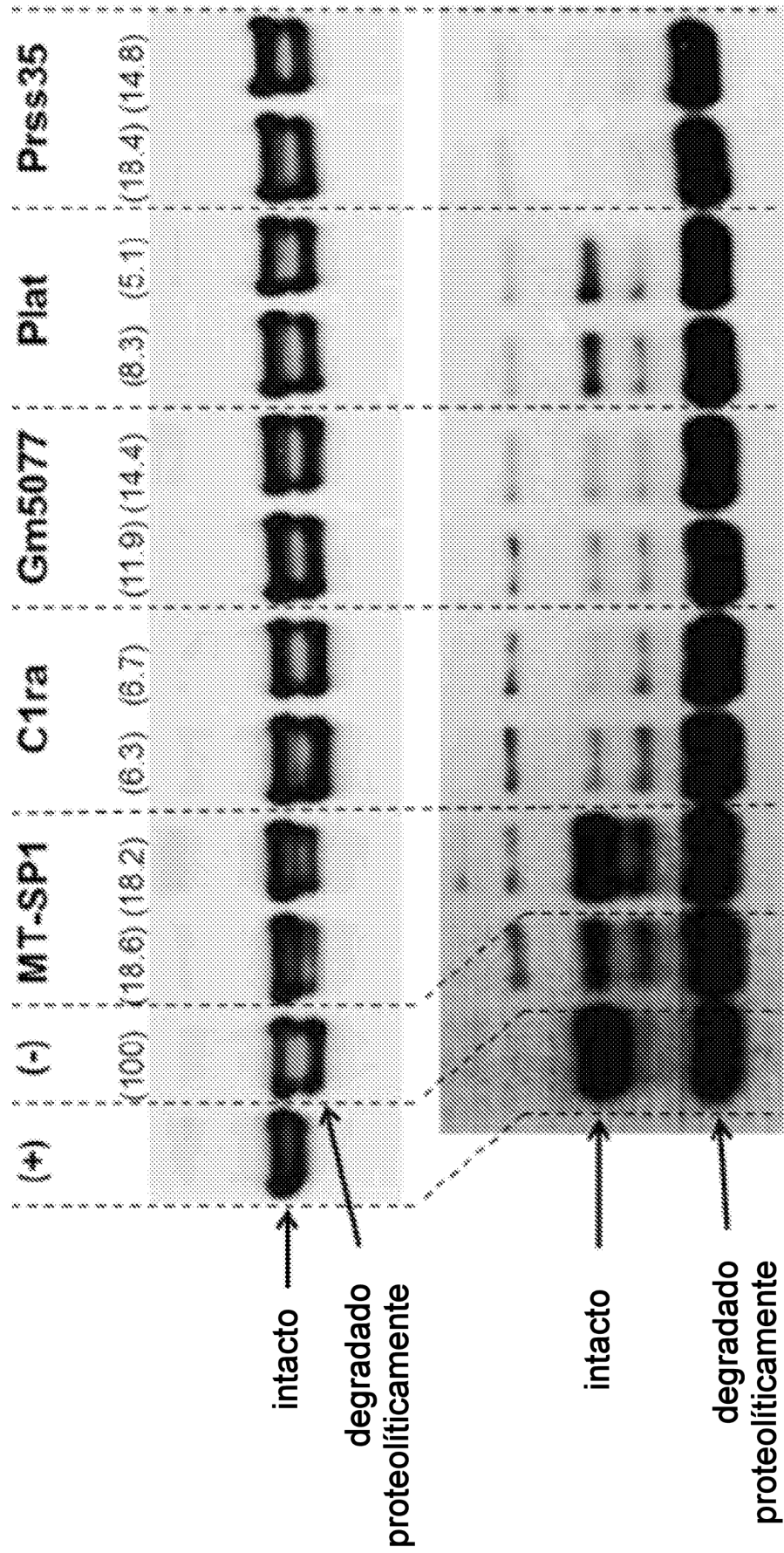


Fig. 2

ttttttgcccagtcctgggtttcttcctccaaactcacaggtgtcactgaacctccggggctgggaagctattgtcggggagcgtctcttgagtcctgaaa
tatctttctgtttagaacatgaatggtctttgaggagggtgtggagtttctgcctgtgaataatgccaaagaaagtgggagaagcgaggccccccggcg
ctgtgtgggtctgtgtggtcctgtggtcagtttccctttctctcactcgtgggtggcttccctgtgtggcacttccctgtgtgagtacagtgggg
gctgtggaggggcgacagaggggtagtgttctctctctctctcagaggacagacccaaaggg

Fig. 3

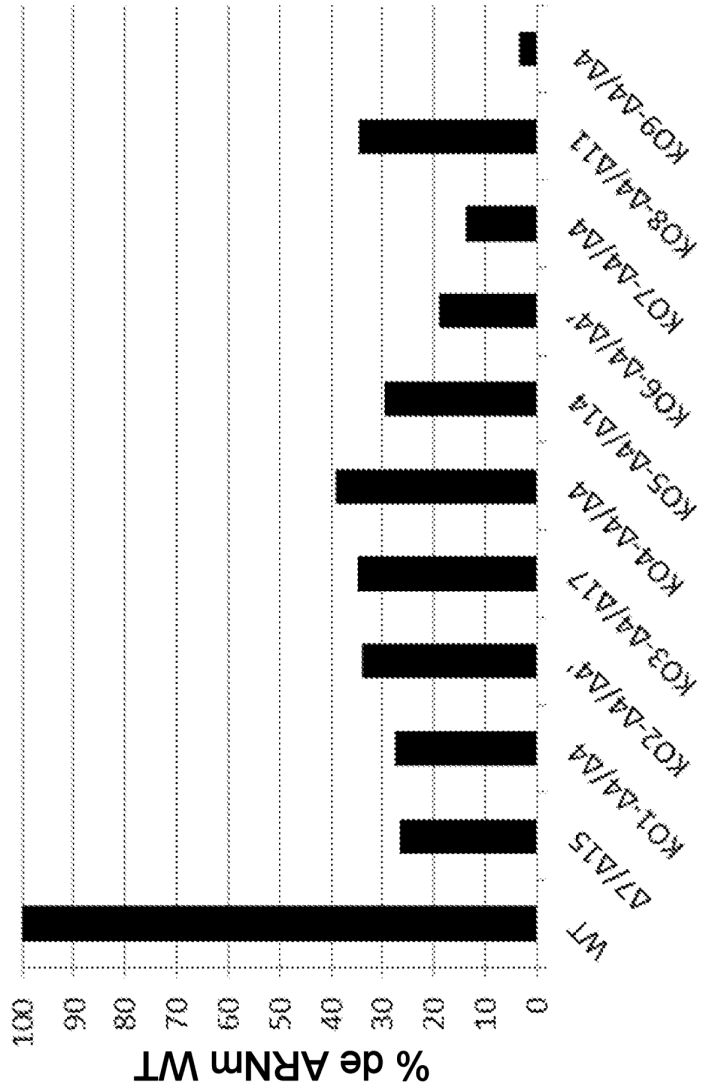


Fig. 4

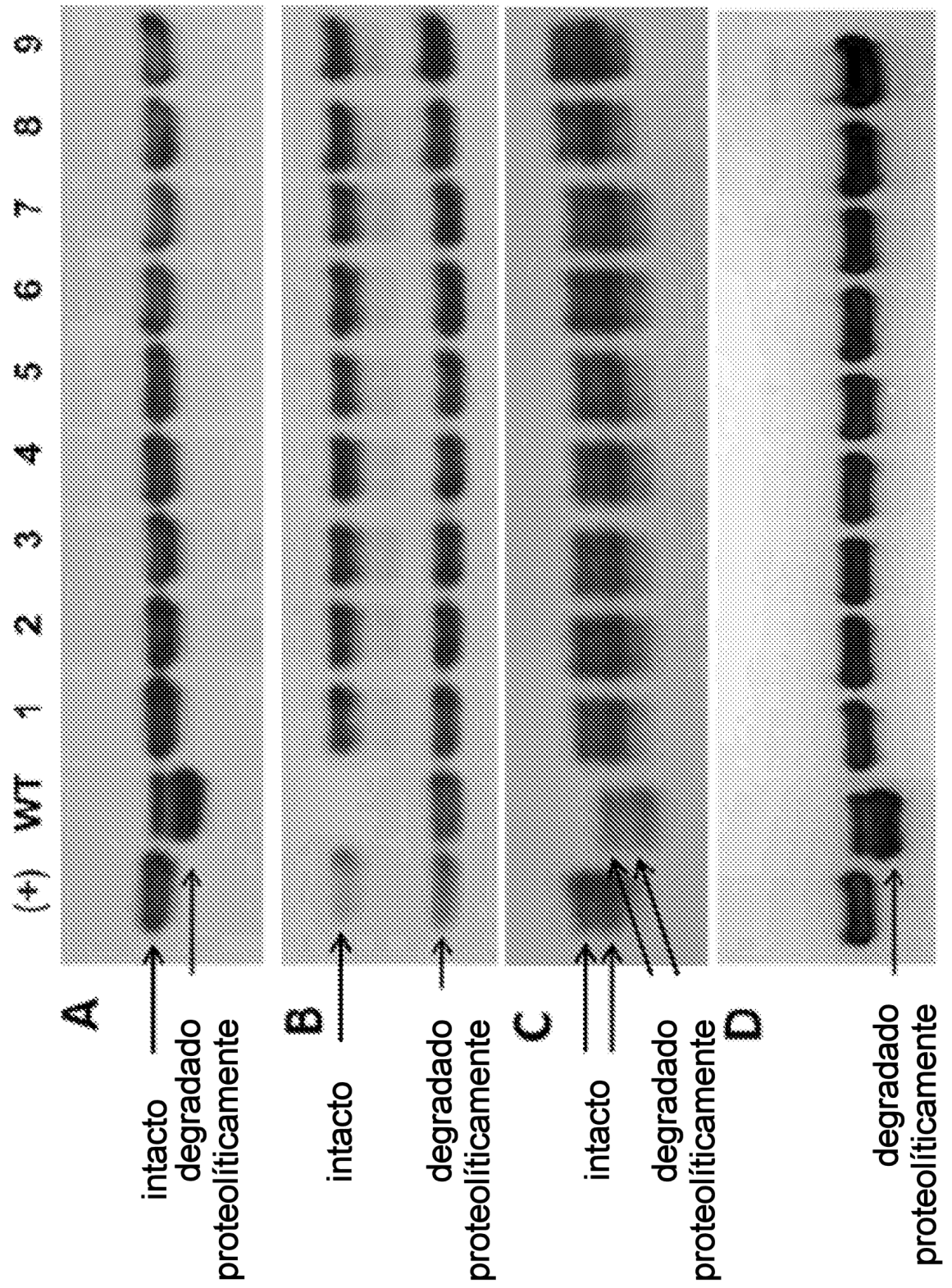


Fig. 5

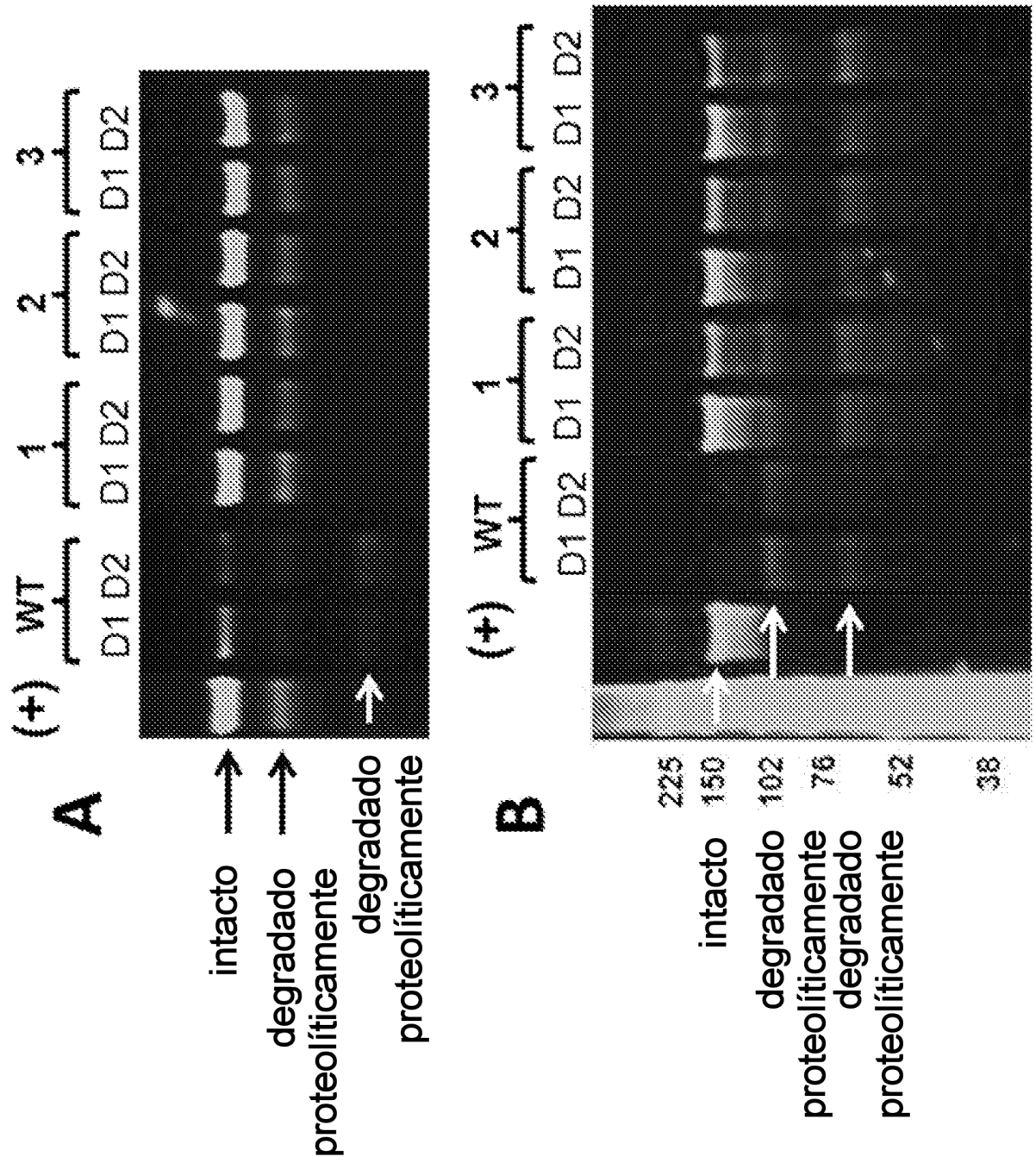


Fig. 6

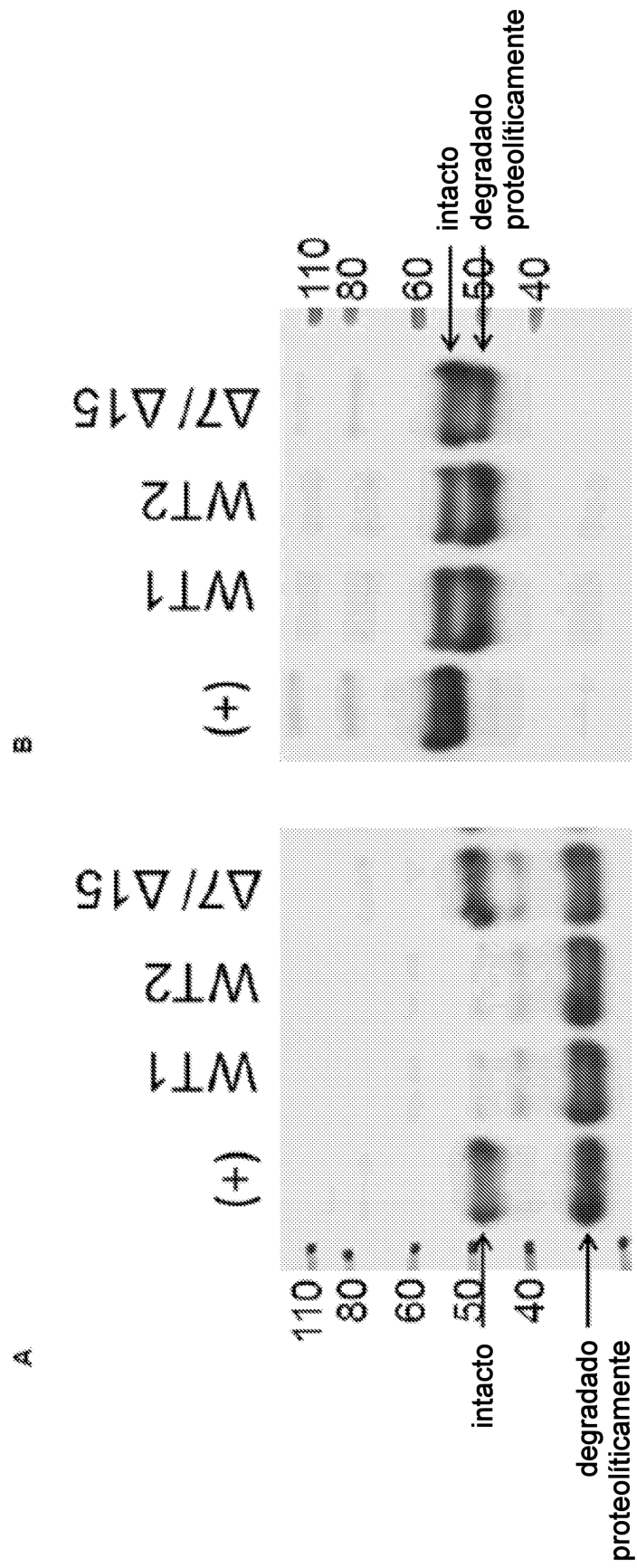


Fig. 7

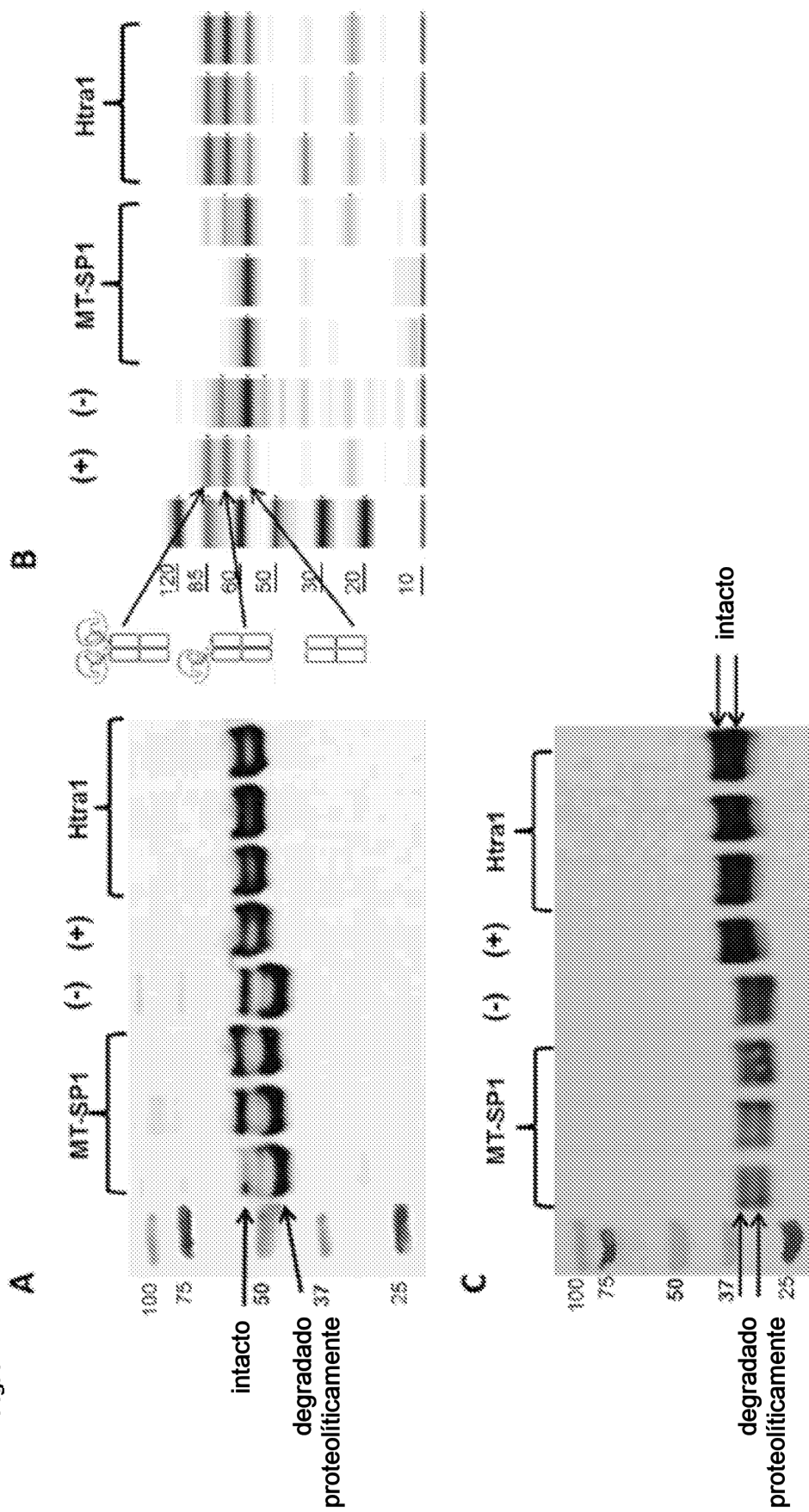


Fig. 8

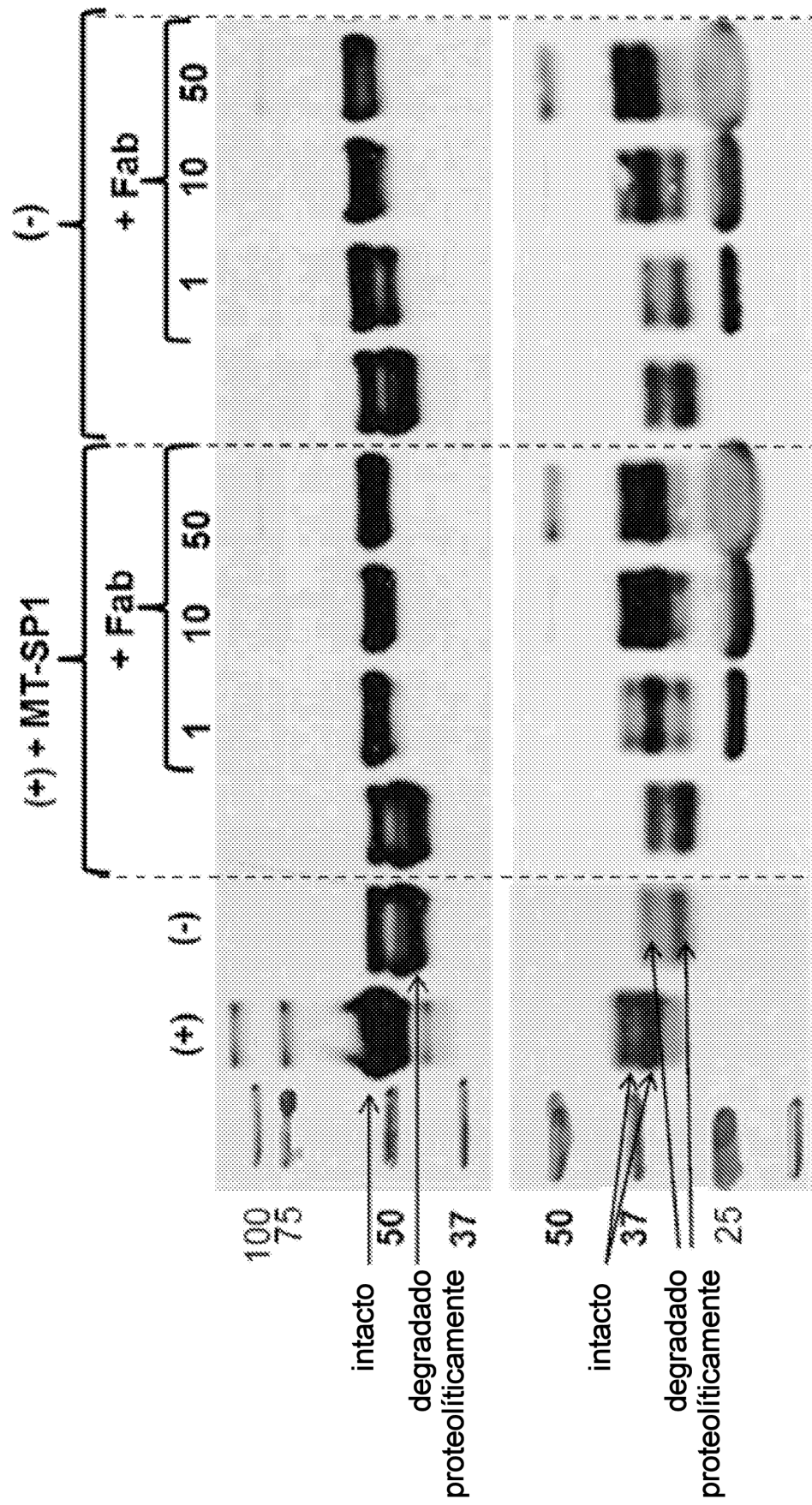


Fig. 9

