

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 641**

51 Int. Cl.:

C07K 14/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/IB2013/060982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14097113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13824203 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2935319**

54 Título: **Producción de proteínas terapéuticas en células de mamífero modificadas genéticamente**

30 Prioridad:

18.12.2012 US 201261738466 P

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

24.01.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FORNARO, MARA;
GLASS, DAVID;
JOSTOCK, THOMAS;
LAUX, HOLGER y
ROMAND, SANDRINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 738 641 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

Producción de proteínas terapéuticas en células de mamífero modificadas genéticamente.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de una proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante en sistemas celulares de mamífero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Existe una necesidad en constante crecimiento de producir proteínas como enzimas, anticuerpos u hormonas para su uso en aplicaciones terapéuticas. Los sistemas de producción de proteínas heterólogas del estado de la técnica utilizados actualmente incluyen sistemas celulares procariontes y eucariontes como *E. coli*, levaduras, virus, hongos y células de insectos. Para producir proteínas recombinantes que requieren modificaciones posteriores a la traducción o en torno a ella tales como glicosilación (y donde se requiere producción a escala industrial) se utilizan muy frecuentemente sistemas celulares de mamífero que incluyen células de las especies *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus*. Los sistemas celulares de mamífero se han convertido en un sistema de producción rutinario para proteínas y anticuerpos terapéuticos. Dichas células se han caracterizado ampliamente en la historia reciente, pueden alcanzar niveles de producción extremadamente elevados, pueden estar exentas de partículas de tipo vírico o infeccioso, pueden crecer hasta una densidad muy elevada en biorreactores y se pueden transformar y manipular genéticamente. Por ejemplo, se pueden modificar células de ovario de hámster chino (CHO) para que se asemejen al perfil de glicanos humano mediante transfección de las glicosil-transferasas adecuadas. Los factores de crecimiento producidos de manera recombinante ya se utilizan ampliamente en aplicaciones terapéuticas o son candidatos prometedores para el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo, la expresión de hormonas del crecimiento en células de mamífero, por ejemplo, líneas de células CHO puede dar como resultado una inhibición del crecimiento celular y títulos bajos.

25 En el futuro próximo, cada vez más formatos de proteínas «que no son anticuerpos» formarán parte de las líneas de productos de las compañías farmacéuticas. Sin embargo, puede que no sea posible la expresión de moléculas de señalización extracelular como factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores y citocinas a gran escala en líneas celulares de mamífero debido a la inhibición del crecimiento, lo que da como resultado títulos bajos. Por tanto, es claramente deseable tener acceso a métodos adecuados para la producción de factores de crecimiento y otras proteínas terapéuticas a escala industrial. Un método para manipular la expresión del receptor de la hormona del crecimiento IGF-1 (IGF-1R) en células de mamífero SW40 utilizando la tecnología de ARNhc ha sido descrito en Yavari *et al.*, *Knockdown of IGF-1R by RNAi inhibits SW40 Colon Cancer Cell Growth In Vitro*; *Archives of Medical Research*, Vol. 40, n.º 4, 1 de mayo de 2009, páginas 235-240). De forma similar, se utilizó ARNpi para suprimir la expresión del IGF-1R en la línea de células epiteliales del cristalino humano HLW-B3 (Moschos *et al.*, *Expression of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and type I IGF receptor mRNAs in human HLE-B3 lens epithelial cells*; *IN VIVO*, MAR_ABR de 2011, vol. 25, n.º 2, marzo de 2011, páginas 179-184)

35 COMPENDIO DE LA DIVULGACION

Un contenido de la divulgación se refiere a:

Un método para producir una proteína terapéutica en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica, donde la unión de dicha proteína terapéutica a dicho receptor cognado da como resultado un título bajo de la proteína terapéutica, comprendiendo el método los pasos de:

40 a. Cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína terapéutica, donde la célula es deficiente en la expresión de un receptor cognado de dicha proteína terapéutica; y

b. Recolectar dicha proteína terapéutica a partir de dicha célula de mamífero.

45 Otra divulgación se refiere a un método para producir una proteína terapéutica en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica y donde la unión de dicha proteína terapéutica a dicho receptor cognado da como resultado un título bajo de la proteína terapéutica, comprendiendo el método con una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica y siendo transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica:

50 c. Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión de la proteína terapéutica; y

d. Recolectar la proteína terapéutica a partir de la célula de mamífero cultivada en el paso a.

En otra realización de la divulgación, el método se refiere a la producción de forma heteróloga de una proteína terapéutica recombinante en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica recombinante y donde la unión de dicha proteína terapéutica recombinante a dicho receptor cognado da como

5 resultado un retraso en el crecimiento de dicha célula de mamífero y un título bajo de la proteína terapéutica recombinante, comprendiendo el método con una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica recombinante y siendo transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica recombinante heteróloga bajo el control de un promotor constitutivo o inducible:

e Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión de la proteína terapéutica recombinante; y

f. Recolectar la proteína terapéutica recombinante a partir de la célula de mamífero cultivada en el paso a.

10 En una realización particular de la divulgación, la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, tal como se ha descrito anteriormente, produce al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más de proteína terapéutica que una célula del mismo tipo en la que la expresión del receptor cognado no se haya modificado de este modo.

En otra realización de la divulgación, la proteína terapéutica mencionada anteriormente, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, es un factor de crecimiento.

15 En otra realización más de la divulgación, el factor de crecimiento es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta y la divulgación se refiere a un método para producir la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta en una célula de mamífero, siendo dicha célula de mamífero deficiente en la expresión de un receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), comprendiendo el método

a Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión del IGF-1 o una variante de este; y

20 b. Recolectar el IGF-1 o una variante de este a partir de las células de mamífero cultivadas en el paso a,

donde dicha célula de mamífero produce al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más de IGF-1 o una variante de este que una célula del mismo tipo en la que la expresión del IGF1R no se ha modificado de este modo.

25 En otra realización de la divulgación, las células de mamífero que son deficientes en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento insulínico 1, se han modificado genéticamente y la deficiencia en la expresión de dicho receptor cognado se ha logrado aplicando tecnologías de recombinación genética dirigida o interferencia de ARN.

En una realización particular de la divulgación, el receptor cognado de la proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, se suprime mediante el uso de una nucleasa con dedos de zinc.

30 En otra realización, la divulgación se refiere a uno de los métodos descritos anteriormente, donde la deficiencia en la expresión del receptor cognado de la proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, en la célula de mamífero se ha logrado aplicando interferencia de ARN, comprendiendo el método:

35 (a) introducir en dicha célula moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y donde una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica, y donde dicha región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud y donde dicho ARNbc tras la introducción en dicha célula inhibe la expresión del gen que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica recombinante en al menos un 10%; y

40 (b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, con lo cual se inhibe la expresión de dicho gen del receptor cognado en la célula.

En una realización particular de la divulgación, el receptor cognado de dicha proteína terapéutica es el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 y el método comprende:

45 (a) introducir en dicha célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y donde una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica el IGF-1R de dicha célula de mamífero, y donde dicha región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud y donde dicho ARNbc tras la introducción en dicha célula inhibe la expresión del gen de IGF-1R en al menos un 40%; y

50 (b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen de IGF-1R, con lo cual se inhibe la expresión del gen de IGF-1R en la célula.

En otra realización particular de la divulgación descrita anteriormente, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores de la divulgación, la interferencia de ARN se logra utilizando una molécula de ARNhc, comprendiendo el método:

5 (a) introducir en dicha célula un vector que codifica ARNhc que es sustancialmente complementario a al menos una parte del ARNm que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica recombinante, y donde dicho ARNhc tras la introducción en dicha célula inhibe la expresión de dicho gen del receptor cognado en al menos un 10%; y

(b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de dicho gen del receptor cognado.

10 En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a los métodos descritos anteriormente, donde la célula de mamífero se selecciona del grupo compuesto por células de las especies *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus*. En otro aspecto, la célula de mamífero se selecciona del grupo compuesto por células CHO, COS, Vero, Hela, BHK, HEK NS0, C127, hibridoma, PerC6®, CAP y Sp-2/0. En un aspecto particular, la célula de mamífero utilizada en el método divulgado anteriormente es una célula de ovario de hámster chino (CHO), donde dicha célula CHO puede ser un derivado de una célula CHO-K1, un derivado de una célula CHO-DUXB11, una célula CHO-DG44, una célula CHO-SSF3 o un derivado de una célula CHO-S.

15 En una realización adicional de la divulgación, la deficiencia en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 en células derivadas de CHO-DUXB11 se ha logrado utilizando moléculas de ARN de horquilla corta (ARNhc), donde la secuencia de dichas moléculas de ARNhc se selecciona del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

20 En una realización adicional de la divulgación, la deficiencia en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 tal como se ha descrito anteriormente se ha logrado utilizando moléculas de ARN pequeño interferente (ARNpi) bicatenario, donde la secuencia de la hebra sentido de dicho ARNpi comprende una secuencia seleccionada del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 1 y 3.

25 La divulgación además se refiere a moléculas de ARNbc que comprenden la hebra sentido de un ARNpi seleccionadas del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 1 y 3. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a moléculas de ARNhc que comprenden una secuencia seleccionada del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En otra realización adicional de la divulgación, la deficiencia en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 se ha logrado produciendo células con supresión utilizando tecnologías de recombinación genética dirigida.

30 Por consiguiente, la divulgación también se refiere al método descrito anteriormente, donde el receptor cognado es el IGF-1R y la proteína terapéutica es el IGF-1 o una variante de este y la deficiencia en la expresión del IGF-1R se ha logrado utilizando nucleasas con dedos de zinc.

Además, la divulgación se refiere al método descrito anteriormente donde la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 humano (SEQ ID NO.: 16) o una variante de esta.

En otra realización de la divulgación los métodos divulgados anteriormente comprenden los pasos

35 a. Producir una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de una proteína terapéutica de interés que debería producirse en dicha célula;

b. Transformar la célula del paso a. con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica de interés;

c. Seleccionar la célula del paso b. que se va a transformar;

40 d. Cultivar la célula de mamífero seleccionada en el paso c. en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína terapéutica de interés; y

e. Recolectar dicha proteína terapéutica a partir de las células de mamífero cultivadas en el paso d, donde, como alternativa, el orden de los pasos a. y b. se puede invertir o se pueden llevar a cabo ambos pasos a la vez.

45 En una realización particular adicional de la divulgación, el método divulgado anteriormente se refiere a la producción de un IGF-1, p. ej., el IGF-1 humano (SEQ ID NO.: 16) o una variante de este (p. ej., SEQ ID NO.: 21-29) que comprende los pasos:

a. Producir una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1;

b. Transformar la célula del paso a. con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un IGF-1, p. ej., un IGF-1 humano o una variante de este;

50 c. Seleccionar una célula del paso b. que se va a transformar;

d. Cultivar la célula de mamífero del paso c. en condiciones que permitan la expresión de la proteína IGF-1; y

e. Recolectar dicha proteína IGF-1 o su variante a partir de las células de mamífero cultivadas en el paso d, donde, como alternativa, el orden de los pasos a. y b. se puede invertir o se pueden llevar a cabo ambos pasos a la vez y,

5 donde dicha célula de mamífero produce al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más superior de IGF-1 o una variante de este que una célula del mismo tipo en la que la expresión del IGF-1R no se ha modificado de este modo.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a los métodos descritos anteriormente, donde la proteína terapéutica, que puede ser un factor de crecimiento, particularmente una proteína IGF-1 o el IGF-1 humano (SEQ ID NO.: 16) o una variante de esta (p. ej., SEQ ID NO.: 21-29) se produce a escala de fabricación industrial.

10 La divulgación contempla además una célula de mamífero que se modifica genéticamente, de modo que la expresión de una proteína de factor de crecimiento insulínico 1, p. ej., el IGF-1 humano (SEQ ID NO.:16) o una variante de este (p. ej., SEQ ID NO.: 21-29) es al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más superior en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo y donde dicha modificación genética da como resultado una expresión deficiente del receptor de IGF-1.

15 En otro aspecto de la divulgación, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores de la divulgación, la célula de mamífero descrita anteriormente es una célula de *Cricetulus griseus*, célula de *Cercopithecus aethiops*, célula de *Homo sapiens*, célula de *Mesocricetus auratus*, célula de *Mus musculus* y célula de la especie *Chlorocebus*.

20 En una realización determinada de la divulgación, la célula de mamífero descrita anteriormente es una célula de ovario de hámster chino, particularmente un derivado de una célula CHO-K1, un derivado de una célula CHO-DUXB11, una célula CHO-DG44, una célula CHO-SSF3 o un derivado de una célula CHO-S y la deficiencia en la expresión del receptor de IGF-1 en dichas células se ha logrado aplicando tecnologías de recombinación genética dirigida o interferencia de ARN.

25 En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de una célula de mamífero para la producción de una proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, donde dicha célula es deficiente en la expresión de un receptor cognado endógeno de dicha proteína terapéutica y donde la unión de dicha proteína terapéutica a dicho receptor cognado en una célula que no es deficiente en la expresión de dicho receptor cognado daría como resultado un retraso en el crecimiento de dicha célula de mamífero y/o un título bajo de la proteína terapéutica.

30 Otra realización de la divulgación se refiere al uso descrito anteriormente, donde la proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, es un factor de crecimiento.

Otra realización particular de la divulgación se refiere al uso descrito anteriormente, donde el factor de crecimiento es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta y el receptor cognado es el receptor del factor de crecimiento insulínico 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Figura 1: A: Crecimiento celular: Densidad de células viables (VCD) de células derivadas de CHO-K1 que expresan un anticuerpo recombinante (línea gruesa) y células derivadas de CHO-K1 que expresan hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO.: 35) (línea de puntos) en ciclos del biorreactor. B: Viabilidad celular: Porcentaje de células viables en ciclos del biorreactor (línea gruesa clon de derivado de CHO-K1 que produce anticuerpos, línea de puntos clones que expresan hIGF-1Ea 3mut).

40 Figura 2: A: Crecimiento celular: La línea continua muestra la densidad de células viables (VCD) de las células derivadas de CHO-K1. Durante el cocultivo con hIGF-1Ea 3mut o hIGF-1 se inhibe el crecimiento celular (línea discontinua y línea de puntos, respectivamente). Se muestra la media de 3 replicados biológicos (salvo para la muestra con adición de hIGF-1; barras de error: error estándar de la media). hIGF-1Ea 3mut/ hIGF-1 se añadió el día 0 (experimento de adición). B: Viabilidad celular: La línea continua muestra la viabilidad celular de la célula derivada de CHO-K1, la línea discontinua respectivamente la de puntos la viabilidad celular reducida después de la adición de hIGF-1Ea 3mut/hIGF-1. Se muestra la media de 3 replicados biológicos (salvo para la muestra con adición de hIGF-1; barras de error: error estándar de la media). La viabilidad celular desciende dos días antes si las células se incubaron con hIGF-1Ea 3mut/hIGF-1. No se pudo detectar diferencia entre hIGF-1 y hIGF-1Ea 3mut en el crecimiento celular o la viabilidad celular.

50 Figura 3: Se muestran la densidad de células viables (VCD) de las células derivadas de CHO-DUXB11 (línea gruesa) y el crecimiento celular reducido durante el cocultivo con hIGF-1Ea 3 mut (línea de puntos). Después de añadir el inhibidor de tirosina-cinasa IGF-1R, NVPAEW541, (línea gruesa con asterisco), el crecimiento celular se reduce ligeramente. El cocultivo con hIGF-1Ea 3mut después de añadir el inhibidor de tirosina-cinasa IGF-1R no dio como resultado más inhibición del crecimiento celular (línea de puntos con asterisco) (las células se incubaron durante 1 h con NVPAEW541 antes de la adición de hIGF-1Ea 3mut, para dejar tiempo para que se uniera el inhibidor).

Figura 4: Expresión de ARNm de IGF-1R cuantificada mediante RT-PCR en tiempo real después de la transfección de ARNpi en células precursoras derivadas de CHO-DUXB11. Porcentaje del nivel de ARNm de IGF-1R en células transfectadas con dos ARNpi diferentes contra IGF-1R en comparación con las células transfectadas con ARNpi reorganizado (equivalente a un 100%), en el día 4 después de la transfección. Los niveles de ARNm de IGF-1R de las muestras se normalizaron (GAPDH).

Figura 5: Expresión de ARNm de IGF-1R cuantificada mediante RT-PCR en tiempo real después de la transfección de ARNhc estable y la selección con puomicina en células precursoras derivadas de CHO-DUXB11 (nivel de grupo). Porcentaje del nivel de ARNm de IGF-1R de células transfectadas con seis ARNhc diferentes contra IGF-1R en comparación con las células transfectadas con ARNhc reorganizado (equivalente a un 100%), en el día de cultivo 5 de un cultivo celular de 50 mL. Los niveles de ARNm de IGF-1R de las muestras se normalizaron respecto a GAPDH. El ARNhc 4 mostró el mejor efecto en la represión de la expresión de IGF-1R.

Figura 6: Se resaltan la densidad de células viables (VCD) de los clones con IGF-1R atenuado y los clones de control derivados de CHO-DUXB11 (Control) en presencia y ausencia de hIGF-1Ea 3mut, en el día de cultivo 5 de un lote de 50 mL. Los clones con IGF-1R atenuado (ARNhc; n=12 mejores clones de ARNhc) muestran un crecimiento celular mejorado en presencia de hIGF-1Ea 3mut en comparación con los clones de control derivados de CHO-DUXB11 precursoras (n=7) (barras de error: error estándar de la media).

Figura 7: En negrita se muestra la densidad de células viables (VCD) de las células derivadas de CHO-K1 precursoras y en negrita con círculos el crecimiento celular reducido durante el cocultivo con hIGF-1Ea 3 mut. Con líneas discontinuas se muestran la media de crecimiento celular de los tres clones de IGF-1R KO (barras de error: error estándar de la media). El crecimiento celular se mejora ligeramente en comparación con las células derivadas de CHO-K1 precursoras de origen natural. El cocultivo con hIGF-1Ea 3mut dio como resultado una inhibición del crecimiento celular solamente menor y el crecimiento celular es similar a la célula derivada de CHO-K1 precursora sin cocultivo de hIGF-1Ea 3mut.

Figura 8: En negrita se muestra el crecimiento celular de las células derivadas de CHO-DUXB11 precursoras y en líneas en negrita con círculos el crecimiento celular reducido durante el cocultivo con hIGF-1Ea 3 mut. Con líneas discontinuas se muestran la media de crecimiento celular de los dos clones de IGF-1R KO (barras de error: error estándar de la media). El crecimiento celular se mejora en comparación con las células derivadas de CHO-DUXB11 precursoras de origen natural. El cocultivo con hIGF-1Ea 3mut dio como resultado una inhibición del crecimiento celular nula para el clon KO uno y una inhibición del crecimiento celular menor para el segundo clon IGF-1R KO.

Figura 9: Se muestran los títulos de las proteínas de fusión de IGF-1-Fc de los cultivos en modo discontinuo del día 14 (nivel de grupo). Se resaltan las expresiones de 7 proteínas de fusión de IGF-1-Fc diferentes en 5 líneas de células diferentes. La expresión de las proteínas de fusión de IGF-1-Fc aumentó en un factor 5-20 en líneas de células IGF-1R-KO derivadas de CHO-K1, líneas de células IGF-1R-KO derivadas de CHO-DUXB11, así como en líneas de células con ARNhc derivado de CHO-DUXB11 (expresión reducida de IGF-1R e INSR) en comparación con las líneas de células de origen natural derivadas de CHO-DUXB11 o CHO-K1.

Figura 10: Títulos de las proteínas de fusión de IGF-1-Fc de los clones en el día 14 de cultivos en modo discontinuo de 50 mL. Los títulos de la proteína de fusión de IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-fc_mut 13/2_A en los 15 mejores clones de IGF-1R-KO derivados de CHO-DUXB11 es aproximadamente un factor 6-7 superior en comparación con el título de la proteína de fusión de IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-dominio fc en clones de células de origen natural derivadas de CHO-DUXB11.

DEFINICIONES GENERALES

Con el fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Aproximadamente: el término «aproximadamente» se utiliza en la presente para referirse a aproximadamente, a groso modo, alrededor de o en la región de. Cuando el término «aproximadamente» se utiliza junto con un intervalo numérico, este modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término «aproximadamente» se utiliza en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado por una varianza de un 30 por ciento, preferentemente un 20 por ciento por encima o por debajo (superior o inferior). Tal como se utiliza en la presente, la palabra «o» se refiere a cualquier miembro de una lista particular.

Receptor cognado: tal como se utiliza en la presente, la expresión «receptor cognado» de, por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante heteróloga se refiere a un receptor endógeno de una célula de mamífero (utilizado para la expresión de dicha proteína terapéutica), donde la proteína terapéutica recombinante heteróloga es un ligando de dicho receptor. Dicho de otro modo, el receptor cognado se une específicamente a la proteína terapéutica recombinante heteróloga y la unión de esta desencadena una respuesta fisiológica (p. ej., induce una reacción de transducción de señales) en dicha célula.

Que comprende: la expresión «que comprende» se refiere a «que incluye», por ejemplo, una composición «que comprende» X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

Deficiente en la expresión de un gen determinado: la frase «deficiente en la expresión de un gen determinado» se refiere a una situación en la que un gen determinado en una célula, tras la manipulación genética, muestra un nivel de expresión reducida. Un nivel de expresión se reduce si la (i) cantidad de ARNm que se transcribe de dicho gen o (ii) la cantidad de proteína que es codificada por dicho gen o (iii) la actividad de la proteína codificada por dicho en una célula manipulada genéticamente, donde la célula manipulada genéticamente incluye mutaciones inducidas o espontáneas, es inferior a la cantidad/actividad de ARNm y/o proteína codificada por dicho gen en una célula del mismo tipo que no se manipula genéticamente. Los términos «deficiencia» y «reducción» se utilizan indistintamente e incluyen situaciones en las que el nivel de expresión génica oscila de estar completamente anulado (p. ej., supresión de genes homocigóticos) a una reducción de un 10%, 20% o 30%, o 40% o 50%, o 60%, o 70%, u 80%, o 90%, o 95% o incluso superior (p. ej., estrategias con ARNh_c, ARNp_i o supresión heterocigótica) en comparación con el nivel de expresión de dicho gen en una célula del mismo tipo que no se manipula genéticamente, donde el nivel de expresión se mide determinando los niveles de ARN y/o proteína. Deficiente en la expresión de un gen determinado también se refiere a una situación en la que se expresan ARNm y/o proteína en niveles normales, pero en una forma no funcional o con función alterada.

Heterólogo: tal como se utiliza en la presente, el término «heterólogo» cuando se refiere a una proteína recombinante indica que la especie de la que se deriva la célula no es la misma que la especie de la que se deriva el polipéptido. Por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante es una proteína terapéutica recombinante heteróloga si la proteína tiene una secuencia de aminoácidos humana y dicha proteína se expresa en una célula CHO. El término «heterólogo» con respecto a una secuencia de ácido nucleico también se refiere a una secuencia de nucleótidos, que se liga a una secuencia de ácido nucleico (p. ej., un promotor) a la que no se encuentra ligada en la naturaleza o a la que está ligada en una ubicación diferente en la naturaleza. Además, la frase que es «heterólogo» respecto a una célula de mamífero, p. ej., una célula CHO, en el contexto de una secuencia de ácido nucleico (p. ej., una secuencia de promotor) indica que dicha secuencia de ácido nucleico se ha originado a partir de un organismo diferente (p. ej., un promotor humano utilizado para impulsar la expresión de un gen determinado en un organismo no humano).

Los términos «inhibición» y «retraso» se utilizan indistintamente en el contexto de esta invención e incluyen situaciones en las que el crecimiento de células de mamífero y/o la producción proteica de células de mamífero se ve impactada de forma negativa como resultado de la expresión de una proteína heteróloga. Por tanto, la inhibición o el retraso del crecimiento celular se refiere a una situación en la que, por ejemplo, el número de células viables en un cultivo celular, la viabilidad de las células durante un periodo de cultivo determinado, la densidad celular máxima alcanzable y/o la tasa de producción de proteínas totales o individuales se reduce en las células transgénicas en comparación con la línea de células precursoras no transformadas.

Escala de fabricación industrial: la expresión «escala de fabricación industrial» en el contexto de producción de proteínas recombinantes heterólogas en células de mamífero se refiere a sistemas de producción en biorreactores tales como biorreactores convencionales o aireados que se utilizan para cultivos en modo discontinuo, semicontinuo o por perfusión. Los biorreactores oscilan de 50 litros a 2000 litros para los reactores a escala piloto, de 2000 litros a 5000 litros para los biorreactores aireados y hasta 25 000 litros para los biorreactores agitados de acero inoxidable convencionales. La producción de polipéptidos a gran escala se puede llevar a cabo, por ejemplo, en biorreactores wave, de vidrio o de acero inoxidable. Con ese fin, las células se expanden, habitualmente partiendo de un único vial congelado, por ejemplo, un vial de un banco de células maestro. Las células se descongelan y se expanden a través de varios pasos. Los biorreactores de diferente escala se inoculan con cantidades apropiadas de células. La densidad celular se puede aumentar añadiendo soluciones de alimentación y aditivos al biorreactor. Las células se mantienen con una viabilidad elevada durante un tiempo prolongado. A gran escala se consiguen títulos de producto en el reactor que oscilan de unos pocos cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro. La purificación se puede llevar a cabo mediante metodología de cromatografía estándar, que puede incluir pasos de afinidad, intercambio iónico, interacción hidrofóbica o cromatografía de exclusión de tamaños. El tamaño del biorreactor puede ser de un volumen de hasta varios miles de litros en la escala final (remítase también, p. ej., F. Wurm, *Nature Biotechnology* Vol. 22, 11, 2004, 1393-1398). La cantidad de proteína producida en los sistemas descritos anteriormente oscila normalmente de 1 g/L a 5 g/L. Una escala de fabricación industrial permite (i) cultivar células hasta 2.5×10^7 células/mL durante el tiempo de cultivo, (ii) cultivar células durante un periodo de más de 200 horas, con lo cual se mantiene (iii) una viabilidad celular superior a un 90%.

La proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta: la frase «proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta» se refiere a proteínas que son codificadas por genes del factor de crecimiento insulínico 1, se prefiere particularmente la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 humano (hIGF-1) y variantes de esta. Una variante de la proteína IGF-1 es una proteína que difiere en al menos un aminoácido de la secuencia de origen natural de IGF-1, donde la expresión «secuencia de origen natural» se refiere a una secuencia de un gen o un polipéptido disponible en al menos un organismo natural o una secuencia de un gen o un polipéptido que no ha sido modificada, mutada o manipulada de otro modo por el hombre.

Una variante de IGF-1 es también la proteína precursora de IGF-1 o la proteína pro-IGF-1 que comprende una secuencia líder peptídica. Una variante de IGF-1 es también una proteína de fusión que comprende una proteína IGF-1, p. ej., una proteína que comprende una proteína IGF-1 fusionada a una región Fc de inmunoglobulina. Algunos ejemplos para variantes de IGF-1 se divulgan, entre otras, en las solicitudes de patente WO05033134 (proteína IGF-1 estabilizada fusionada a una región Fc de inmunoglobulina) y WO2007/146689 (proteínas precursoras de IGF-1 estabilizadas). Una variante de IGF-1 tal como se ha descrito anteriormente retiene su actividad biológica en el sentido de que dicha proteína se puede considerar como un equivalente funcional de la IGF-1 de origen natural.

Los equivalentes funcionales con respecto a la proteína IGF-1 se han de entender como proteínas IGF-1 que comprenden una mutación natural o artificial. Las mutaciones pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones de uno o más ácidos nucleicos que no disminuyan la actividad biológica de la proteína IGF-1. Los equivalentes funcionales que tienen una identidad de al menos un 80%, preferentemente un 85%, más preferentemente un 90%, de la forma más preferente más de un 95%, de forma muy especialmente preferente al menos un 98% de identidad, pero menos de un 100% de identidad respecto a la proteína IGF-1 de origen natural, p. ej., la proteína IGF-1 humana (SEQ ID NO.: 16). En el caso de las proteínas de fusión como las descritas anteriormente, el 100% de identidad se debería definir solamente basándose en la parte IGF-1 de una proteína de fusión de este tipo. Los factores de crecimiento insulínico (IGF) son parte de un sistema complejo que utilizan las células para comunicarse con su entorno fisiológico. Este sistema complejo (a menudo denominado eje del factor de crecimiento insulínico) consta de dos receptores de la superficie celular (IGF-1R e IGF-2R), dos ligandos (IGF-1 e IGF-2), una familia de seis proteínas de unión a IGF con afinidad elevada (IGFBP 1-6) y enzimas que degradan IGFBP asociadas (proteasas). Este sistema es importante no solamente para la regulación de la fisiología normal, sino también para una serie de estados patológicos (Glass, *Nat Cell Biol* 5:87-90, 2003). Se ha mostrado que el eje de IGF desempeña funciones en la promoción de la proliferación celular y la inhibición de la muerte celular (apoptosis). IGF-1 es secretado principalmente por el hígado como resultado de la estimulación por parte de la hormona del crecimiento humana (hGH). Casi cada célula en el cuerpo humano está afectada por IGF-1, especialmente las células en los músculos, cartílago, huesos, hígado, riñón, nervios, piel y pulmones. Además de los efectos similares a insulina, el IGF-1 también puede regular el crecimiento celular. IGF-1 e IGF-2 son regulados por una familia de productos génicos conocidos como las proteínas de unión a IGF. Estas proteínas ayudan a modular la acción de IGF en formas complejas que conllevan tanto la inhibición de la acción de IGF evitando la unión a los receptores de IGF como la promoción de la acción de IGF a través de la contribución al suministro a los receptores y el aumento de la semivida de IGF en el torrente sanguíneo. Existen al menos seis proteínas de unión caracterizadas (IGFBP1-6). IGF-1 se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas. La mecasermina (nombre comercial Increlex™) es un análogo sintético de IGF-1 que está aprobado para el tratamiento de la insuficiencia del crecimiento. Varias compañías han evaluado IGF-1 en ensayos clínicos para una serie de indicaciones adicionales, que incluyen diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, esclerosis lateral amiotrófica, lesión por quemadura grave y distrofia muscular miotónica.

Introducción en una célula: La expresión «introducción en una célula», cuando se hace referencia a moléculas de ácido nucleico (ADN, ARN), se refiere básicamente al proceso de transformación o transfección. La expresión «introducción en una célula», cuando se hace referencia a un ARNbc también se puede referir a facilitar la captación o absorción del ARNbc en la célula, tal como entienden los expertos en la técnica. La absorción o captación de ARNbc puede tener lugar a través de procesos celulares de difusión pasiva o activos, o mediante agentes o dispositivos auxiliares.

Célula de mamífero: la expresión «célula de mamífero» en el contexto del método divulgado se refiere a células que son adecuadas para la producción proteica a escala de fabricación industrial. Esas células son muy conocidas para el experto y se han originado, por ejemplo, a partir de las especies *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus*. Las respectivas líneas de células se conocen como células CHO (ovario de hámster chino), células COS (una línea de células procedente de riñón de mono (mono verde africano), células Vero (células epiteliales de riñón extraídas de mono verde africano), células Hela (la línea se obtuvo de células de cáncer de cérvix tomadas de Henrietta Lacks), células BHK (células renales de crías de hámster, células HEK (riñón embrionario humano), células NS0 (línea de células de mieloma murino), células C127 (línea de células de ratón no tumorigénica), células PerC6® (línea de células humanas, Crucell), células CAP (producción de Amniocitos de CEVEC) y células Sp-2/0 (células de mieloma de ratón).

Interferencia de ARN: la expresión «interferencia de ARN» o «iARN» es muy conocida en la técnica y habitualmente se entiende que se refiere a la inhibición de uno o más genes diana en una célula con «ARNpi» o ácido ribonucleico pequeño interferente» con una región que es complementaria al gen diana. Se conocen varios ensayos en la técnica para evaluar la capacidad del ARNpi para mediar la iARN (remítase, por ejemplo, a Elbashir *et al.*, *Methods* 26 (2002), 199-213). El efecto del ARNpi de acuerdo con la presente invención en la expresión génica tendrá como resultado habitualmente la expresión del gen diana que se está inhibiendo en al menos un 10%, 30%, 50%, 90%, 95% o un 99% en comparación con una célula no tratada con, p. ej., moléculas de ARNpi tal como se describen en la presente.

El término «ARNpi» o la expresión «ácido ribonucleico pequeño interferente» de acuerdo con la invención tiene los significados conocidos en la técnica, que incluyen los siguientes aspectos: el ARNpi consta de dos hebras de ribonucleótidos que se hibridan a lo largo de una región complementaria en condiciones fisiológicas. Las hebras son independientes, pero pueden estar unidas por un conector molecular en determinadas realizaciones. Los ribonucleótidos individuales pueden ser ribonucleótidos naturales no modificados, desoxirribonucleótidos naturales no modificados o pueden estar modificados químicamente o ser sintéticos tal como se describe en otra parte en la presente.

Las moléculas de ARNpi de acuerdo con la presente divulgación comprenden una región bicatenaria que es sustancialmente idéntica a una región del ARNm del gen diana. Una región con un 100% de identidad respecto a la secuencia correspondiente del gen diana es adecuada. Este estado se denomina «totalmente complementario». Sin embargo, la región también puede contener uno, dos o tres apareamientos erróneos en comparación con la región correspondiente del gen diana, dependiendo de la longitud de la región del ARNm utilizada como diana y, por tanto, puede no ser totalmente complementaria. En una realización, las moléculas de ARN utilizadas en los métodos divulgados se dirigen específicamente a un gen determinado. Con el fin de dirigirse solamente al ARNm deseado, el reactivo de ARNpi puede tener un 100% de homología respecto al ARNm diana y al menos 2 nucleótidos apareados erróneamente respecto

a todos los demás genes presentes en la célula u organismo. En la técnica se conocen métodos para analizar e identificar ARNpi con una identidad de secuencia suficiente con el fin de inhibir de forma eficaz la expresión de una secuencia diana específica. La identidad de secuencia se puede optimizar mediante comparación de secuencias y algoritmos de alineamiento conocidos en la técnica (remítase a Gribskov y Devoreux, *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, 1991, y a las referencias allí citadas) y calculando la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman tal como se ha implementado en el programa informático BESTFIT utilizando los parámetros por defecto (p. ej., Grupo de computación genética de la Universidad de Wisconsin).

Otro factor que afecta a la eficiencia del reactivo de iARN es la región diana del gen diana. La región de un gen diana eficaz para la inhibición con el reactivo de iARN se puede determinar mediante experimentación. Una región diana de ARNm adecuada sería la región codificante. También son adecuadas regiones no traducidas tales como la 5'-UTR, la 3'-UTR y las uniones de corte y empalme. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo, para este fin, ensayos de transfección tal como se han descrito en Elbashir S.M. *et al*, 2001 *EMBO J.*, 20, 6877-6888. Existen una serie de ensayos y métodos adecuados diferentes en la técnica que son muy conocidos para el experto.

La longitud de la región del ARNpi complementaria a la diana, de acuerdo con la presente divulgación, puede ser de 18 a 100 nucleótidos, de 18 a 25 nucleótidos, de 18 a 22 nucleótidos o 19 nucleótidos. Donde hay apareamientos erróneos respecto a la región diana correspondiente, generalmente se requiere que la longitud de la región complementaria sea algo más larga.

Debido a que los ARNpi pueden portar extremos salientes (que pueden ser o no complementarios a la diana), o nucleótidos adicionales complementarios a sí mismos, pero no al gen diana, la longitud total de cada hebra individual de ARNpi puede ser de 18 a 100 nucleótidos, de 18 a 49 nucleótidos, de 18 a 30 nucleótidos o de 18 a 25 nucleótidos.

Un ARN de horquilla pequeña o ARN de horquilla corta (ARNhc) es una secuencia de ARN que realiza un giro de horquilla cerrado que se puede utilizar para silenciar la expresión del gen diana mediante interferencia de ARN (iARN). Los ARN de horquilla pequeña (ARNhc) se pueden transcribir *in vivo* pueden desencadenar la degradación de los ARNm correspondientes de forma similar a los ARNpi (Shi, 2003). Estos desarrollos plantean la posibilidad de que se puedan utilizar dúplex de ARNpi o vectores que expresen ARNhc (ARN de horquilla pequeña) para bloquear la expresión de un gen, p. ej., que codifica un receptor. Se han descrito promotores regulables para la síntesis de ARN de horquilla pequeña y son muy conocidos para el experto en la técnica (p. ej., el documento WO05007877A).

Recombinación genética dirigida: tal como se utiliza en la presente, la expresión «recombinación genética dirigida» se refiere a un proceso donde la recombinación tiene lugar en un locus diana de ADN presente en una célula hospedadora u organismo hospedador. La recombinación puede implicar ADN homólogo o no homólogo. Para lograr la recombinación genética dirigida, la edición genómica con nucleasas diseñadas (GEEN, por sus siglas en inglés) es un método que se puede aplicar. Unas nucleasas modificadas ampliamente utilizadas son la nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés), meganucleasas modificadas, como las endonucleasas de asentamiento rediseñadas. Un ejemplo de recombinación genética dirigida homóloga sería la escisión de un locus seleccionado del ADN del hospedador por parte de una nucleasa con dedos de zinc (ZFN) (tal como se divulga en el documento WO03087341), seguida de la recombinación homóloga del ADN escindido con ADN homólogo de origen exógeno o endógeno. Un ejemplo de recombinación genética dirigida no homóloga sería la escisión de un locus seleccionado del ADN del hospedador por parte de una ZFN, seguida de la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). Tal como se utilizan en la presente, las expresiones «célula hospedadora» u «organismo hospedador» o simplemente «hospedador diana», se refieren a una célula o un organismo que se ha seleccionado para transformarlo genéticamente de modo que porte uno o más genes para la expresión de una función utilizados en los métodos de la presente invención. Un hospedador puede ser además un organismo o célula que se haya transformado mediante la recombinación genética dirigida o los métodos de mutación de la presente invención.

Proteína terapéutica: la expresión «proteína terapéutica» se refiere a una proteína para terapia humana o veterinaria y puede estar concebida para la administración aguda o crónica. En particular, una «proteína terapéutica» es una proteína utilizada en el tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad o afección patológica.

Transformación: La expresión «transformación de» / «que transforma» una célula de mamífero o el término «transformado/a» se refiere a la introducción de un constructo de ADN recombinante, p. ej., un constructo de expresión de proteínas o un constructo de expresión de ARNhc en dicha célula de mamífero. La transformación describe el proceso de integrar y mantener de forma estable un ADN recombinante en el genoma de una célula, p. ej., una célula de mamífero como las células CHO. El hecho de mantener de forma estable un constructo de ADN recombinante incluye la integración de dicho constructo de ADN en el genoma del organismo hospedador, así como la presencia extracromosómica de un vector en un organismo hospedador, p. ej., en caso de un vector de expresión transitoria. El término «transformación» se utiliza en la presente indistintamente con los términos «transfección» o transducción».

Hebra sentido: La expresión «hebra sentido», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se divulga una solución para el problema de que producir una proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica, puede dar como resultado un retraso en el crecimiento de dicha célula de mamífero y/o un título bajo de la proteína terapéutica (remítase a la sección de ejemplos).

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para producir una proteína terapéutica, que puede ser una proteína recombinante, en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica y donde la unión de dicha proteína terapéutica a dicho receptor cognado da como resultado un título bajo de la proteína terapéutica, comprendiendo el método con una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica y siendo transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína terapéutica:

- a. Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión de la proteína terapéutica; y
- b. Recolectar la proteína terapéutica a partir de la célula de mamífero cultivada en el paso a.

15 En una realización particular, el método descrito anteriormente comprende el paso de procesar la proteína terapéutica aislada, donde dicha célula de mamífero produce la proteína terapéutica en al menos un factor 1.5 más que la misma célula en la que la expresión del receptor cognado no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) o una variante de esta cuyo receptor cognado es el receptor IGF-1R; y donde dicha célula de mamífero es deficiente en la expresión de un receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R) funcional, el receptor cognado de IGF-1 o la variante de este.

20 En otra realización, la divulgación proporciona una solución para el problema que producir una proteína terapéutica bajo el control de un promotor heterólogo constitutivo o inducible en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica, puede dar como resultado un retraso en el crecimiento de dicha célula de mamífero y/o un título bajo de la proteína terapéutica recombinante (remítase a la sección de ejemplos).

25 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para producir de forma heteróloga una proteína terapéutica recombinante en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica recombinante y donde la unión de dicha proteína terapéutica recombinante a dicho receptor cognado da como resultado un título bajo de la proteína terapéutica recombinante, comprendiendo el método con una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica recombinante y siendo transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica recombinante heteróloga bajo el control de un promotor constitutivo o inducible que es heterólogo para dicha célula de mamífero:

- c Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión de la proteína terapéutica recombinante; y
- d. Recolectar la proteína terapéutica recombinante a partir de la célula de mamífero cultivada en el paso c, donde dicha célula de mamífero produce la proteína terapéutica en al menos un factor 1.5 más que la misma célula en la que la expresión del receptor cognado no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) o una variante de esta cuyo receptor cognado es el receptor IGF-1R; y donde dicha célula de mamífero es deficiente en la expresión de un receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R) funcional, el receptor cognado de IGF-1 o la variante de este.

En una divulgación particular, el método descrito anteriormente comprende el paso de procesar la proteína terapéutica aislada.

40 La producción de polipéptidos a gran escala con células de mamífero transfectadas, p. ej., células CHO, se puede llevar a cabo, por ejemplo, en biorreactores wave, de vidrio o acero inoxidable. Con ese fin, las células se expanden, habitualmente partiendo de un único vial congelado, por ejemplo, un vial de un banco de células maestro. Las células se descongelan y se expanden a través de varios pasos. Los biorreactores de diferente escala se inoculan con cantidades apropiadas de células. La densidad celular se puede aumentar añadiendo soluciones de alimentación y aditivos al biorreactor. Las células se mantienen con una viabilidad elevada durante un tiempo prolongado. A gran escala se consiguen concentraciones de producto en el reactor que oscilan de unos pocos cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro. La purificación se puede llevar a cabo mediante metodología de cromatografía estándar, que puede incluir pasos de afinidad, intercambio iónico, interacción hidrófoba o cromatografía de exclusión de tamaños. El tamaño del biorreactor puede ser de un volumen de hasta varios miles de litros en la escala final (remítase también, p. ej., F. Wurm, *Nature Biotechnology* Vol. 22, 11, 2004, 1393-1398).

En una realización particular, la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica de interés produce la proteína terapéutica en al menos un factor 1.5 o más que una célula en la que la expresión del receptor cognado de la proteína terapéutica no se ha modificado de este modo.

55 En otra realización más de la divulgación, las células modificadas tal como se han descrito anteriormente tienen al menos un 5 por ciento, o un 10 por ciento, o un 15 por ciento, o un 20 por ciento, o un 30 por ciento, o un 40 por ciento, o un 50 por ciento o más células viables en comparación con una población de control. Como alternativa, o además, las células

modificadas mantienen la viabilidad celular durante un periodo de tiempo más prolongado en comparación con células que no se han modificado. Por ejemplo, las células modificadas son capaces de mantener un porcentaje de viabilidad celular determinado (p. ej., un 95 por ciento) durante un periodo más prolongado en comparación con las células de control.

5 En otra realización particular, las células de mamífero que son deficientes en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica de interés crecen hasta una densidad celular de $0.5-1 \times 10^7$ células/mL o $1-1.5 \times 10^7$ células/mL o $1.5-2 \times 10^7$ células/mL o $2-2.5 \times 10^7$ células/mL o $3-3.5 \times 10^7$ células/mL o superior durante el tiempo de cultivo. La viabilidad de las células de mamífero que son deficientes en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica es superior a un 90% durante las primeras 80-110 h o 110-140 h o 140-170 h o 170-200 h o 200-230 h o 230-260 h o un tiempo de cultivo más prolongado.

En una realización adicional, un cultivo de la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica de interés y se cultiva en condiciones como las descritas en la figura 10, produce al menos 0.4 g/L o 0.6 g/L o 0.8 g/L o 1.0 g/L o 1.2 g/L o 1.4 g/L o 1.6 g/L o 1.8 g/L o 2.0 g/L o 2.2 g/L o más proteína terapéutica.

15 En otra realización de la divulgación, la proteína terapéutica mencionada anteriormente es un factor de crecimiento. Los factores de crecimiento se conocen en la técnica e incluyen, sin carácter limitante, Adreno-medulina (AM), Angiopoyetina (Ang), Factor de motilidad autocrino, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), Factor neurotrófico procedente del cerebro (BDNF), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Eritropoyetina (EPO), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor neurotrófico procedente de la línea de células gliales (GDNF), Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), Factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF9), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Factor de crecimiento procedente del hepatoma (HDGF), Factor estimulante de la migración, Miostatina (GDF-8), Factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras neurotrofinas, Factor de crecimiento procedente de las plaquetas (PDGF), Trombopoyetina (TPO), Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento placentario de la vía de señalización de Wnt (PIGF), Somatotrofina fetal bovina (FBS), Factor de crecimiento de interleucina 2 (IL2), IL3, IL4, IL5, IL6, IL7.

La invención se refiere a la producción de un factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de este. En su forma madura, el IGF-1 humano, también denominado somatomedina, es una proteína de bajo peso molecular de 70 aminoácidos que se ha mostrado que estimula el crecimiento de una amplia variedad de células en cultivo. La proteína madura es codificada inicialmente por tres ARNm variantes de corte y empalme conocidos. El marco de lectura abierto de cada ARNm codifica una proteína precursora que contiene el IGF-1 de 70 aminoácidos (SEQ ID NO.: 16) y un péptido E particular en el extremo C terminal, dependiendo del ARNm de IGF-1 particular. Estos péptidos E se han denominado péptidos Ea (SEQ ID NO.: 17), Eb (SEQ ID NO.: 18) y Ec (SEQ ID NO.: 19) y oscilan entre 35 y 87 aminoácidos de longitud y engloban una región de secuencia común en el extremo N terminal y una región de secuencia variable en el extremo C terminal. En situaciones de expresión fisiológica, los péptidos E son escindidos del precursor por proteasas endógenas para proporcionar el IGF-1 de 70 aminoácidos maduro del que se tiene constancia que es bioactivo. La proteína IGF-1 se une al receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), al receptor del factor de crecimiento insulínico 2 (IGF-2R) y al receptor de insulina (INSR). El IGF-1 se ha fabricado de forma recombinante a gran escala utilizando tanto levadura como *E. coli*. El IGF-1 es un candidato farmacológico deficiente, ya que esta proteína es degradada rápidamente por proteasas endógenas en el suero de los pacientes. Se han aplicado estrategias diferentes para superar dicha desventaja. El documento WO05033134 divulga una proteína IGF-1 estabilizada fusionada con una región Fc de inmunoglobulina. El documento WO2007/146689 divulga una proteína precursora de IGF-1 estabilizada donde la escisión del péptido E del IGF-1 por parte de una proteasa es reducida. Aunque la información divulgada en el documento WO2005033134 y el documento WO2007/146689 se puede utilizar para estabilizar variantes de IGF-1 *in vivo*, no resuelve el problema de que la expresión de IGF-1 recombinante o variantes de este en células de mamífero, por ejemplo, líneas de células CHO, da como resultado una inhibición del crecimiento celular y títulos bajos (remítase a la sección de ejemplos).

La información de la presente invención proporciona un método para la producción de IGF-1 recombinante o variantes de este cuyo receptor cognado es el receptor IGF-1R en células de mamífero, por ejemplo, una célula CHO, donde dicha célula de mamífero es deficiente en la expresión de un receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), el receptor cognado de IGF-1 o la variante de este, comprendiendo el método

- 50 a. Producir una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1;
- b. Transformar la célula del paso a. con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un IGF-1 o una variante de este;
- c. Seleccionar una célula del paso b. que se va a transformar;
- 55 d. Cultivar la célula seleccionada en el paso c. en condiciones que permiten la expresión del IGF-1 o una variante de este; y
- e. Recolectar el IGF-1 o una variante de este a partir de las células de mamífero cultivadas en el paso d,

donde dicha célula de mamífero produce el IGF-1 o una variante de este al menos en un factor 1.5 más que una célula del mismo tipo que no se ha modificado tal como se describe en el paso a y donde el orden de los pasos a. y b. se puede invertir o ambos pasos se pueden llevar a cabo a la vez.

5 En una realización particular, el método descrito anteriormente comprende el paso de procesar la proteína terapéutica aislada.

10 En una realización particular, la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), cuando se produce y se cultiva tal como se ha descrito anteriormente en los pasos a. a e., produce IGF-1 o una variante de este al menos en un factor 1.5 o más superior que una célula que se transforma como se ha descrito en el paso b. anterior, pero que no se ha modificado tal como se describe en el paso a. (que no es deficiente en la expresión del IGF-1R). En otra realización particular, la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del IGF-1R tal como se ha descrito anteriormente crece hasta un valor de $0.5-1 \times 10^7$ células/mL o $1-1.5 \times 10^7$ células/mL o $1.5-2 \times 10^7$ células/mL o $2-2.5 \times 10^7$ células/mL o $3-3.5 \times 10^7$ células/mL o superior durante el tiempo de cultivo. La viabilidad de la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del IGF-1R es superior a un 97% durante las primeras 80-110 h o 110-140 h o 140-170 h o 170-200 h o 200-230 h o 230-260 h de tiempo de cultivo.

15 En una realización adicional, un cultivo de la célula de mamífero que es deficiente en la expresión del IGF-1R descrito y cultivado tal como se describe en la presente, produce al menos 1 g/L o 1.2 g/L o 1.4 g/L o 1.6 g/L o 1.8 g/L o 2.0 g/L o 2.2 g/L o 2.4 g/L o 2.6 g/L o 2.8 g/L o 3 g/L o más IGF-1 o una variante de este.

20 La producción de una célula de mamífero que es deficiente en la expresión de un gen determinado, p. ej., el receptor del factor de crecimiento insulínico 1, incluida la transformación, selección y cultivo de células modificadas genéticamente sigue el muy conocido paradigma global de la biología molecular clásica desarrollada para los sistemas microbianos y de mamíferos y es una técnica establecida y muy conocida para el experto en la técnica. Las células con supresión CHO han sido ya descritas en la técnica anterior a principios de este siglo (remítase a Krämer *et al*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010) 88:425-436). Los siguientes métodos se pueden utilizar para la producción de una célula de mamífero que es deficiente en la expresión de un gen determinado:

25 **Direccionamiento génico mediante recombinación homóloga**

La recombinación homóloga es una forma de obtener una célula de mamífero que es deficiente en la expresión de un gen determinado (p. ej., supresión génica). Aunque esta tecnología es en principio más específica que los métodos no dirigidos, la frecuencia de la recombinación homóloga es muy baja y no es aplicable para el diseño de líneas de células industriales (Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH (2001) *Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci USA* 98(15): 8403 -8410). Como resultado de esto, es necesario el cribado y análisis de muchos clones para identificar una célula con supresión. Un ejemplo con éxito de este procedimiento es la supresión de la $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa en las células CHO-DG44 (Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, Wakitani M, Niwa R, Sakurada M, Uchida K, Shitara K, Satoh M (2004) *Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol Bioeng* 87(5):614-622).

30 Se pueden introducir roturas bicatenarias con meganucleasas para aumentar la incidencia de la Recombinación homóloga. Las meganucleasas (endonucleasas de asentamiento) reconocen secuencias de ADN largas de 12-45 pb (Pâques F, Duchateau P (2007) *Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. Curr Gene Ther* 7(1):49-66). I-SceI e I-CreI son meganucleasas que se han estudiado exhaustivamente (Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, Patin A, Zanghellini A, Pâques F, Lacroix E (2003) *A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. Nucleic Acids Res* 31(11):2952-2962).

Roturas bicatenarias introducidas con meganucleasas diseñadas

45 Las meganucleasas son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un sitio de reconocimiento de gran tamaño (de 12 a 40 pares de bases); como resultado, este sitio por lo general tiene lugar solamente una vez en cualquier genoma determinado. Las meganucleasas son «tijeras de ADN moleculares» que se pueden utilizar para reemplazar, eliminar o modificar secuencias de una forma muy dirigida. Mediante la modificación de su secuencia de reconocimiento a través del diseño de proteínas, se puede cambiar la secuencia diana. Las endonucleasas mejor caracterizadas que son más ampliamente utilizadas en investigación y diseño genómico incluyen I-SceI, I-CreI y I-DmoI. La mayor parte de las meganucleasas son homodímeros o monómeros simétricos internamente. El sitio de unión a ADN, que contiene el dominio catalítico, está compuesto por dos partes a cada lado del punto de corte.

55 Hasta la fecha, se han identificado y secuenciado aproximadamente 600 meganucleasas, a partir de varios organismos unicelulares. Esto implica que el número de secuencias de ADN reconocibles es muy limitado para aplicaciones de adaptación del genoma. Para superar esta limitación, algunas compañías como, p. ej., Cellectis diseñan meganucleasas de forma que sean específicas respecto al sitio diana para cada gen de interés. La elevada especificidad de las meganucleasas les proporciona un grado de precisión elevado y una toxicidad celular baja.

Después de que haya tenido lugar una rotura bicatenaria de ADN (p. ej., utilizando una meganucleasa) tiene lugar una «unión de extremos no homólogos». La «unión de extremos no homólogos» es un proceso natural celular que repara las roturas bicatenarias en el ADN. Los extremos de ADN rotos se vuelven a ligar directamente sin necesidad de un molde homólogo, al contrario que en la recombinación homóloga. Debido a la naturaleza proclive a errores de la «unión de extremos no homólogos», una proporción de roturas bicatenarias se reparará erróneamente mediante la adición y/o delección de nucleótidos. Estas mutaciones dentro de la secuencia genómica tienen lugar en el sitio de la rotura bicatenaria, lo que da como resultado la pérdida de función génica y, por tanto, logran la supresión génica.

Roturas bicatenarias introducidas por nucleasas con dedos de zinc

Las nucleasas con dedos de zinc son herramientas muy útiles para producir células de mamífero con supresión. Una nucleasa con dedos de zinc se compone de un dominio de dedos de zinc diseñado, un conector corto y un dominio de endonucleasa FokI modificado que introduce una rotura bicatenaria de ADN con especificidad de secuencia. Cambiando residuos en el dominio de dedos de zinc, se pueden producir nuevas nucleasas con dedos de zinc con diferentes especificidades de unión a ADN (Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003) *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. *Science* 300 (5620):764; Cathomen T, Joung JK (2008) *Zinc-finger nucleases: the next generation emerges*. *Mol Ther* 16(7):1200-1207). Los dominios de dedos de zinc dirigen la posición de escisión, una ventaja sobre otros procesos de direccionamiento a genes debido a que las nucleasas con dedos de zinc se pueden diseñar para que se dirijan a cualquier sitio genómico deseado. El experto está al corriente del gran número de publicaciones científicas que tratan sobre nucleasas con dedos de zinc y su aplicación en el direccionamiento a genes (Rémy S, Tesson L, Ménoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegón I (2010) *Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals*. *Transgenic Res* 19(3):363-371; Krämer *et al*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010) 88:425-436; Kandavelou K, Ramalingam S, London V, Mani M, Wu J, Alexeev V, Civin CI, Chandrasegaran S (2009) *Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases*. *Biochem Biophys Res Commun* 388(1):56-61; Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC (2005) *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. *Nature* 435(7042):646-651;).

Una rotura bicatenaria de ADN catalizada por las nucleasas con dedos de zinc puede activar dos vías de reparación de ADN diferentes, concretamente la recombinación homóloga o la unión de extremos no homólogos. La recombinación homóloga se activa preferentemente si hay disponibles cantidades elevadas de un ADN de donante apropiado y permite la introducción de ADN nuevo en el genoma (Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003) *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. *Science* 300 (5620):764)).

La unión de extremos no homólogos de las reparaciones de ADN se basa simplemente en el religamiento de los extremos de ADN rotos. En algunos casos pueden tener lugar inserciones o delecciones de nucleótidos y dará lugar entonces a una secuencia diferente en comparación con el segmento original. La consecuencia son desplazamientos del marco o codones de terminación, lo que da lugar a un ARNm truncado o aberrante durante la transcripción.

Las nucleasas con dedos de zinc a medida se pueden producir de varias formas (Beerli RR, Barbas CF 3rd (2002) *Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors*. *Nat Biotechnol* 20(2):135-141); Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, Reyon D, Sander JD, Peterson RT, Joung JK (2009) *Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool Engineering (OPEN)*. *PLoS ONE* 4(2):e4348). Las nucleasas con dedos de zinc a medida se pueden adquirir de Sangamo Biosciences/Sigma-Aldrich. Los principios para generar nucleasas con dedos de zinc se divulgan en Cathomen T, Joung JK (2008) *Zinc-finger nucleases: the next generation emerges*. *Mol Ther* 16(7):1200-12078). Otra estrategia hace uso de la plataforma de diseño de conjuntos oligomerizados (OPEN) de acceso público proporcionada por el "Zinc Finger Consortium" (www.zincfingers.org). Esta plataforma utiliza un archivo de un grupo de dedos de zinc que se recombina basándose en la secuencia de ADN diana. Posteriormente, los dedos de zinc recombinados se criban mediante un sistema de dos híbridos bacterianos. Una unión con éxito se mide mediante la expresión de un gen indicador (Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Göbel C, Dassié JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, McCray PB Jr, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK (2008) *Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification*. *Mol Cell* 31(2):294-301 Foley *et al*. 2009; Maeder *et al*. 2008). Esta tecnología de dedos de zinc ya se ha aplicado con éxito en el diseño de líneas de células tal como se muestra en la Tabla 1 de Krämer *et al*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010) 88:425-436).

Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) son enzimas de restricción artificiales generadas fusionando el dominio de unión a ADN efector TAL a un dominio de escisión de ADN. Los efectores TAL son proteínas secretadas por bacterias *Xanthomonas*. El dominio de unión a ADN contiene una secuencia de 33-34 aminoácidos muy conservados con excepción de los aminoácidos 12.º y 13.º. Estas dos ubicaciones son muy variables y muestran una sólida correlación con el reconocimiento de nucleótidos específicos. Esta sencilla relación entre la secuencia de aminoácidos y el reconocimiento de ADN ha permitido el diseño de dominios de unión a ADN específicos seleccionando una combinación de segmentos repetidos que contienen el residuo de repetición variable (RVD) apropiado. El mecanismo de reconocimiento de ADN de una TALE se basa, por tanto, en un código sencillo por el cual un RVD reconoce un nucleótido de la secuencia de ADN y garantiza que el dominio de unión a ADN de cada TALE sea capaz de dirigirse a sitios de reconocimiento extensos con una precisión elevada (15 - 30 nt). El segundo componente de una nucleasa

efectora TAL es el dominio catalítico de una endonucleasa que introduce roturas bicatenarias de ADN y que se fusiona al dominio de unión a ADN de la TALE (FokI).

5 Las TALEN funcionan en parejas y son, por tanto, heterodímeros compuestos por dos unidades de TALEN con una especificidad de secuencia elevada. Estas unidades se unen a secuencias de ADN diana y crean una región espaciadora para permitir que los dominios de endonucleasa dimericen y creen una rotura bicatenaria de ADN. Después de la escisión de ADN, las roturas bicatenarias de ADN se reparan mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ). La NHEJ repara uniendo los dos extremos entre sí, lo que da lugar en algunos casos a una delección o inserción de pares de bases, con lo cual se produce un desplazamiento del marco y se impide la producción de la proteína.

10 El diseño genómico basado en virus adenoasociados recombinantes (rAAV) es una plataforma de edición genómica centrada en torno al uso de vectores de rAAV que permite la inserción, delección o sustitución de secuencias de ADN en los genomas de células de mamífero. La técnica se sustenta en el descubrimiento de que la recombinación homóloga, un mecanismo de reparación de ADN natural, se puede aprovechar para llevar a cabo alteraciones genómicas precisas. Esta técnica se ha adoptado para su uso en el diseño de líneas celulares con el fin de optimizar líneas de células bioproductoras para la biofabricación de proteínas.

15 El genoma de rAAV está compuesto por ácido desoxirribonucleico monocatenario que tiene aproximadamente 4.7 kilobases de longitud. Estos vectores virales de ADN monocatenario tienen tasas de transducción elevadas y tienen una propiedad única para estimular la HR endógena sin provocar roturas de ADN bicatenarias en el genoma como, p. ej., en la tecnología de ZFN o TALEN. El vector de rAAV se puede diseñar para cualquier locus genómico diana y llevar a cabo, p. ej., supresiones génicas. El rAAV se dirige a un único alelo cada vez.

20 Otra opción para reprimir genes son los represores TAL que fueron descritos, p. ej., por Garg A, Lohmueller JJ, Silver PA, Armel TZ. (*Nucleic Acids Res.* Agosto de 2012;40(15):7584-95. *Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites*) y Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P (*Nat Biotechnol.* Febrero de 2011;29(2):149-53. *Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription*) que crearon efectores TAL fusionados con el dominio de represión transcripcional KRAB o SID. Se mostró que el KRAB situado en ambos extremos o en el extremo N terminal o en el C terminal del dominio de unión a ADN de TAL presentaba más de un 90% de represión de un plásmido indicador.

Por tanto, otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para producir una proteína terapéutica, tal como se divulga anteriormente, donde la célula que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica se ha producido aplicando tecnologías de recombinación genética dirigida.

30 Interferencia de ARN

Se han descrito procesos de ARNi en la técnica anterior con gran detalle:

Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) *Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs.* *Cell* 136(4):642-655;

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression.* *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6):457-467;

35 Kim DH, Rossi JJ (2007) *Strategies for silencing human disease using RNA interference.* *Nat Rev Genet* 8(3):173-184;

Siomi H, Siomi MC (2009) *On the road to reading the RNA interference-code.* *Nature* 457(7228):396-404;

Wu SC (2009) *RNA interference technology to improve recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells.* *Biotechnol Adv* 27(4):417-422.

40 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* *Nature* 411(6836):494-498.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.* *Science* 296(5567):550-553.

45 Por ejemplo, se utilizaron ARNi para silenciar en células CHO la proteína Requiem, una proteína que es relevante en la cascada de apoptosis (Wong DC, Wong KT, Nissom PM, Heng CK, Yap MG (2006b) *Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures.* *Biotechnol Bioeng* 95(3):350-361) y las caspasas 3 y 7 (Sung YH, Lee JS, Park SH, Koo J, Lee GM (2007) *Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin.* *Metab Eng* 9(5-6):452-464).

50 En otra realización, la divulgación se refiere a uno de los métodos descritos anteriormente, donde la deficiencia en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, p. ej., el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 si la proteína terapéutica de interés es la proteína IGF-1 o una variante de esta, en la célula de mamífero se ha logrado aplicando interferencia de ARN, comprendiendo el método:

(a) introducir en dicha célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y donde una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica, p. ej., el IGF-1R, y donde dicha región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud y donde dicho ARNbc tras la introducción en dicha célula inhibe la expresión del gen que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica, p. ej., el gen de IGF-1R, en al menos un 40%; y

(b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen que codifica el receptor cognado de la proteína terapéutica, con lo cual se inhibe la expresión de dicho receptor, p. ej., el IGF-1R, en la célula.

El término «silenciar» y la expresión «inhibir la expresión de», en la medida en que se refieren al gen de IGF-1R, se refieren a la supresión al menos parcial de la expresión de IGF-1R en una célula tratada con ARNbc o ARNhc que se dirige a IGF-1R, tal como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm transcrito o disponible en comparación con células normales (no tratadas). Esta medición se puede determinar comparando los niveles de ARNm en células tratadas (que se pueden aislar a partir de una primera célula o grupo de células que se han tratado de modo que la expresión del gen IGF-1R se inhiba), en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células, pero que se han tratado de este modo o no (células de control). El grado de inhibición se expresa habitualmente en términos de

$$\frac{(ARNm \text{ en células de control}) - (ARNm \text{ en células tratadas})}{(ARNm \text{ en células de control})} \cdot 100\%$$

Como alternativa, el grado de inhibición se puede proporcionar en términos de una reducción de un parámetro que esté conectado funcionalmente con la transcripción génica, p. ej., la cantidad de polipéptido, o el número de células que presentan un determinado fenotipo asociado con IGF-1R. Por ejemplo, en determinados casos, se inhibe la expresión del gen de IGF-1R, cuando se suprime en al menos aproximadamente un 20%, 25%, 35% o 50% mediante administración de un ARNbc o ARNhc específico de IGF-1R. En algunas realizaciones, el gen de IGF-1R se suprime en al menos aproximadamente un 60%, 70% u 80% mediante administración de un ARNbc o ARNhc específico de IGF-1R. En algunas realizaciones, el gen de IGF-1R se suprime en al menos un 85%, 90% o 95% mediante administración de un ARNbc o ARNhc específico para IGF-1R.

El ARNbc comprende dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridarse con el fin de formar una estructura dúplex. Una hebra del ARNbc (la hebra antisentido) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria y, por lo general, totalmente complementaria, a una secuencia diana, procedente de la secuencia de producto génico del gen de IGF-1R, la otra hebra (la hebra sentido) comprende una región que es complementaria a la hebra antisentido, de modo que las dos hebras se hibridan y forman una estructura dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Por lo general, la estructura dúplex es de entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24 y de la manera más general entre 19 y 21 pares de bases de longitud. De forma similar, la región de complementariedad respecto a la secuencia diana es de entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y de la manera más general entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc puede tener extremos romos (p. ej., donde cada nucleótido en cada hebra tiene un nucleótido adecuado para el apareamiento de bases en la otra hebra), o puede comprender además uno o más salientes de nucleótidos monocatenarios, normalmente en el extremo 3'. El ARNbc se puede sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica tal como se discute más adelante, p. ej., mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado tal como son comercializados, por ejemplo, por Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

En una realización adicional de la divulgación, la deficiencia en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 tal como se ha descrito anteriormente se ha logrado utilizando moléculas de ARN pequeño interferente bicatenario (ARNpi), donde la secuencia de la hebra sentido de dicho ARNpi comprende una secuencia seleccionada del grupo compuesto por las SEQ ID NO.: 1 y 3.

En una realización adicional de la divulgación, la deficiencia en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 se ha logrado utilizando moléculas de ARN de horquilla corta (ARNhc), donde la secuencia de dichas moléculas de ARNhc se selecciona del grupo compuesto por las SEQ ID NO.: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

Las tecnologías de recombinación genética dirigida o las estrategias con interferencia de ARN tal como se divulgan en la presente, o aquellas descritas en la técnica anterior mencionada previamente, se pueden aplicar para producir una célula de mamífero recombinante, p. ej., una célula CHO, deficiente en la expresión del receptor cognado de una proteína terapéutica, que puede ser una proteína terapéutica recombinante, de interés, p. ej., un factor de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (remítase a la sección de ejemplos).

Producción de células de mamífero transgénicas

El experto sabe cómo transformar, seleccionar y cultivar células de mamífero modificadas genéticamente, p. ej., células CHO, como las células derivadas de CHO-K1, derivadas de CHO-DUXB11 o CHO-DG44. Se utilizan de forma rutinaria

5 protocolos de selección para facilitar la selección de células que es probable que hayan integrado el ADN recombinante que codifica la proteína terapéutica deseada, como factores de crecimiento, p. ej., IGF-1. Se utiliza de forma rutinaria la resistencia a antibióticos o la capacidad para crecer en un medio selectivo desde el punto de vista nutricional conferida por un gen cointegrado en el vector de transformación (remítase a Weber, W. y Fussenegger, M. (2003) *Inducible gene expression in mammalian cells*, in *Gene transfer and expression in mammalian cells*, (Makrides, S.C., Ed.), Elsevier: Amsterdam, págs. 589-604) (*Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*: Niwa Hitoshi, Yamamura Ken-ichi, Miyazaki Jun-ichi). Los dos sistemas de expresión de CHO más comunes para la producción de proteínas recombinantes utilizan una selección con metotrexato (MTX) basada en dihidrofolato-reductasa (DHFR) o una selección con sulfoximina de metionina (MSX) basada en glutamina-sintetasa (GS) (Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Eur J Pharm Biopharm.* Feb. de 2010; 74(2):127-38. Epub 22 de oct. de 2009. *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*).

15 El sitio de integración del ADN exógeno influye claramente en el nivel de expresión. Se ha descrito la integración de los genes exógenos en regiones muy activas desde el punto de vista transcripcional del genoma utilizando el sistema Crew/loxP (Kwaks, T. y Otte, A. (2006) *Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells.* *Trends Biotechnol.*, 24(3), 137-142.). Asumiendo que la integración de cualquier transgén exógeno en este sitio específico proporcionará clones con producción elevada, la integración dirigida se puede lograr mediante integración con especificidad de sitio recíproca (Baer, A. y Bode, J. (2001) *Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes.* *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 473-480.).

20 Además, se han ligado a los transgenes secuencias de nucleótidos cortas que contribuyen a que el ADN exógeno sea más activo desde el punto de vista transcripcional independientemente de su sitio de integración. Los elementos STAR (elementos estabilizantes y antirrepresores, por sus siglas en inglés) reducen la extensión del patrón de desacetilación de histonas y la propagación de la metilación en las proximidades de los transgenes insertados (Kwaks, T.; Barnett, P.; Hemrika, W.; Siersma, T.; Sewalt, R. Satijn, D.; Brons, J.; van Blokland, R.; Kruckeberg, A.; Kelder, A. y Otte, W. (2003) *Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells.* *Nat. Biotechnol.*, 21, 553-558.). Las regiones asociadas con el armazón/matriz interaccionan con la matriz nuclear y crean bucles donde la expresión génica está coordinada y aislada de la represión (Girod, P.; Zahn-Zabal, M. y Mermod, N. (2005) *MAR elements as tools to increase protein production by CHO cells*, in *Animal cell technology meets genomics*; Godia, M.F. y Fussenegger, M., Ed., Springer: Amsterdam, págs. 411-415; Girod, P.; Zahn-Zabal, M. y Mermod, N. (2005) *Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines.* *Biotechnol. Bioeng.*, 91(1), 1-11.), mientras que los elementos UCOE (elementos de apertura de cromatina ubicuos, por sus siglas en inglés) crean un ambiente muy activo desde el punto de vista transcripcional [(Benton, T.; Chen, T.; McEntree, M.; Fox, B.; King, D.; Crombie, R.; Thomas, T. y Bebbington, C. (2002) *The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein.* *Cytotechnology*, 38, 43-46.)

35 En la solicitud de patente WO09080720A se han divulgado vectores particularmente adecuados para producir polipéptidos en células de mamífero, particularmente células de roedores tales como células CHO y CHO con el gen DHFR defectuoso. Existen varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para introducir un vector de expresión en una célula hospedadora de mamífero. Los métodos respectivos incluyen, sin carácter limitante, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transferencia de genes mediada por polímeros y biolística. Las células hospedadoras adecuadas se han descrito anteriormente. Después de introducir el ácido nucleico del vector de expresión en la o las células hospedadoras, los transformantes obtenidos se cultivan en condiciones selectivas adecuadas para evaluar la expresión del gen marcador seleccionable de mamífero contenido en el casete de expresión (MSM). Esto significa que, por ejemplo, cuando el gen marcador seleccionable de mamífero es un gen de resistencia a antibióticos, se cultivan los transformantes en un medio que contiene el antibiótico correspondiente activo en células de mamífero y se seleccionan los transformantes que son viables en tales condiciones, con lo cual se posibilita así la obtención de transformantes que expresan el gen marcador y, por tanto, incorporan el vector. Además, se puede llevar a cabo un segundo paso de selección cultivando los transformantes en un medio de selección adaptado para la selección del gen marcador seleccionable amplificable comprendido en el casete de expresión (MASM). Por ejemplo, en caso de que se utilice DHFR como gen marcador seleccionable amplificable, los transformantes se pueden cultivar en un medio exento de purina o nucleótidos en presencia de un inhibidor de DHFR. En caso de que se utilice un promotor inducible en al menos un casete de expresión, se debería proporcionar una señal de inducción correspondiente con el fin de iniciar la expresión del polipéptido. Para hacer uso del sistema de selección/amplificación de DHFR, dichas células hospedadoras se pueden cultivar en presencia de un inhibidor de DHFR. Los inhibidores de DHFR adecuados son antifolatos tales como, p. ej., MTX. La concentración de antifolato/MTX utilizada depende de la célula hospedadora y la variante de DHFR incorporada en el vector. El intervalo de concentraciones se puede seleccionar para los procedimientos de amplificación en múltiples pasos, en células hospedadoras DHFR", por ejemplo, en valores alrededor de 5 nM - 20 nM que oscilan hasta valores de 500 nM a 1000 nM o incluso superiores para los pasos de amplificación secundarios o adicionales. Para las células DHFR+ las concentraciones iniciales son habitualmente superiores en el intervalo de 100 nM a 750 nM, preferentemente 500 nM en los primeros pasos y de 500 nM a 1000 nM y superiores para los pasos de amplificación adicionales. Las variantes de DHFR adecuadas se han descrito anteriormente.

60 Para hacer uso del sistema de selección/amplificación de GS, dichas células hospedadoras se pueden cultivar en presencia de, p. ej., MSX. La concentración de MSX utilizada depende de la célula hospedadora. El intervalo de concentración se puede seleccionar entre de aproximadamente 15 a 150 micro M, de 20 a 100 micro M, y de 25 a 50 micro M. Estos intervalos son particularmente adecuados para las células NSO y CHO.

- En un paso posterior, la proteína terapéutica se puede aislar/recolectar del cultivo celular. La proteína terapéutica se puede obtener alterando la integridad física de las células hospedadoras. La proteína terapéutica también puede expresarse, p. ej., secretarse en el medio de cultivo y puede obtenerse a partir de este. También son posibles combinaciones de los respectivos métodos. De ese modo, los productos, en particular polipéptidos, se pueden producir y obtener/aislar de forma eficiente con un rendimiento elevado. La proteína terapéutica obtenida también se puede someter a pasos de procesamiento adicionales tales como, p. ej., pasos de purificación y/o modificación con el fin de producir el producto de interés con la calidad deseada.
- De acuerdo con una alternativa, dicho polipéptido de interés es secretado en el medio de cultivo celular y posteriormente aislado del medio de cultivo celular.
- 10 Las células CHO se han cultivado y recolectado de acuerdo con métodos estándar conocidos para el experto en la técnica (p. ej., *Curr. Protoc. Protein Sci.* Mayo de 2001; Capítulo 5: Unidad 5.10. *Production of recombinant proteins in mammalian cells*. Chen S, Gray D, Ma J, Subramanian S.; los medios de cultivo de CHO se describen además en *Journal of Biotechnology*, Volumen 108, Número 3, 18 de marzo de 2004, páginas 279-292: *Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11*. Martin Schröder, Kathrin Matischak, Peter Friedl.
- 15 En una realización adicional, la divulgación se refiere a los métodos descritos anteriormente, donde la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 humano (SEQ ID NO.: 16) o una variante de esta. Por ejemplo, dichas secuencias incluyen, sin carácter limitante, las siguientes secuencias:
- Los ejemplos de dichas moléculas incluyen, sin carácter limitante, los siguientes polipéptidos:
- Un polipéptido que comprende una proteína precursora del péptido Ea de IGF-1 humano, donde el aminoácido G42 se sustituye por el aminoácido serina y donde el o los aminoácidos
- 20 (1) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (2) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (3) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- 25 (4) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (5) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (6) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (7) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen o eliminan y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- 30 (8) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (9) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.
- (10) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R77 se muta a glutamina (Q).
- 35 (11) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (12) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y Q104 se mutan a glutamina (Q).
- 40 (13) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (14) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (15) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 45 (16) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R77 se muta a glutamina (Q).
- (17) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).

- (18) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (19) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 5 (20) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (21) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 10 (22) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (23) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (24) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina.
- 15 (25) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (26) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 20 (27) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (28) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (29) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 25 (1a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (2a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 30 (3a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (4a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (5a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 35 (6a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (7a) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen o eliminan y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 40 (8a) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (9a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (10a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 45 (11a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).

- (12a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y Q104 se mutan a glutamina (Q).
- (13a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 5 (14a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (15a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 10 (16a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (17a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (18a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 15 (19a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (20a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 20 (21a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (22a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (23a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 25 (24a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina.
- (25a) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 30 (26a) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (27a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (28a) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 35 (29a) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).

Además, una variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con el método divulgado es uno de los polipéptidos descritos anteriormente (1)-(29a), donde dichas moléculas, en lugar de mutarse en las posiciones 1-3, solamente el aminoácido E3 se elimina (p. ej., la molécula (28a) también se podría referir a un polipéptido que comprende una proteína precursora del péptido Ea de IGF-1 humano, donde el aminoácido G42 se sustituye por el aminoácido serina y donde el aminoácido E3 se elimina, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q), los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).)

40

Además, una variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con el método divulgado es un polipéptido que contiene una proteína precursora de IGF-1 humano, es decir, que comprende el péptido Ea de IGF-1 humano, que se fusiona a una región Fc de inmunoglobulina y donde el aminoácido glicina en la posición 42 se sustituye por otro aminoácido y donde la numeración de los aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO.: 16. El péptido E puede ser el péptido Ea, Eb o Ec (SEQ ID NO.: 17-19) y el aminoácido por el cual se sustituye la glicina en la posición 42 es serina.

45

Por tanto, en una realización, una variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con el método divulgado es un polipéptido que comprende una proteína precursora de IGF-1 humano; (a) donde el aminoácido G42 se sustituye por el aminoácido serina; y (b) que se conecta a una región Fc de inmunoglobulina, particularmente una región Fc modificada,

50

5 particularmente una región Fc, que se modifica para modular su unión al receptor de Fc. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente de modo que la región Fc tenga una afinidad alterada por el receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Las denominadas regiones Fc de inmunoglobulina silenciadas se han descrito en la técnica: LALA y N297A (Strohl, W., 2009, *Curr. Opin. Biotechnol.* vol. 20(6):685-691); y D265A (Baudino *et al.*, 2008, *J. Immunol.* 181: 6664-69; Strohl, W., *supra*). Algunos ejemplos de anticuerpos IgG1 con Fc silente comprenden la denominada LALA mutante que comprende la mutación L234A y L235A en la secuencia de aminoácidos de Fc de la IgG1. Otro ejemplo de un anticuerpo IgG1 silente comprende la mutación D265A. Otro anticuerpo IgG1 silente comprende la mutación N297A, que da como resultado anticuerpos aglicosilados/no glicosilados.

10 La estrategia de LALA mencionada anteriormente se describe con más detalle en los documentos US5 624 821 y US5 648 260 ambos de Winter *et al.* Por tanto, en una realización, la proteína precursora de hIGF-1 divulgada se fusiona a una región Fc que comprende la mutación L234A y L235A o la mutación D265A o la mutación N297A. Dichos constructos de Fc LALA, D265A o N297A tienen una actividad de ADCC reducida.

15 Por tanto, en una realización, una variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con el método divulgado es un polipéptido que contiene una proteína precursora del péptido Ea de IGF-1 humano fusionada a una región Fc de inmunoglobulina, donde el aminoácido glicina en la posición 42 se sustituye por serina, donde la variante comprende además delecciones y/o mutaciones adicionales en los aminoácidos G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 y/o M105, y donde la numeración de los aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO.: 20.

Los ejemplos de dichas moléculas incluyen, sin carácter limitante, los siguientes polipéptidos:

20 Un polipéptido que contiene una proteína precursora del péptido Ea de IGF-1 humano fusionada a una región Fc de inmunoglobulina, donde el aminoácido glicina en la posición 42 se sustituye por el aminoácido serina, donde la numeración de los aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO.: 20, y donde el o los aminoácidos

(1b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(2b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

25 (3b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(4b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(5b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(6b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

30 (7b) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen o eliminan y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(8b) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

(9b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan.

35 (10b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).

(11b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).

40 (12b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y Q104 se mutan a glutamina (Q).

(13b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).

(14b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).

45 (15b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).

(16b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R77 se muta a glutamina (Q).

- (17) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (18b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 5 (19b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (20b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 10 (21b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (22b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (23b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 15 (24b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (25b) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 20 (26b) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (27b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (28b) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 25 (29b) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (1c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 30 (2c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (3c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (4c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 35 (5c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (6c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 40 (7c) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen o eliminan y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (8c) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- (9c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan.
- 45 (10c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).

ES 2 738 641 T3

- (11c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (12c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye o elimina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y Q104 se mutan a glutamina (Q).
- 5 (13c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (14c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 10 (15c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (16c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (17c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 15 (18c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por ácido glutámico (E) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q). (19c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (20c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 20 (21c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por alanina (A) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (22c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- 25 (23c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- (24c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R37 se sustituye por prolina (P) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 30 (25c) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y el aminoácido R74 se muta a glutamina (Q).
- (26c) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 27c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74 y R77 se mutan a glutamina (Q).
- 35 (28c) G1, P2, E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- (29c) G1, P2, E3 se eliminan, el aminoácido R36 se sustituye por glutamina (Q), R37 se sustituye por alanina y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).
- 40 En otra realización, la variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con el método divulgado son proteínas que comprenden los polipéptidos descritos anteriormente (1b)-(29c), donde dichas moléculas, en lugar de mutarse en las posiciones 1-3, solamente el aminoácido E3 se elimina (p. ej., la molécula (28c) también se podría referir a un polipéptido que comprende una proteína precursora de IGF-1 humano fusionada a una región Fc de inmunoglobulina, donde el aminoácido aminoácido G42 se sustituye por el aminoácido serina y donde el o los aminoácidos E3 se eliminan, los aminoácidos R36 y R37 se sustituyen ambos por glutamina (Q) y los aminoácidos K68, S69, A70, R71 y S72 se eliminan
- 45 y los aminoácidos R74, R77 y R104 se mutan a glutamina (Q).)

En otra realización, la variante de IGF-1 que se puede producir de acuerdo con el método divulgado se refiere a los polipéptidos descritos anteriormente 1-29c, que comprenden un péptido Ea mutado compuesto por los aminoácidos

a) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG (SEQ ID. NO.: 33) o

b) VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS (SEQ ID. NO.: 34).

En una realización adicional, una variante de IGF-1 que se podría producir de acuerdo con los métodos divulgados es una proteína precursora de IGF-1 tal como se ha descrito anteriormente que se fusiona a una región Fc, donde la región Fc se puede fusionar directamente al polipéptido precursor de IGF-1 modificado o se puede conectar mediante una región de bisagra utilizando tecnologías de ADN recombinante muy conocidas en la técnica. Si se utiliza una región de bisagra de ADN, la región Fc se puede conectar a cualquier parte del polipéptido precursor de IGF-1 modificado. En una realización, la región Fc se fusiona directamente al extremo C terminal del polipéptido precursor de IGF-1 modificado. En otra realización, la región Fc se conecta al extremo C terminal del polipéptido precursor de IGF-1 modificado con un conector de Gly-Ser (-GS-).

Se puede utilizar un conector de ADN para proporcionar un sitio de restricción entre componentes para facilitar su manipulación. También se puede proporcionar un conector para potenciar la expresión del polipéptido a partir de una célula hospedadora, con el fin de disminuir el impedimento estérico de modo que el componente pueda asumir su estructura terciaria o cuaternaria óptima y/o interaccionar de forma apropiada con su molécula diana. Para encontrar conectores y métodos de identificación de espaciadores deseables, remitase, por ejemplo, a George *et al.* (2003) *Protein Engineering* 15:871-879.

Una secuencia de conector puede incluir uno o más aminoácidos conectados de forma natural a un componente receptor, o puede ser una secuencia añadida utilizada para aumentar la expresión de la proteína de fusión, proporcionar sitios de interés deseados de forma específica y permitir que los dominios de componentes formen estructuras terciarias óptimas y/o aumenten la interacción de un componente con su molécula diana. En una realización, el conector comprende una o más secuencias de péptidos que tienen entre 1-100 aminoácidos, preferentemente 1-25 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector tiene 1-5 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector es una secuencia de tres aminoácidos, más específicamente, la secuencia de tres aminoácidos de Gly Pro Gly. En otra realización, el conector es Gly-Ser.

Los ejemplos de dichas moléculas de bisagra incluyen, sin carácter limitante, los siguientes polipéptidos:

bisagra 1: CPPCPA (SEQ ID NO.: 30)

bisagra 2: DKTHTCP CPA (SEQ ID NO.: 31)

bisagra 3: EPKSCDKTHTCP CPA (SEQ ID NO.: 32)

En consecuencia, la divulgación se refiere a un método en el que se produce una variante de IGF-1 que contiene una proteína precursora de péptido Ea de IGF-1 humano que se fusiona a una región Fc de inmunoglobulina, particularmente una región Fc modificada, particularmente una región Fc, que se modifica para modular su unión al receptor de Fc, preferentemente sustituyendo uno o ambos de los aminoácidos 234 y 235 por alanina tal como se ha descrito anteriormente, donde el aminoácido glicina en posición 42 se elimina o sustituye por serina, donde la numeración de los aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO.: 20 y donde la región Fc de inmunoglobulina se fusiona a la proteína precursora de IGF-1 a través de una región de bisagra.

Los ejemplos de dichas moléculas incluyen, sin carácter limitante, los siguientes polipéptidos:

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID NO.: 23)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID NO.: 24)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ ID NO.: 25)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ ID NO.: 26)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ ID NO.: 28)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID NO.: 27)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO.: 29)

En determinados aspectos, la divulgación se refiere a los métodos descritos anteriormente, donde la célula de mamífero se selecciona del grupo compuesto por una célula de las especies *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus*. En otras realizaciones, que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula de mamífero se selecciona del grupo compuesto por células CHO (ovario de hámster chino), células COS (una línea celular procedente de riñón de mono (mono verde africano), células Vero (células epiteliales de riñón extraídas de mono verde africano), células Hela (la línea se obtuvo de células de cáncer de cérvix tomadas de Henrietta Lacks), células BHK (células renales de crías de hámster, células HEK (riñón embrionario humano), células NS0 (línea de células de mieloma murino), células C127 (línea de células de ratón no tumorigénica), células PerC6® (línea de células humanas, Crucell), células CAP (producción de amniocitos de CEVEC) y células Sp-2/0 (células de mieloma de ratón).

Las células CHO se aislaron con éxito por primera vez en 1957 (Tjio JH, Puck TT (1958) *Genetics of somatic mammalian cells*. II. *Chromosomal constitution of cells in tissue culture*. *J Exp Med* 108(2):259-268). Basándose en la línea de células CHO inmortalizadas original, se han desarrollado varios clones diferentes. La cepa CHO-K1, procedente de la línea de células original, depende del suplemento con glicina (Kao FT, Puck TT (1968) *Genetics of somatic mammalian cells*, VII. *Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 60(4):1275-1281). Las mutaciones genéticas posteriores dieron lugar a la cepa CHO-DG44, en la cual se eliminaron ambos alelos de dihidrofolato-reductasa (DHFR) (Urlaub G, Chasin LA (1980) *Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(7):4216-4220). Esta línea de células requiere glicina e hipoxantina, así como timidina para su crecimiento. Aunque la línea de células DG44 estaba destinada a la investigación, esta cepa se convirtió en uno de los sistemas de expresión de CHO más comúnmente utilizados. En un aspecto particular, la célula de mamífero utilizada en el método divulgado anteriormente es una célula de ovario de hámster chino (CHO), donde dicha célula CHO puede ser una célula derivada de CHO-K1, una célula derivada de CHO-DUXB11 o una célula CHO-DG44. Las células CHO K1 son subclones de la línea de células CHO precursora que se inició a partir de una biopsia de ovario de un hámster chino adulto en 1957 (DSMZ n.º: ACC110). Estas requieren prolina, debido a la ausencia del aparato de síntesis apropiado. Existen diversas células hospedadoras que tienen maquinarias celulares específicas y mecanismos característicos para las actividades posteriores a la traducción (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38), disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo.

En una realización particular de la invención, las células CHO son células derivadas de CHO-K1, el IGFR1 de dichas células se ha suprimido utilizando nucleasas con dedos de zinc o se ha atenuado utilizando la tecnología de interferencia de ARN y la proteína terapéutica producida en dichas células de acuerdo con el método de la invención es la proteína de IGF-1 de SEQ ID NO.: 23, o SEQ ID NO.: 24, o SEQ ID NO.: 25, o SEQ ID NO.: 26, o SEQ ID NO.: 27, o SEQ ID NO.: 28, o SEQ ID NO.: 29.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una célula de mamífero modificada genéticamente que se ha modificado para permitir una expresión superior de una proteína terapéutica recombinante heteróloga en dicha célula en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica recombinante heteróloga es un ligando de un receptor cognado endógeno expresado en dicha célula, y donde la modificación genética dio como resultado una expresión deficiente de dicho receptor cognado, y donde la expresión de la proteína terapéutica recombinante es al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más superior que en una célula en la que la expresión del receptor cognado de la proteína terapéutica se haya modificado de este modo.

En otra realización particular, la divulgación se refiere a una célula de mamífero modificada genéticamente que se ha modificado para permitir una expresión superior de una proteína terapéutica recombinante heteróloga en dicha célula en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica recombinante heteróloga es un ligando de un receptor cognado endógeno expresado en dicha célula, y donde la modificación genética dio como resultado una expresión deficiente de dicho receptor cognado y dichas células de mamífero modificadas genéticamente cuando expresan la proteína terapéutica son capaces de crecer hasta $0.5-1 \times 10^7$ células/mL o $1-1.5 \times 10^7$ células/mL o $1.5-2 \times 10^7$ células/mL o $2-2.5 \times 10^7$ o $3-3.5 \times 10^7$ células/mL o superior durante el tiempo de cultivo.

En una realización adicional, la divulgación se refiere a una célula de mamífero modificada genéticamente que se ha modificado para permitir una expresión superior de una proteína terapéutica recombinante heteróloga en dicha célula en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica recombinante heteróloga es un ligando de un receptor cognado endógeno expresado en dicha célula, y donde la modificación genética dio como resultado una expresión deficiente de dicho receptor cognado, y donde la viabilidad de dicha célula de mamífero modificada genéticamente, cuando expresa la proteína terapéutica, es superior a un 97% durante las primeras 80-110 h o 110-140 h o 140-170 h o 170-200 h o 200-230 h o 230-260 h de tiempo de cultivo.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una célula de mamífero modificada genéticamente que se ha modificado para permitir una expresión superior de una proteína terapéutica recombinante heteróloga en dicha célula, en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica recombinante heteróloga es un ligando de un receptor cognado endógeno expresado en dicha célula y donde la modificación genética dio como resultado una expresión deficiente de dicho receptor cognado y (i) donde la expresión de la proteína terapéutica recombinante es al menos un factor 1.5, o un factor 2, o un factor 3, o un factor 4, o un factor 5, o un factor 6, o un factor 7, o un factor 8, o un factor 9, o un factor 10 o más superior que en una célula que no se ha modificado de este modo (ii) y dichas células de mamífero modificadas genéticamente son capaces de crecer hasta $0.5-1 \times 10^7$ células/mL, o $1-1.5 \times 10^7$ células/mL o $1.5-2 \times 10^7$ células/mL, o $2-2.5 \times 10^7$ o $3-3.5 \times 10^7$ células/mL o superior durante el tiempo de cultivo (iii) y la viabilidad de dicha célula de mamífero modificada genéticamente es superior a un 90% durante las primeras 80-110 h o 110-140 h o 140-170 h o 170-200 h o 200-230 h o 230-260 h de tiempo de cultivo.

En otros aspectos más, la divulgación se refiere a la célula de mamífero modificada genéticamente descrita anteriormente que se ha modificado para permitir una expresión mayor de una proteína terapéutica recombinante heteróloga en dicha célula, en comparación con una célula del mismo tipo que no se ha modificado de este modo, donde la célula de mamífero se selecciona del grupo compuesto por una célula de *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus sp.*

En otra realización de la divulgación, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula de mamífero descrita anteriormente se selecciona del grupo compuesto por células CHO (ovario de hámster chino), células COS (una línea de células procedente de riñón de mono (mono verde africano), células Vero (células epiteliales de riñón extraídas de mono verde africano), células Hela (la línea se obtuvo de células de cáncer de cérvix tomadas de Henrietta Lacks), células BHK (células renales de crías de hámster, células HEK (riñón embrionario humano), células NS0 (línea celular de mieloma murino), células C127 (línea de células de ratón no tumorigénica), células PerC6® (línea de células humana, Crucell), células CAP (producción de amniocitos de CEVEC) y células Sp-2/0 (células de mieloma de ratón). En un aspecto particular, la célula de mamífero descrita anteriormente es una célula de ovario de hámster chino (CHO), donde dicha célula CHO puede ser una célula derivada de CHO-K1, una célula derivada de CHO-DUXB11 o una célula CHO-DG44.

Otro aspecto más de la divulgación incluye una célula CHO modificada genéticamente, p. ej., una célula derivada de CHO-K1 o derivada de CHO-DUXB11, que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1.

En una realización adicional, la célula CHO descrita anteriormente que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 alberga al menos una copia cromosómica o extracromosómica del gen del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de este bajo el control de un promotor heterólogo.

En otra realización más, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula CHO descrita anteriormente que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 comprende al menos una copia cromosómica o extracromosómica del gen del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de este bajo el control de un promotor heterólogo, lo que permite la expresión de al menos 1.5 veces, o 2 veces, o 3 veces, o 4 veces, o 5 veces, o 6 veces, o 7 veces, u 8 veces, o 9 veces o 10 veces más proteína del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de esta en comparación con una célula del mismo tipo en la que la expresión del IGF-1R no se ha modificado de este modo.

En otras realizaciones, que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula CHO descrita anteriormente que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 comprende al menos una copia cromosómica o extracromosómica del gen del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de este bajo el control de un promotor heterólogo y solamente genes del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 no funcionales que se han suprimido con tecnologías de recombinación genética dirigidas.

En una realización adicional, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula CHO descrita anteriormente que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 comprende al menos (i) una copia cromosómica o extracromosómica del gen del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de este bajo el control de un promotor heterólogo y (ii) moléculas de ARNpi bicatenarias que comprenden al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y donde una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria respecto a al menos una parte del ARNm que codifica IGF-1R y donde la longitud total de cada hebra separada de ARNpi puede ser de 15 a 49 nucleótidos, de 17 a 30 nucleótidos o de 19 a 25 nucleótidos y donde la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 se inhibe en al menos un 10%, 30%, 50%, 90%, 95% o 99% cuando se compara con una célula no tratada con las moléculas de ARNbc mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente divulgación. En una realización, la célula descrita anteriormente comprende al menos una molécula de ARNpi bicatenario donde la secuencia de la hebra sentido de dicha molécula se selecciona del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 1 o 3.

En una realización adicional, que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula CHO descrita anteriormente que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 comprende al menos (i) una copia cromosómica o extracromosómica del gen del factor de crecimiento insulínico 1 humano o una variante de este bajo el control de un promotor heterólogo y (ii) moléculas de ARNhc que comprenden una región de complementariedad respecto a al menos una parte del ARNm que codifica IGF-1R y donde la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 se inhibe en al menos un 10%, 30%, 50%, 90%, 95% o 99% cuando se compara con una célula no tratada con las moléculas de ARNhc mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención. En una realización, la célula descrita anteriormente comprende al menos un tipo de molécula de ARNhc seleccionada del grupo compuesto por las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

SECUENCIAS

SEQ ID	ADN/ PROT	Descripción	Secuencia
1	ADN	ARNpi de IGF1R (1) sentido	CAGUCAAAAUUGGAGAUUUTT

ES 2 738 641 T3

2	ADN	ARNpi de IGF1R (1) antisentido	AAAUCUCCAAUUUUGACUGTG
3	ADN	ARNpi de IGF1R (2) sentido	CCACAUGGGUUAAGUUAATT
4	ADN	ARNpi de IGF1R (2) antisentido	UUUAACUUAACCCAUGUGGTA
5	ADN	ARNhc de IGF1R 1	AGCTTTTCCAAAAATACCACATGGGTAAAGTTAAATCTCTTGAAATTTAACTTA ACCCATGTGGCG
6	ADN	ARNhc de IGF1R 2	AGCTTTTCCAAAAACAGCATCAAGGATGAGATGGATCTCTTGAGTCCATCTC ATCCTTGATGCG
7	ADN	ARNhc de IGF1R 3	AGCTTTTCCAAAAACTGCATGGTAGCTGAAGATTTTCTCTTGAGAAATCTTCA GCTACCATGCG
8	ADN	ARNhc de IGF1R 4	AGCTTTTCCAAAAACTGGTTTACAAGAACTAATTATCTCTTGAGTAATTAGTT CTTGTAACCG
9	ADN	ARNhc de IGF1R 5	AGCTTTTCCAAAAATACCCTTTCTTTGAGAGCAGATCTCTTGAGTCTGCTCTC AAAGAAAGGGCG
10	ADN	ARNhc de IGF1R 6	AGCTTTTCCAAAAACGGCACAACTACTGCTCCAAATCTCTTGAAATTTGGAGC AGTAGTTGTGCG
11	ADN	Sitios de reconocimiento y sitio de corte de las nucleasas con dedos de zinc del IGF1R de CHO	CCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGT GG

ES 2 738 641 T3

12	ADN	Cebador de secuenciación directo del IGF1R de CHO (en el intrón 2-3)	CTAGCCTGTCTCTGGGACAC
13	ADN	Cebador de secuenciación inverso del IGF1R de CHO (en el intrón 3-4)	CTGGATGAACCTCTGGGTGG
14	ADN	Exón 3 del IGF1R de CHO	TGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGCCTGCCTGCCCACTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCAAGAAATGTCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAG
15	ADN	Exón 3 del IGF1R de CHO e intrones flanqueantes	AAACTTAACGGCACATCCCATAGCAAACCATTTCCATAAGAAAGGACTTGCCATGTGTGTGTCCTTCCAGTGTGGGCTTACAGATGGTATTACCTGTGCA GATTTTCAGAGAAAGTGTGTTTTTCTAGCCTGTCTCTGGGACACCATTAGT GCTGGTTGTGGCAGCAGATGACCCTGGGGAGGCTGTGTAGTCTCTTCATCT CACCACCTCCTCCCCTGTTCCACAGTGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGC GAGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCT GCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTA CAAAGGCGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGG CTGGCGCTGTGTGGACCGGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAG CAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCAAGAAATGT CCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCC ATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCACAGAG GTTCATCCAGATGGGGAGGCTGTTGGAGGGTCTGACTAAGCTTGTTTTTAT GAGAATCTTGAATGGCTGGTCTGTTTCATTTCTTTGTTTGGCTTGGCTTTG TTGCTTTGAAAAGTGCTTGTAGCCCTAGAGAGGAAGAATTAGCCCTGCTG
16	PROT.	Factor de crecimiento insulínico 1 humano (hIGF-1)	GPETLCAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDL RRLEMYCAPLKPAKSA
17	PROT.	Péptido Ea	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
18	PROT.	Péptido Eb	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQI RGKKKEQRREIGSRNAECRGKKGK
19	PROT.	Péptido Ec	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK
20	PROT.	Ea de IGF-1 de origen natural sin la secuencia líder	GPETLCAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDL RRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

ES 2 738 641 T3

21	PROT.	Dominio hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc	TLCGAEVLVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSL SLSPGK
22	PROT.	Dominio hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc	TLCGAEVLVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLSPGK
23	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	TLCGAEVLVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSP GK
24	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	TLCGAEVLVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSP GK
25	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	TLCGAEVLVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSAFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 738 641 T3

26	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYQMDKHTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GK
28	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYQMDKHTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	PROT.	bisagra 1	CPPCPA
31	PROT.	bisagra 2	DKTHTCPPCPA
32	PROT.	bisagra 3	EPKSCDKTHTCPPCPA
33	PROT.	Péptido mutado 1 Ea	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASG
34	PROT.	Péptido mutado 2 Ea	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPATNKNKTKSQRKGS
35	PROT.	hIGF1-Ea-mut 3	GPTLTCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLR RLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM

36	ADN	Vector pZFN1	<p>TCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCG GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCC GCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT TTCCATTGACGTCAATGGGTGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACCGTA AATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACT TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGT CTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGG ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAATGGGCGGTAG GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAGTAGAGAA CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA AGCTGGCTAGCGCTTAAACTTAAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAAT CGCCATGGACTACAAAAGACCATGACGGTATTATAAAGATGATGACATCGATT ACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGGCA TCCACGGGTACCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCGAATCT GCATGCGTAACCTTCAATCGCTCGGCCACCTGTCCCGCCACCTGCGCACCCA CACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACC TCCGGCCACCTGTCCCGCCATACCAAGATACACACGGGCAGCCAAAAGCCCT TCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACCTTCACTCAGTCCGGCAGCAACCCG CCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGG AGGAAATTTGCCCGCTCCTGGGGCTGCAGGTGCATACCAAGATACACACCGG GATCTCGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACCTTCACTCAGTCC CGACAACCTGTCCACCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGGC TGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCTCCGACGCCCGCGCAACCCATA CCAAGATACACCTGCGGGGATCCAGCTGTTGAAGAGCGGAGCTGGAGGAGA AGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCG AGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCCGATCCTGGAGATGA AGGTGATGGAGTTCTTCAATGAAGGTGACGGCTACAGGGGAAAGCACTGG GCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCG ATTACGGCGTATCGTGGACACAAAGGCCACAGCGGGGCTACAATCTGCC TATCGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGATACGTGGAGGAGAACCGACCCG GAATAAGCACCTCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCTAGCAGCGTG ACCGAGTTCAAGTTCCTGTTGCTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAATGGCCGCTGGAGG GCGTGGAGGAGCTGCTGATCGCGCGGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGA CACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCAGAT CTTGATAACTCGAGTCTAGAGGGCCGTTAAACCCGCTGATGACCTGCAC TGTGCCTTCTAGTGGCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGCTGCCTTCT TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTAATAAAATGAGGAAAT GCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGG AGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG CGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCC GAATTTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAGTA AACTGGATGGCTTCTCGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCT CTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTGCATGATTGAACAAGATGGATT GCACGCAAGTTCTCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG GGCACAACAGACAATCGGCTGCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTACAG GCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCGGTGCCTGCAAT GAACTCAAAGACGAGGACGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACCGCCGTT CCTTGCCGAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG CTATTGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCCTGTGATCTCACCTTGTCTCTG CCGAAAGATATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGA TCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATGCATCGAGCGAGCA CGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGGCAGCATGC CCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCTGTTGCCGAATA TCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCACTGACTGCGCCGGTGGG TGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAA GAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTACGGATCGCC GCTCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGATCTTCTG AATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGATTTTCTCCTTACGCATCTGTG CGGTATTTACACCCGATACAGGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAA CCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCCGCTCATGAGACA ATAACCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACCTTCAATTTAATTT AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCCTAA CGTAGGTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT CTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAAAAAAC CACCCTACAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTT CCGAAGGTAACCTTGGCTTCAAGCAGAGCGCAGATACCAAATCTGCTTAG TGAGCCGATGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATA CTCCTGCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCCG TGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCGAGCT CGGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCT ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTCC CGAAGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGCTCGGAACAG GAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTC CTGTCGGGTTTCCGCACCTCTGACTTGAAGCGTCAATTTTTGTATGCTCGTCA GGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTACCGGTTCT CTGGGCTTTTGTGCTTCTGCTCAGATGTTCTTACTCT</p>
----	-----	--------------	---

<p>37</p>	<p>ADN</p>	<p>Vector pZFN2</p>	<p>GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTA GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAAECTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGA CCCCCGCCCAATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTG GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGA CGGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATTGGTGATGCG GTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGCCGATTT CCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACCACAAATCA ACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGC GGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTA GAGAACCCTACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG ACCCAAGCTGGCTAGCGTTAAACTTAAAGCTGATCCACTAGTCCAGTGTGGT GGAATTCGCCATGAGATCTGACTACAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATC ATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAG GAAGGTGGGCATTCATGGGGTACCGCCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCA GTGTCGAATCTGCATGCGTAACTTCAGTCTGCTCCGACCCGCTCCACCCAC ATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGA AATTTGCCCGCTCCGACGCCCTGGCCCGCATACCAAGATACACACGGGGCA GCCAAAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAACTTCCAGTCTGCTC CGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGT GACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCGACCGCTCCACCTGGCCCGCCATACCA AGATACACACGGGATCTCAGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCGTAA CTTCACTCAGTCTCCGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGGA GAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCTCCGACCC CTGACCCAGCATACCAAGATACACCTGCGGGGATCCGAGCTGTGGAAGAGC GAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCC CACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCCG ATCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTTCATGAAGGTGACCGCTGAGAGG GAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGG GCAGCCCATCGATTACGGCGTGTGCTGGACACAAAGGCCTACAGCGGGC GCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGCAAGAGATCGTGAAGG AGAACAGACCCGGAATAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTA CCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTGCTGAGCGGGCCACTTCAAG GGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGCTGAACCAAAAACCAACTGCAATG GCGCCGTGCTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGCGGCGAGATGATCAAAG CCGGCACCTGACACTGGAGGAGGTGCCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGA TCAACTTCTGATAACTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCCTGATCAGC CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGCTG CCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCTAATAAAATGTA GAAATTTGCATGCAATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCATTCTGGGGGTGGG GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT GGGATGCGCGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTATGGACAGCAA GCGAACCAGAAATGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCT GCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGG GATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGATGATTGAACA AGATGGATTGCCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGGCTGATGATGCGG CTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCCGG CTGTACGCGCAGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCCGACCTGTCCGGT GCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACG ACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGG GACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGGCGAGGATCTCTGTGATCTCAC CTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGCTGCTC ATACGCTTATCGCGCTACCTGCCCATTCGACCCCAAGCGAAACATCGCAT CGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCT GGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCAGCCCTCAA GCGGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCCTG CTTGCCGAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCATGACTGTG GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTA CGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGAC GAGTCTTCTGAATTAATTAACGCTTCAATTTCTGATGCGGATTTTTCTCCT ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATACAGGTGGCACTTTTCCGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAATAACATTCAAAATATGATCC GCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACAGCTGAAAA TTCATTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAACTCCTAACGTGAGTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTCGCGCTTG CAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGC TACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACAGCAGAGCGAGATACCAAT ACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT GCGGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATA AGGCGCAGCGCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCTCCGCTTG GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAA GCGCCACGCTTCCGAAAGGAGAAAGGGGACAGGATCCGGTAAGCGGCA GGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGG TATCTTATAGTCTGTCGGTTTTCCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTGAATTTT GTGATGCTCGTCAAGGGGGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGC CTTTTACGGTCTGGGCTTTTGTGGCTTTTGTGCTCACATGTTCTT</p>
-----------	------------	---------------------	--

ES 2 738 641 T3

38	ADN	Clon 1 derivado de CHOK1: copia Δ2	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
39	ADN	Clon 2 con supresión derivado de CHOK1: copia Δ5	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
40	ADN	Clon 3 con supresión derivado de CHOK1: copia Δ2	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
41	ADN	Clon 2 con supresión derivado de CHOK1: copia Δ22	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGCTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
42	ADN	Clon 1 con supresión derivado de CHOK1: copia con 14 nucleótidos reemplazados y 18 añadidos	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
43	ADN	Clon 3 con supresión derivado de CHOK1: copia Δ114	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG
44	ADN	Clon con supresión derivado de CHO-DUXB11: secuencia Δ22	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTTCATCCAG

45	ADN	Clon con supresión derivado de CHO-DUXB11: secuencia $\Delta 7$	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGGCACCTACA(Aggttcga)GGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATCCATGATTGTAGGAACCCAGAGGTTTCATCCAG
46	ADN	Cebador directo a medida de ARNhc	AGGCGATTAAGTTGGGTA
47	ADN	Cebador T7 para la secuenciación del vector de ARNhc (hebra inversa)	TAATACGACTCACTATAGGG

Ejemplos

La expresión de IGF-1 recombinante en líneas de células CHO da como resultado la inhibición del crecimiento celular (figuras 1, 2) y títulos bajos. La supresión/atenuación estable de IGF1-R en células CHO utilizando la tecnología de ARNhc o la tecnología de «nucleasas con dedos de zinc» dio como resultado, sorprendentemente, un crecimiento celular mejorado y títulos de proteína IGF-1 superiores (figuras 6, 7, 8, 9 y 10). Las células CHO con expresión reducida de IGF-1-R (atenuación) que se transfectaron de forma estable con plásmidos que codificaban IGF-1 produjeron un título de grupo aproximadamente 5 veces superior en comparación con las células CHO de origen natural transfectadas de forma estable. Se pudo medir un título de grupo incluso superior después de la transfección estable de líneas de células con supresión de IGF-1R. Se pudo detectar un aumento en el título de IGF-1 recombinante en un factor 5-20 en comparación con la línea de células CHO de origen natural (figura 9). En resumen, estos datos muestran que la atenuación o la supresión de genes de receptores en líneas de células de mamíferos pueden mejorar de forma significativa la producción de proteínas terapéuticas difíciles de expresar.

PARTE A: Metodología general

A continuación, se describe la presente invención por medio de ejemplos no limitantes, que constituyen, sin embargo, realizaciones preferidas de la presente invención.

I. Métodos de cultivo celular y transfección

Los métodos apropiados para transfectar y cultivar las células hospedadoras de acuerdo con la presente invención para expresar una proteína terapéutica de interés son conocidos para el experto en la técnica. Lo siguiente se divulga por medio de ejemplos.

Ejemplo 1: Cultivo celular

Se cultivan células CHO que crecen en suspensión en matraces de agitación en un medio estándar tal como se divulga en, p. ej., la patente de EE. UU. 6 048 728. Se hacen pasar las células 2 veces por semana por medio fresco y se mantienen en fase de crecimiento logarítmico a lo largo del estudio.

Ejemplo 2: Transfección

Para la transfección, se utilizaron células CHO precursoras en fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior a un 95%. Se realizaron transfecciones por electroporación (nucleofección) utilizando la tecnología Amaxa™, Nucleofector™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lonza). Se centrifugaron 5×10^6 células 10 min a 90g, y se resuspendieron en 100 μ L de reactivo de transfección ('Solución V') (Lonza). No se añadió nada (control negativo de transfección) o se añadieron 30 pmol de ARNpi o 3 μ g de vector de ADN linealizado (vector de ARNhc o vector que codifica una variante de IGF-1 (p. ej., de las SEQ ID NO.: 23-29) o una mezcla homogénea de 6 μ g o 10 μ g de ambos vectores que codifican nucleasas con dedos de zinc (pZFN1 y 2 (SEQ ID NO.: 36/37)), a las células, y la mezcla completa se transfirió en una cubeta de electroporación. Después de la nucleofección (programa: U-23), la cubeta se enjuagó con

1 mL de medio de cultivo precalentado (37 grados centígrados) y se añadieron células a 20 mL de medio precalentado en un matraz de agitación de 125 mL y se incubó durante 2 días a 37 grados centígrados y un 10% de CO₂.

Ejemplo 3: Selección con puromicina/geneticina

5 La selección se inició 48 h después de la transfección. El marcador de selección con puromicina/geneticina ubicado en el ácido nucleico del vector de expresión permite seleccionar la resistencia a puromicina/G418. Para la selección de transfectantes, las células se cultivaron en presencia de 5 µg/mL de puromicina (PAA) / 0.8 mg/mL G418 (Invitrogen) hasta que las células se recuperan hasta una viabilidad superior a un 80 por ciento. Aproximadamente cuatro/dos semanas después de la transfección y la selección con puromicina/G418, aparecen poblaciones agrupadas que constan predominantemente de células resistentes a puromicina/G418. Las células se congelaron después de la recuperación de los grupos.

Ejemplo 4: Amplificación génica de células resistentes a G418

15 Se inició una selección incluso más rigurosa de las células resistentes a G418 haciendo pasar las células a un medio de cultivo exento de G418 que contenía MTX (1 µM). Después de tres semanas de cultivo, se generó un grupo de células resistente a MTX y con producción elevada. El marcador de selección de DHFR (dihidrofolato-reductasa) permite la selección rigurosa de células con producción elevada mediante la adición del análogo del ácido fólico, metotrexato (MTX), al medio de cultivo, lo que da lugar a títulos mayores para los grupos de transfección. Después de recuperar las células de la selección con MTX, las células se congelaron y el cultivo se continuó en medio que contenía MTX a lo largo de la clonación y cribado por FACS.

20 Ejemplo 5: Establecimiento de líneas de células clonales mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS)

25 Para obtener una línea de células clonal (es decir, una línea de células derivada de una única célula), el grupo de células transfectadas se sembró en placas de 96 pocillos. Se centrifugaron 1×10^7 células por grupo transfectado o "supergrupo" (mezcla armonizada de varios grupos) y se lavaron con 5 mL de PBS enfriado (solución salina tamponada con fosfato) y se resuspendieron en 1 mL de PBS frío. Para las células transfectadas con ARNhc y pZFN, se añadió una cantidad adecuada de hIGF-1Ea 3mut marcado con Cy5. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos en la oscuridad, se lavaron posteriormente dos veces con 5 mL de PBS enfriado y se resuspendieron en 1 mL de PBS frío. Las células se filtraron y se dispensaron en un tubo de FACS para la clasificación y/o clonación. La clonación celular se llevó a cabo con un FACS Aria (Becton Dickinson). Las células CHO transfectadas con ARNhc y pZFN se sometieron a clasificación celular individual. Con el fin de seleccionar solamente células con expresión de IGF-1R menos o nada funcional, se seleccionaron solamente el 5% de células con fluorescencia de Cy5 más baja. Las células se aumentaron utilizando procedimientos estándar. Se evaluó la expresión de ARNm de IGF-1R o la presencia de mutaciones en el exón 3 de IGF-1R en los clones individuales y se retuvieron los clones con expresión de ARNm de IGF-1R más baja o con supresión de IGF-1R después del cultivo y el análisis. De estos candidatos, se seleccionó la línea de células con crecimiento apropiado en presencia de hIGF-1Ea 3mut o rhIGF-1 para la transfección con una variante de IGF-1 de los vectores codificantes de las SEQ ID NO.: 23-29. El clon con la productividad más elevada se seleccionó para la producción de la proteína recombinante. Habitualmente, la productividad se puede mejorar más estableciendo/adaptando las condiciones de cultivo, es decir, adaptando los parámetros de los bioprocesos (p. ej., temperatura, alimentaciones, oxígeno y cambio de temperatura).

Ejemplo 6: Clonación bacteriana de vectores circulares

40 Se transformaron bacterias One Shot Stbl3 (Invitrogen, catálogo C7373-03) con el vector a clonar siguiendo las instrucciones del fabricante y se extendieron en placas de agarosa que contenían una concentración adecuada de antibiótico. Los antibióticos utilizados fueron kanamicina con una concentración de 25 µg/mL o ampicilina con una concentración de 100 µg/mL. Después de la incubación durante la noche, se escogieron colonias bacterianas cultivadas de forma distinta y se expandieron en 2 mL de Caldo LB que contenía antibiótico durante 8 h, y después se expandieron en 100 mL durante 15 h. El vector de ADN se purificó utilizando el kit Endofree Plasmid Maxi (Qiagen, catálogo 12362), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia del vector requerida para la edición genómica se validó mediante secuenciación de Sanger utilizando cebadores directos e inversos con especificidad vectorial. Los vectores con la secuencia correcta se utilizaron adicionalmente.

Ejemplo 7: Experimentos de adición (*spike-in*)

50 Los cultivos celulares se hicieron pasar con una densidad de 2×10^5 células viables/mL en medio estándar (cultivo de 50 mL). Se añadió una cantidad adecuada de hIGF-1Ea 3mut o rhIGF-1 filtrado estéril (filtro de 0.22µm) para obtener una concentración final de 50 mg/L. Ambos desencadenaron la inhibición del crecimiento celular de una célula precursora de derivado de CHO-K1 y CHO-DUXB11. Las células se cultivaron en condiciones estándar y la viabilidad y densidad celular se midieron regularmente cada 24 h.

Ejemplo 8: Cultivo de células CHO transfectadas que expresan IGF-1 en un biorreactor.

55 Para el cultivo de células transfectadas que expresan IGF-1 en un biorreactor se aplicó un proceso semicontinuo. Los eventos del proceso tales como el inicio de la alimentación y el cambio de temperatura se programaron para respaldar el

crecimiento celular y para extender la fase de producción manteniendo la viabilidad (Niraj Kumar, Patrick Gammell, Martin Clynes (2007) *Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture; Cytotechnology* (2007) 53:33-46).

Ejemplo 9: Recolección de IGF-1 a partir de células CHO.

5 Como procedimiento de recolección se aplicó una técnica de separación de células estándar con filtración en profundidad seguida de filtración esterilizante. Las células CHO se cultivaron y recolectaron de acuerdo con métodos estándar conocidos para el experto en la técnica (p. ej., *Curr. Protoc. Protein Sci.* Mayo de 2001; Capítulo 5: Unidad 5.10. *Production of recombinant proteins in mammalian cells*. Chen S, Gray D, Ma J, Subramanian S; (Mahesh Prashada, Klaus Tarrach (2006) *Depth filtration: Cell clarification of bioreactor offloads, Filtration & Separation* Volumen 43, Número 7, septiembre de 2006, páginas 28-30).

II. Constructos vectoriales

15 Son factibles varios conjuntos vectoriales de acuerdo con las doctrinas de la presente invención. Como los elementos individuales del vector son conocidos en la técnica anterior, se pueden ensamblar vectores adecuados, p. ej., mediante secuenciación o amplificación y clonación apropiada de los elementos genéticos básicos y casetes de expresión en la orientación deseada. Los respectivos métodos de clonación forman parte del estado de la técnica y también la secuencia de los elementos genéticos descritos anteriormente están descritos en la técnica anterior. Posteriormente, la generación de constructos vectoriales se describe a modo de ejemplo. Sin embargo, los expertos en la técnica entienden que son adecuadas y se encuentran fácilmente disponibles varias realizaciones y formas diferentes de obtener los respectivos vectores. Todos los constructos plasmídicos (p. ej., pBW679) descritos en esta sección se basan en los vectores de expresión de mamífero descritos en el documento WO2009080720.

Ejemplo 10: constructo vectorial de ARNhc:

25 Seis oligonucleótidos molde de ARNpi de horquilla sentido (SEQ ID NO.: 5-10) y los seis antisentido correspondientes se sintetizaron; se hibridaron y se ligaron al vector de expresión pSilencer™ 2.1-U6 puro (Ambion, número de referencia AM5762) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos de ligamiento se clonaron en *E. coli* tal como se describe en el ejemplo 6, utilizando 100 µg/mL de ampicilina. Se seleccionaron y expandieron tres colonias para cada uno de los seis vectores de ARNhc. Las secuencias de los vectores de ADN purificados se validaron utilizando un cebador directo a medida (SEQ ID NO.: 46) y el cebador inverso T7 (SEQ ID NO.: 47). Los vectores de ADN con las secuencias directa e inversa correctas se linealizaron con SspI (NEB, catálogo R0132S), se purificaron con precipitaciones en isopropanol y etanol y se resuspendieron en agua exenta de nucleasas antes de la transfección. Se llevaron a cabo dos replicados de transfección para cada uno de esos seis vectores de ARNhc (por tanto, se generaron 12 grupos) y se llevó a cabo una transfección para el control de ARNhc reorganizado (incluido en el kit del vector de expresión pSilencer™ 2.1-U6 puro). Las células transfectadas se seleccionaron con puomicina (ejemplo 3). Los dos grupos correspondientes a ARNhc 1, 4 o 6 (SEQ ID NO.: 5, 8, 9) se superagruparon respectivamente y los seis grupos transfectados con los ARNhc 2, 3 y 5 (SEQ ID NO.: 6, 7, 9) se combinaron de forma homogénea en un supergrupo, antes de teñirlo con hIGF-1Ea 3 mut marcado con Cy5 y una clonación celular individual utilizando FACS (ejemplo 5).

Ejemplo 11: Diseño/producción y uso de ZFN que son específicas para el exón 3 de IGF-1R:

40 El exón 3 de IGF-1R y los intrones flanqueantes se secuenciaron en líneas celulares precursoras derivadas de CHO-K1 y CHO-DUXB11 (SEQ ID NO.: 14/15). En primer lugar, el exón 3 se secuenció basándose en la secuencia de ADNc de hámster patentado que incluye el exón 3, así como la secuencia de ratón del gen de IGF-1R. Los cebadores de PCR se diseñaron sobre partes conservadas y los productos de PCR resultantes se secuenciaron. Basándose en la secuencia del exón 3 Sigma secuenció los intrones flanqueantes del exón 3 y diseñó dos ZFN que tienen como diana el exón 3 de IGF-1R. Cada ZFN tiene como diana y se une a 18 nucleótidos ya sea en la hebra de ADN directa (en la posición 3') respectivamente la inversa (en la posición 5'). Los dos sitios de unión están separados por los cinco nucleótidos del sitio de corte (SEQ ID NO.: 11). La descripción de los productos y los métodos se encuentran disponibles en Sigma (descrito en '74188 CompoZr Custom ZFN Tech Bulletin'). Sigma también diseñó los cebadores de PCR directo e inverso en las secuencias intrónicas circundantes (SEQ ID NO.: 12 y 13) para amplificar el exón 3 de IGF-1R a nivel de ADNc, lo que dio como resultado un producto de PCR de 501 pb. Sigma proporcionó CompoZr™ (nucleasas con dedos de zinc a medida, número de producto CSTZFN-1KT, número de lote 08021019MN) que comprende 20-25 µg de dos vectores de ADN, que codifican la hebra inversa (pZFN1) respectivamente la directa (pZFN2) que reconocen la ZFN diseñada.

50 Se transformaron *E. Coli* - de acuerdo con protocolos de transformación muy conocidos - (remítase al ejemplo 6) con cada vector y se extendieron en placas de agarosa que contenían una concentración de 25 µg/mL de kanamicina. Para cada vector, se seleccionaron y expandieron 4 colonias bacterianas. Las secuencias de ZFN de las cuatro muestras de plásmidos de ADN purificadas de cada pZFN se validaron utilizando los cebadores directo T7 e inverso BHG y se agruparon. Se transfectaron 6 µg o 10 µg de una mezcla homogénea de vectores pZFN1 y pZFN2 circulares en una célula derivada de CHO-K1 y células precursoras derivadas de CHO-DUXB11 utilizando electroporación (Amaxa). Se llevaron a cabo transfecciones por triplicado para cada cantidad, lo que dio como resultado seis grupos para cada línea de células precursoras. Para medir la eficiencia de escisión de las ZFN en los grupos, se utilizó el ensayo de detección de mutaciones Surveyor (Transgenomics, catálogo 706025) en los días 3 y 10 después de la transfección (contada como día cero). El

ADN genómico de los grupos se aisló utilizando el kit Miniprep de ADN genómico de mamífero GenElute (Sigma, catálogo G1N70-1KT), el exón 3 amplificado en una reacción de PCR utilizando los cebadores de secuenciación directo e inverso de IGF-1R (SEQ ID NO.: 12 y 13). A continuación, el producto de PCR se desnaturalizó a 95 grados C. La temperatura se redujo gradualmente y algunos productos de origen natural y mutado se hibridan para formar ADN bicatenario con apareamientos incorrectos alrededor del sitio de escisión, que fue escindido por la enzima de Surveyor®. Los productos finales se analizaron utilizando un sistema de electroforesis en gel capilar (LAB901). Además del producto de PCR perfectamente coincidente de 501 pb esperado, se detectaron dos bandas de menor tamaño de aproximadamente 277 pb y 224 pb en los seis grupos de ambas líneas de células, correspondientes a los fragmentos a cada lado del sitio de corte, con lo cual se confirmó así la actividad de ZFN en las células precursoras derivadas de CHO-K1 y CHO-DUXB11. Siete días después de la transfección, los grupos se sometieron a clonación celular individual (tal como se ha descrito en el Ejemplo 5) en 10 x placas de 96 pocillos.

En total, 507 clones de la línea de células derivadas de CHO-K1 transfectadas con pZFN se evaluaron para determinar mutaciones utilizando el ensayo de detección de mutaciones Surveyor descrito anteriormente (el ADN genómico de los clones se extrae en placas de 96 pocillos utilizando el kit Extract-N-Amp Blood PCR de Sigma, catálogo XNAB2). En 42 clones se detectaron dos bandas de menor tamaño que indicaban que su genoma contiene al menos una copia mutada del exón 3. Posteriormente, se secuenció el exón 3 de IGF-1R de estos clones. Los cromatogramas de secuenciación de ADN mostraron dos señales que se solapaban de la misma intensidad, lo que indica dos copias de la secuencia diana. Seis de los 42 clones tenían mutaciones de IGF-1R en ambas copias, entre los cuales dos clones tenían mutaciones de desplazamiento del marco en ambas copias (clones 1 y 2, SEQ ID NO.: 38, 39, 41 y 42), y un clon (3) tenía una mutación de desplazamiento del marco en una copia y una delección de 114 pb en la otra (SEQ ID NO.: 40 y 43). Las secuencias de IGF-1R en esos 3 clones se confirmaron por clonación TOPO (kit de clonación TA, Invitrogen, cat. K4575-40; se recogieron 6 colonias bacterianas). Los tres clones K.O. crecían hasta densidades de células viables significativamente superiores que las células precursoras. La adición de 50 mg/mL de 'hIGF-1Ea 3mut' (SEQ ID NO.: 35) dio como resultado un comportamiento de crecimiento celular similar a las células precursoras en medio estándar (figura 8). El clon con el genotipo $\Delta 5/\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 39/41) se seleccionó para la transfección con la proteína del factor de crecimiento insulínico 1, p. ej., el IGF-1 humano (p. ej., SEQ ID NO.: 16 o 20) o una variante de esta (p. ej., SEQ ID NO.: 21-29).

La clonación celular individual de la línea celular derivada de CHO-DUXB11 transfectada con pZFN dio como resultado 117 clones que se evaluaron para determinar las mutaciones con el ensayo Surveyor tal como se ha descrito anteriormente. En total, 28 clones tuvieron al menos una copia mutada del exón 3 de IGF-1R (se detectaron dos bandas de menor tamaño), pero la secuenciación indicó que todos esos clones aún contienen copias de origen natural. Dos clones, en los que se detectaron secuencias mutadas ($\Delta 22$ o $\Delta 16$) se transfectaron una segunda vez con pZFN y se generaron seis grupos utilizando 10 μ g de pZFN mixtas. Siete días después de la transfección, estos grupos se sometieron a clasificación celular individual en 6 x placas de 96 pocillos (tal como se describe en el Ejemplo 5). En total, 211 clones se secuenciaron para determinar el exón 3 de IGF-1R (el ensayo Surveyor ya no fue posible debido a que ya existía una secuencia mutada) y se analizaron las secuencias solapantes en los cromatogramas. En total, aproximadamente un 20% de los clones tenían una secuencia de origen natural y dos mutadas (en su mayor parte delecciones alrededor del sitio de corte). Tres clones, con el genotipo $\Delta 22/\Delta 7$ /origen natural, $\Delta 16/\Delta 7$ /origen natural y $\Delta 16/\Delta 22$ /origen natural, se seleccionaron para una tercera ronda de transfección con pZFN (sus secuencias se confirmaron mediante clonación TOPO). Se llevaron a cabo dos transfecciones con 8 μ g de pZFN mixtas para cada uno de los tres clones. Después de 7-9 días, los dos grupos correspondientes a un clon se combinaron. Con el fin de enriquecer las células con IGF-1R no funcional, los tres grupos resultantes se cocultivaron 6-8 semanas en presencia de 50 mg/mL de hIGF-1Ea 3mut. Dos días antes de la clonación celular individual, las células se cultivaron sin hIGF-1Ea 3mut (para permitir la unión de hIGF-1Ea 3 mut marcada con Cy5 y seleccionar el 5% de células con fluorescencia más baja). Los tres grupos se sometieron a clasificación celular individual en 9 x placas de 96 pocillos.

Se diseñó un cebador de PCR que se unía a la secuencia de sitio de corte de origen natural en el exón 3 de IGF-1R; lo que permitió un cribado eficiente de clones mutados. La PCR se llevó a cabo junto con el cebador de secuenciación directo para IGF-1R (asumiendo que la PCR da lugar a un producto de PCR si las células contienen la secuencia de IGF-1R de origen natural). En total, se cribaron 389 clones y se secuenciaron 58 clones con PCR negativa. En 30 de esos clones no se pudo detectar la secuencia de origen natural, entre los cuales 22 clones contenían mutaciones de desplazamiento del marco (13 clones con las secuencias $\Delta 22/\Delta 7$). Su crecimiento celular con y sin cocultivo de 50 mg/mL de hIGF-1Ea 3mut se evaluó, y el clon con mejor crecimiento en presencia de hIGF-1Ea 3 mut, con el genotipo $\Delta 22/\Delta 7$ (SEQ ID NO.: 44/45), se seleccionó para la transfección con constructos de ADN que codifican las proteínas de las SEQ ID No.: 21-29.

Ejemplo 12:

Estrategia de clonación del vector pBW806 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A) (Figura 11).

El vector pBW806, que codifica el hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A, se preparó siguiendo dos pasos de clonación consecutivos. En un primer paso, el plásmido 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Ascl con el fin de extraer la región Fc sintetizada de novo. En paralelo, pBW679 (vector propiedad de Novartis) se digirió con Ascl y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector intermedio pBW805. En un segundo

paso, el plásmido 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Sse232I con el fin de extraer la región n-terminal de la proteína de fusión hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A. En paralelo, el vector intermedio pBW805 se digirió posteriormente con Sse232I y XbaI, lo que suministró la fracción estructural deseada que finalmente se ligó con el fragmento 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T, lo que dio lugar al vector de expresión final pBW806.

Estrategia de clonación del vector pBW807 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C) (Figura 12).

El vector pBW807, que codifica el hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C, se preparó siguiendo dos pasos de clonación consecutivos. En un primer paso, el plásmido 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y AscI con el fin de extraer la región Fc sintetizada de novo. En paralelo, pBW679 (vector propiedad de Novartis) se digirió con AscI y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector intermedio pBW805. En un segundo paso, el plásmido 11AARNWC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Sse232I con el fin de extraer la región n-terminal de la proteína de fusión hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C. En paralelo, el vector intermedio pBW805 se digirió posteriormente con Sse232I y XbaI, lo que suministró la fracción estructural deseada que finalmente se ligó con el fragmento 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vector propiedad de Novartis), lo que dio lugar al vector de expresión final pBW807.

Estrategia de clonación del vector pBW808 (hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_F) (Figura 13).

El vector pBW808, que codifica el hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (vector propiedad de Novartis), se preparó siguiendo dos pasos de clonación consecutivos. En un primer paso, el plásmido 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y AscI con el fin de extraer la región Fc sintetizada de novo. En paralelo, pBW679 (vector propiedad de Novartis) se digirió con AscI y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación de G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector intermedio pBW805. En un segundo paso, el plásmido 11AARNYC_hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Sse232I con el fin de extraer la región n-terminal de la proteína de fusión hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_Fc. En paralelo, el vector intermedio pBW805 se digirió posteriormente con Sse232I y XbaI, lo que suministró la fracción estructural deseada que finalmente se ligó con el fragmento 11AARNUC_hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (vector propiedad de Novartis), lo que dio lugar al vector de expresión final pBW808.

Estrategia de clonación del vector pBW809 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E) (Figura 14)

El vector pBW809, que codifica la secuencia de fusión HIGF1-EA-FC_MUT 04/2_E Fc, se preparó siguiendo dos pasos de clonación consecutivos. En un primer paso, el plásmido 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y AscI con el fin de extraer la región Fc sintetizada de novo. En paralelo, pBW679 (vector propiedad de Novartis) se digirió con AscI y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector intermedio pBW805. En un segundo paso, el plásmido 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Sse232I con el fin de extraer la región n-terminal de la proteína de fusión hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E. En paralelo, el vector intermedio pBW805 se digirió posteriormente con Sse232I y XbaI, lo que suministró la fracción estructural deseada que finalmente se ligó con el fragmento 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis), lo que dio lugar al vector de expresión final pBW809.

Estrategia de clonación del vector pBW810 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A) (Figura 15)

El vector pBW810, que codifica el hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A, se preparó siguiendo dos pasos de clonación consecutivos. En un primer paso, el plásmido 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y AscI con el fin de extraer la región Fc sintetizada de novo. En paralelo, pBW679 (vector propiedad de Novartis) se digirió con AscI y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector intermedio pBW805. En un segundo paso, el plásmido 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (vector propiedad de Novartis) se digirió con XbaI y Sse232I con el fin de extraer la región n-terminal de la proteína de fusión hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A. En paralelo, el vector intermedio pBW805 se digirió posteriormente con Sse232I y XbaI, lo que suministró la fracción estructural deseada que finalmente se ligó con el fragmento 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (vector propiedad de Novartis), lo que dio lugar al vector de expresión final pBW810.

Estrategia de clonación del vector pBW410 (hIGF1-Ea 3mut) (Figura 16)

El vector 0610900pGA4 (vector propiedad de Novartis), que codifica la secuencia de hIGF-1Ea 3mut se digirió con XbaI y MluI con el fin de extraer la secuencia codificante de IGF sintetizada de novo. En paralelo, pBW165 (vector propiedad de Novartis) se digirió con MluI y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos

elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector de expresión final pBW410.

Estrategia de clonación del vector pBW664 (hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, 77-dominio fc) (Figura 17)

El vector 0905915 (vector propiedad de Novartis), que codifica la secuencia de hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, 77-dominio fc se digirió con XbaI y Ascl con el fin de extraer la secuencia codificante de IGF sintetizada de novo. En paralelo, pBW596 (vector propiedad de Novartis) se digirió con Ascl y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector de expresión final pBW664.

Estrategia de clonación del vector pBW666 (hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-dominio fc) (Figura 18)

El vector 0950919 (vector propiedad de Novartis), que codifica la secuencia de hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-dominio fc se digirió con XbaI y Ascl con el fin de extraer la secuencia codificante de IGF sintetizada de novo. En paralelo, pBW596 (vector propiedad de Novartis) se digirió con Ascl y XbaI, lo que generó el fragmento estructural correspondiente que portaba elementos reguladores transcripcionales y traduccionales, así como un marcador de selección/amplificación G418/DHFR. Ambos elementos digeridos se ligaron por sus extremos compatibles, lo que dio como resultado el vector de expresión final pBW666.

Resultados:

La expresión de IGF-1 recombinante en líneas de células CHO da como resultado la inhibición del crecimiento celular y títulos bajos. La medición del título máximo de hIGF-1Ea 3mut fue de 8 ug/mL que corresponde a 100 mg/L de un título de anticuerpo (basado en la masa molar). Las mediciones de título promedio de un anticuerpo recombinante en un proceso en biorreactor son de aproximadamente 3 g/L. Una causa del título bajo de IGF-1 es el crecimiento celular reducido y una viabilidad celular baja de las células que expresan IGF-1. Durante un proceso de expresión de anticuerpos de la célula derivada de CHO-K1, las células crecen hasta 2×10^7 células/mL y la viabilidad celular es superior a un 97% durante las primeras 230-260 h de tiempo de cultivo. Por el contrario, las células derivadas de CHO-K1 que expresan IGF-1 crecen solamente hasta 0.5×10^7 células/mL y la viabilidad celular cae ya después de 2 días por debajo de un 97% (remítase a la figura 1).

El crecimiento celular reducido también se pudo detectar durante el cocultivo de las células derivadas de CHO-K1 no transfectadas con IGF-1. La Figura 2 muestra que las células derivadas de CHO-K1 precursoras crecen hasta 2.5×10^7 células/mL. Durante el cocultivo de las células derivadas de CHO-K1 con rhIGF1 o hIGF-1Ea 3mut (50 mg/L) el crecimiento celular también se inhibe significativamente (0.9×10^7 células/mL) (remítase a la figura 2).

En el siguiente paso, un inhibidor de tirosina-cinasa IGF-1R específico (NVPAEW541) (*In vivo antitumor activity of NVPAEW541- A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-1R kinase*; Carlos García-Echeverría et al.; *Cancer Cell*; publicado en internet el 26 de febrero, 2004 DOI: 10.1016/S1535610804000510) se añadió durante los experimentos de cocultivo hIGF-1Ea 3mut en células derivadas de CHO-DUXB11. La inhibición del crecimiento celular se pudo evitar (remítase a la figura 3). Esto verifica que el IGF-1R desencadena una señal en la célula que da como resultado una inhibición del crecimiento celular.

Para confirmar estos hallazgos, se llevó a cabo la transfección de una célula derivada de CHO-DUXB11 con ARNpi y ARNhc (ARNpi y ARNhc contra IGF-1R). Se utilizaron dos ARNpi diferentes (SEQ ID NO.: 1-4) contra IGF-1R y un ARNpi de control (reorganizado). La secuencia reorganizada se incluyó para rebajar cualesquiera cambios en el perfil de expresión genética que se pueden originar como resultado del método de suministro de ARNpi. Este ARNpi no es complementario a ningún gen conocido en la hámster chino. Ambos ARNpi evaluados redujeron el nivel de ARNm de IGF-1R de más de un 80% (remítase a la figura 4).

Para generar una línea de células que tiene una expresión reducida permanente de IGF-1R, las células derivadas de CHO-DUXB11 precursoras se transfectaron con vectores que expresaban ARNhc contra IGF-1R (SEQ ID NO.: 5-10). En total, se evaluaron 6 secuencias de ARNhc diferentes contra IGF-1R (remítase a la figura 5). Se pudo conseguir una reducción de hasta un 94% de la expresión génica de IGF-1R con esta estrategia (ARNhc4) a nivel de grupo.

Los grupos de ARNhc mostrados en la figura 5 se sometieron a clonación celular individual utilizando la técnica FACS. Esta tecnología permite la identificación y aislamiento rápidos de clones con una propiedad específica (p. ej., producción de anticuerpos elevada) a partir de una población heterogénea de células transfectadas, lo que disminuyó el esfuerzo y tiempo asociados con métodos de clonación de dilución limitante estándar (Borth N, Zeyda M, Kunert R, Katinger H. *Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. Biotechnol Bioeng.* 2000-2001;71(4):266-73.; Carroll, S.; Al-Rubeai, M. *The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. Expert Opin. Biol. Ther.* 2004, 4, 1821-1829.; Yoshikawa, T.; Nakanishi, F.; Ogura, Y.; Oi, D.; Omasa, T.; Katakura, Y.; Kishimoto, M.; Suga, K. *Flow cytometry: An improved method for the selection of highly productive geneamplified CHO cells using flow cytometry. Biotechnol. Bioeng.* 2001, 74, 435-442.; Meng, Y. G.; Liang, J.; Wong, W. L.; Chisholm, V. *Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. Gene* 2000, 242, 201-207). En este caso específico, las

células se tiñeron con hIGF-1Ea 3mut marcado con Cy5 y se clasificó el 5% más bajo de células teñidas. Estos clones mostraron una reducción dramática en la expresión de IGF-1R y aumentaron el número de células viables durante el cocultivo con hIGF-1Ea 3mut en comparación con la línea de células precursoras (remítase a las figuras 5 y 6). No obstante, aún hubo presente una inhibición del crecimiento celular (comparación directa de clones cultivados con y sin presencia de hIGF-1Ea 3mut). Como existen aún cantidades bajas de ARNm de IGF-1R presentes (detectadas por RT-PCR en tiempo real) se puede asumir que la IGF-1R aún se expresa en una cantidad inferior en la superficie celular que explica la sensibilidad remanente a IGF-1.

En el siguiente paso, se llevó a cabo una supresión de IGF-1R utilizando la técnica de nucleasas de dedos de zinc (ZFN) en líneas de células derivadas de CHO-DUXB11 y célula derivada de CHO-K1. Se diseñaron ZFN que son específicas que se unen en la región del exón 3 de IGF-1R. Dos plásmidos, cada uno de los cuales codifican una subunidad de la ZFN con especificidad por IGF-1R, se cotransfectaron en células derivadas de CHO-DUXB11 o células derivada de CHO-K1. Cada subunidad de ZFN se une a secuencias de una longitud de 18 pares de bases específicas; por lo tanto, en total, se reconoce específicamente una secuencia de 36 pb (lo que evita el corte aleatorio en otras ubicaciones del genoma). El dominio endonucleasa de FokI se rediseña para que funcione solamente como heterodímero con el fin de escindir ADN. El dímero de ZFN crea roturas bicatenarias dirigidas en el exón 3 de IGF-1R. A través del proceso celular proclive a errores de la unión de extremos no homólogos, esta rotura bicatenaria puede dar como resultado una modificación de la secuencia de ADN y, por tanto, crea una supresión funcional del gen diana. Para la célula derivada de CHO-K1 se generaron tres clones con supresión (supresión en ambos alelos): Clon 1: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 38), clon 2: $\Delta 5$ (SEQ ID NO.: 39) y clon 3: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 40), Clon 1: +18 (y sustitución de 14 pb) (SEQ ID NO.: 42), clon 2: $\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 41) y clon 3: $\Delta 114$ (SEQ ID NO.: 43).

La línea de células derivada de CHO-DUXB11 es, al contrario que la célula derivada de CHO-K1, policlonal y poliploide, lo que hizo complicada la supresión del IGF-1R (se tuvieron que suprimir más de 2 copias de IGF-1R/genoma). Los inventores han generado varios clones de supresión únicos con mutaciones de desplazamiento del marco y se validaron dos de ellas con clonación TOPO y secuenciación. Clon 12: $\Delta 7$ (50%) (SEQ ID NO.: 45)/ $\Delta 22$ (50%) (SEQ ID NO.: 44), clon 19: $\Delta 7$ (14.5%) / $\Delta 16$ (44%) / $\Delta 22$ (18%) / $\Delta 22$ mut (15%). Los porcentajes entre paréntesis se basan en la frecuencia con la que esta mutación tiene lugar a partir de 32 colonias bacterianas secuenciadas. Para el clon 19, se puede asumir que existen 6 alelos de IGF-1R (3 x $\Delta 16$, 1 x $\Delta 7$, 1 x $\Delta 22$, 1 x $\Delta 22$ mut).

Los tres clones de IGF-1R KO en células derivadas de CHO-K1 generados se cocultivaron con hIGF-1Ea 3mut y no se pudo detectar crecimiento celular (remítase a la figura 7). Los dos clones derivados de CHO-DUXB11 de IGF-1R KO generados también se cultivaron en presencia/ausencia de IGF-1. De formar similar a los clones de IGF-1R KO en CHO-K1, se pudo detectar un crecimiento celular mejorado para los clones KO en comparación con las células derivadas de CHO-DUXB11 de origen natural (remítase a la figura 8). Uno de los clones KO no mostró inhibición del crecimiento celular en presencia de IGF-1 y el otro clon KO tuvo en presencia de IGF-1 un recuento de células viables máximo similar a la célula derivada de CHO-DUXB11 sin cocultivo de IGF-1.

El clon de IGF-1R KO en una célula derivada de CHO-K1 $\Delta 5/\Delta 22$, así como el clon de IGF-1R KO en una célula derivada de CHO-DUXB11 $\Delta 7/\Delta 22$ se transfectaron con 5 candidatos de fusión de IGF-1-FC diferentes (remítase a la figura 9). Se pudo detectar un aumento en un factor 5-17 del título de proteína IGF-1-FC recombinante a nivel de grupo, en comparación con la línea de células derivada de células CHO-DUXB11/célula derivada de CHO-K1 transfectada con un candidato de fusión de IGF-1-FC diferente.

Dos de los candidatos de fusión de IGF-1-FC (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A y hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E) expresados en líneas de células con IGF-1R-KO de células derivadas de CHO-K1 o con IGF-1R-KO derivadas de CHO-DUXB11 se cultivaron en un biorreactor wave de 100 L (proceso semicontinuo y cambio de temperatura). Los grupos de IGF-1RKO de células derivadas de CHO-K1 que expresan hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 crecen hasta una densidad de células viables máx. de 3×10^7 células/mL, que es superior a un proceso AB promedio (la densidad de células en promedio es de 2.2×10^7 células/mL. En comparación con las células de origen natural derivadas de CHO-K1 que expresan IGF-1, este es un aumento en un factor 3-6 en los valores de células viables (remítase a la figura 1). Las células IGF-1RKO derivadas de CHO-DUXB11 que expresan hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 crecían hasta una densidad de células máx. de $1.5-2 \times 10^7$ células/mL, que es una densidad de células máx. superior en comparación con la línea de células derivadas de CHO-DUXB11 de origen natural.

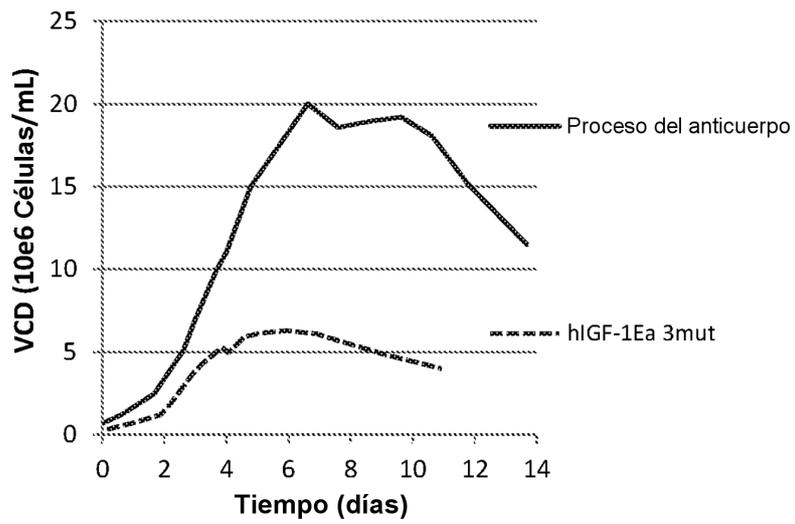
Las células IGF-1R KO derivadas de CHO-DUXB11 que expresan hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A se sometieron a clasificación celular individual y se determinaron los títulos por lote en el pocillo 24 así como en cultivos discontinuos de 50 mL. en la figura 9 el título en un matraz agitado de los 15 mejores clones de cada grupo. En total, los clones IGF-1R KO derivados de células CHO-DUXB11 tienen un título en el pocillo 24 superior en un factor 8 y un título en un matraz agitado superior en un factor 7.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína terapéutica en una célula de mamífero que expresa de forma endógena un receptor cognado de dicha proteína terapéutica recombinante y donde la unión de dicha proteína terapéutica a dicho receptor cognado da como resultado un título bajo de la proteína terapéutica, comprendiendo el método con una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor cognado de dicha proteína terapéutica y siendo transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica:
 - a. Cultivar dicha célula en condiciones que permiten la expresión de la proteína terapéutica; y
 - b. Recolectar la proteína terapéutica a partir de la célula de mamífero cultivada en el paso a,
 donde dicha célula de mamífero produce la proteína terapéutica en al menos un factor 1.5 más que la misma célula en la que la expresión del receptor cognado no se ha modificado de este modo, donde la proteína terapéutica es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) o una variante de esta cuyo receptor cognado es el receptor IGF-1R; y donde dicha célula de mamífero es deficiente en la expresión de un receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF- 1R) funcional, el receptor cognado de IGF-1 o la variante de este.
2. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la deficiencia en la expresión del receptor cognado de la proteína terapéutica en la célula de mamífero se ha logrado aplicando tecnologías de recombinación genética dirigida o interferencia de ARN.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula de mamífero es una célula CHO.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, donde la célula de mamífero es una célula derivada de CHO-K1, una célula derivada de CHO-DUXB11 o una célula CHO-DG44.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el receptor cognado es el IGF-1R y la proteína terapéutica es el IGF-1 o una variante de este y la deficiencia en la expresión del IGF-1R se ha logrado mediante el uso de una nucleasa con dedos de zinc.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el factor de crecimiento es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) humano de la SEQ ID NO.: 16 o una variante de esta.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende los pasos de
 - a. Producir una célula de mamífero que es deficiente en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico 1;
 - b. Transformar la célula del paso a. con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un IGF-1 o una variante de este;
 - c. Seleccionar la célula del paso b. que se va a transformar;
 - d. Cultivar las células seleccionada en el paso c. en condiciones que permiten la expresión de la proteína IGF-1 o una variante de esta;
 - e. Recolectar la proteína IGF-1 o la variante de esta de las células de mamífero cultivadas en el paso d, donde dicha célula de mamífero produce el IGF-1 o una variante de este al menos en un factor 1.5 más que una célula del mismo tipo que no se ha modificado tal como se describe en el paso a y donde el orden de los pasos a. y b. se puede invertir o ambos pasos se pueden llevar a cabo a la vez.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proteína terapéutica se produce a escala de fabricación industrial.
9. Uso de una célula de mamífero para la producción de una proteína terapéutica recombinante, donde dicha célula es deficiente en la expresión de un receptor cognado endógeno de dicha proteína terapéutica y donde la unión de dicha proteína terapéutica recombinante a dicho receptor cognado en la misma célula que no es deficiente en la expresión de dicho receptor cognado daría como resultado un retraso en el crecimiento de dicha célula de mamífero y/o un título bajo de la proteína terapéutica recombinante, donde la proteína terapéutica recombinante es la proteína del factor de crecimiento insulínico 1 o una variante de esta y el receptor cognado es el receptor del factor de crecimiento insulínico 1.

Figura 1:

A)



B)

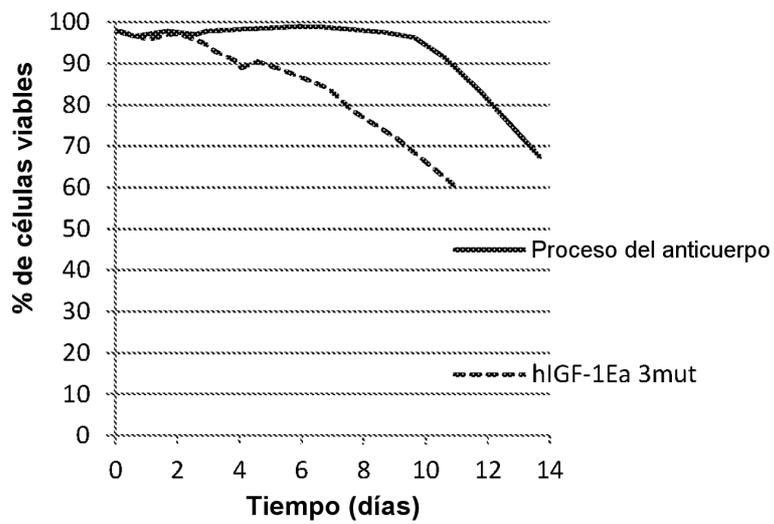
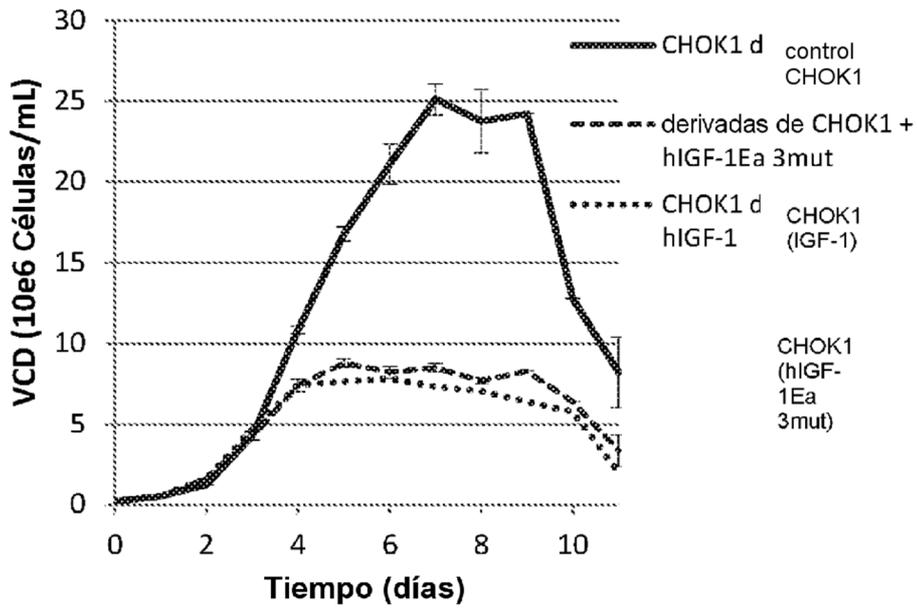


Figura 2

A)



B)

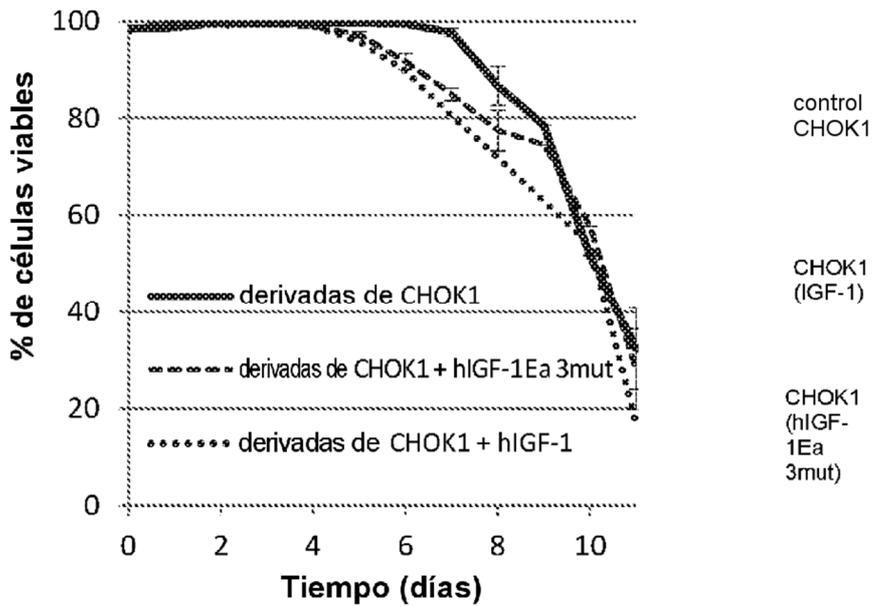


Figura 3:

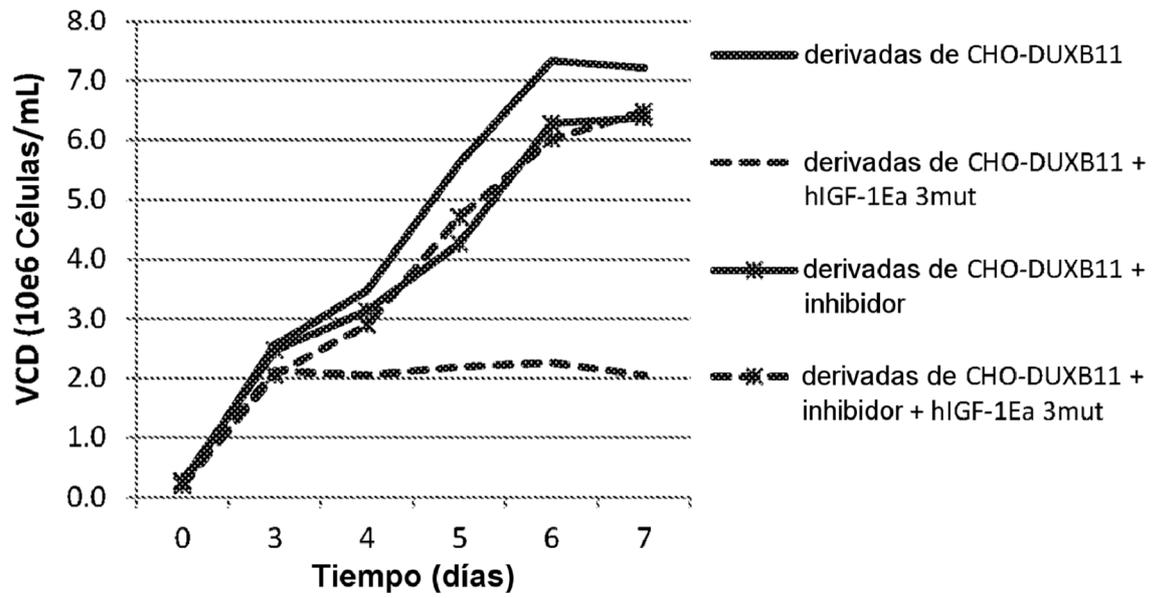


Figura 4:

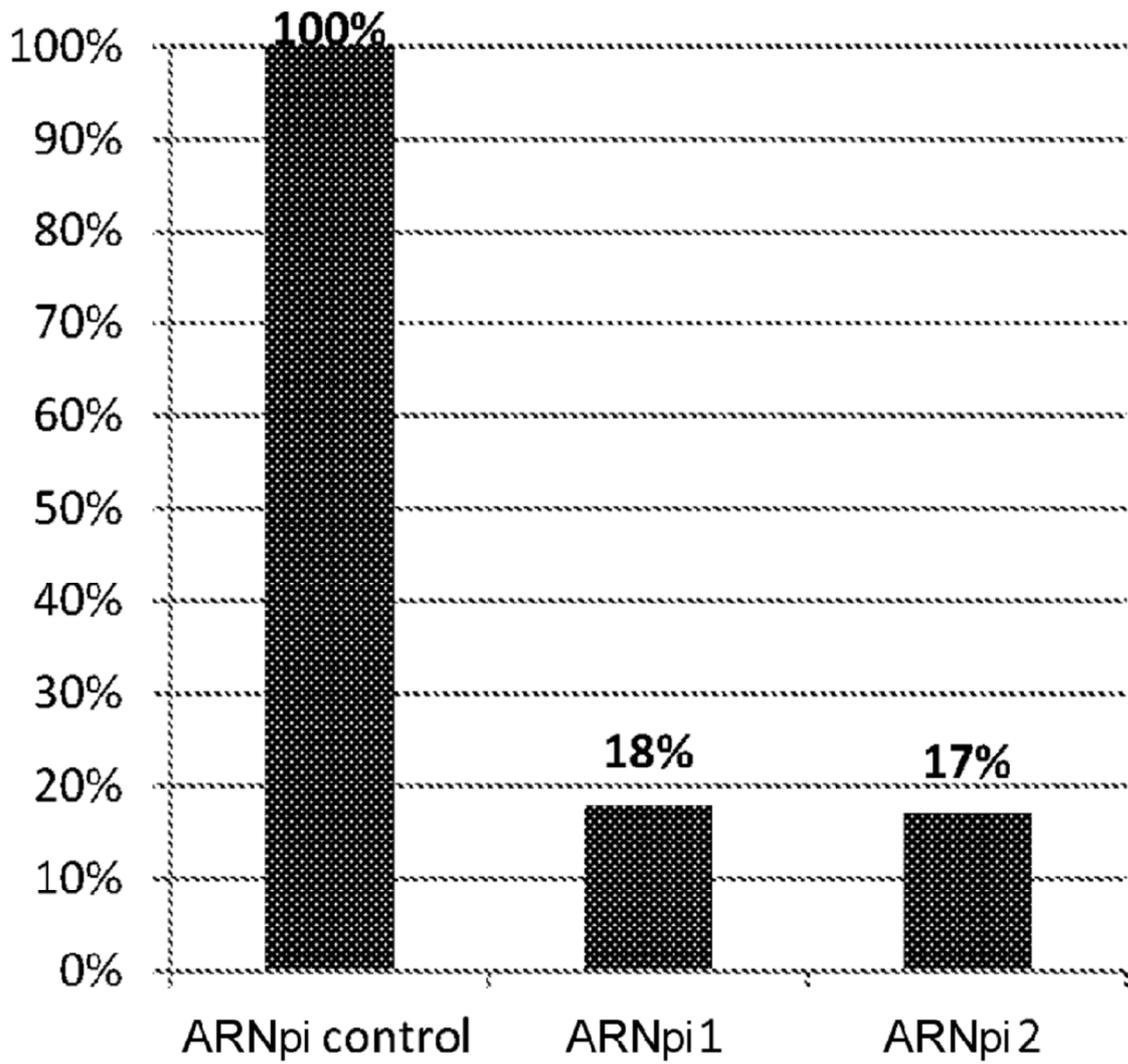


Figura 5:

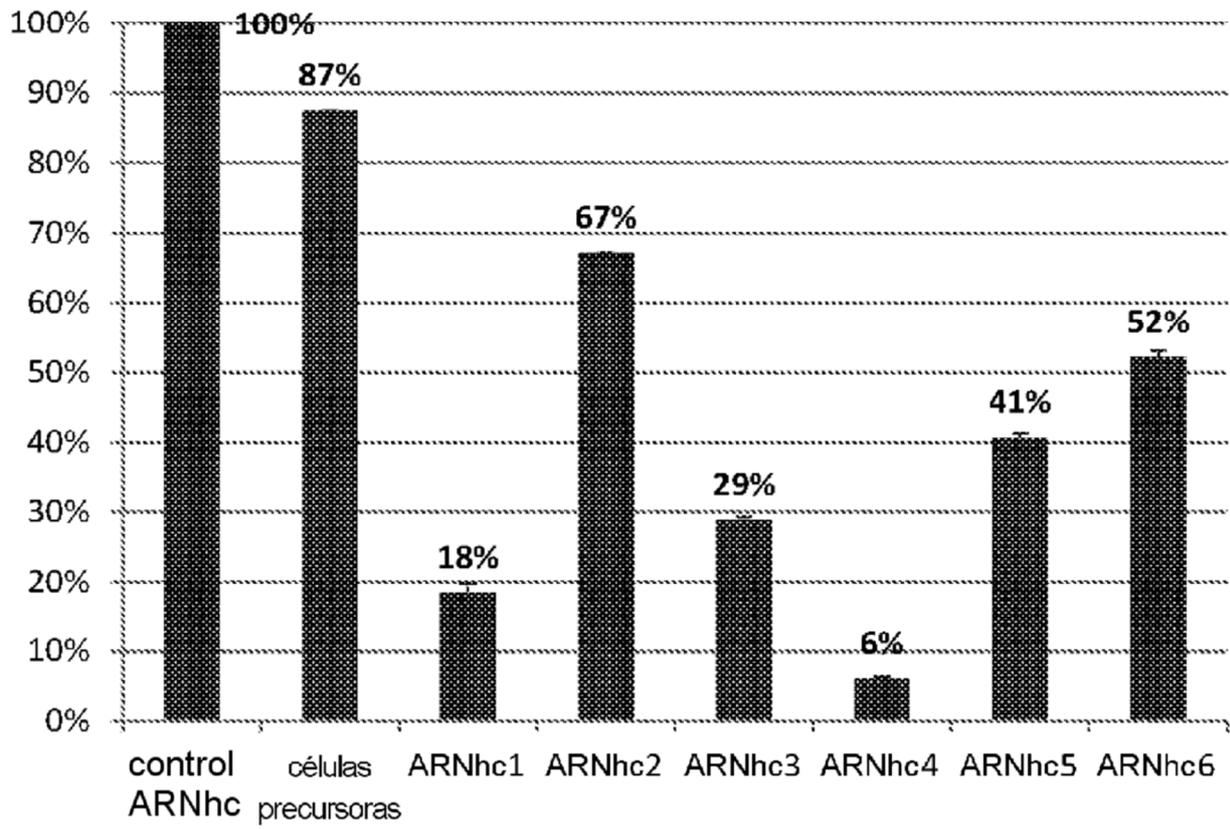


Figura 6:

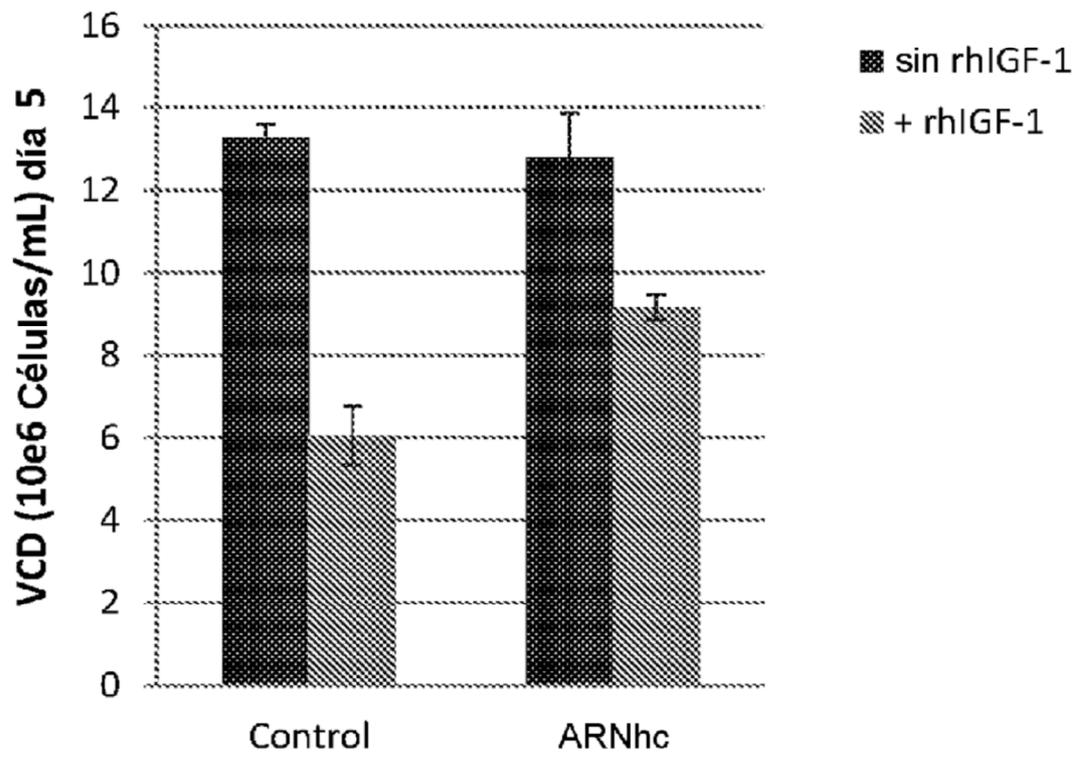


Figura 7:

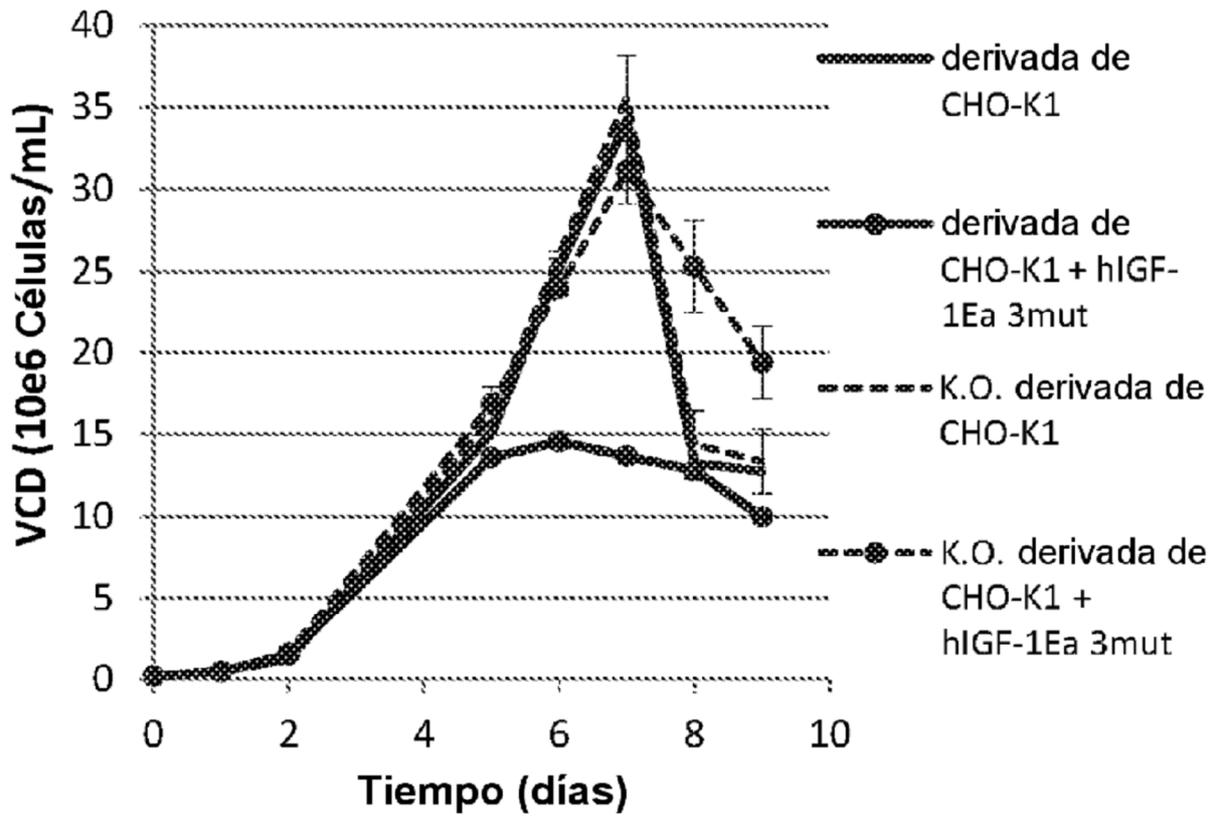


Figura 8:

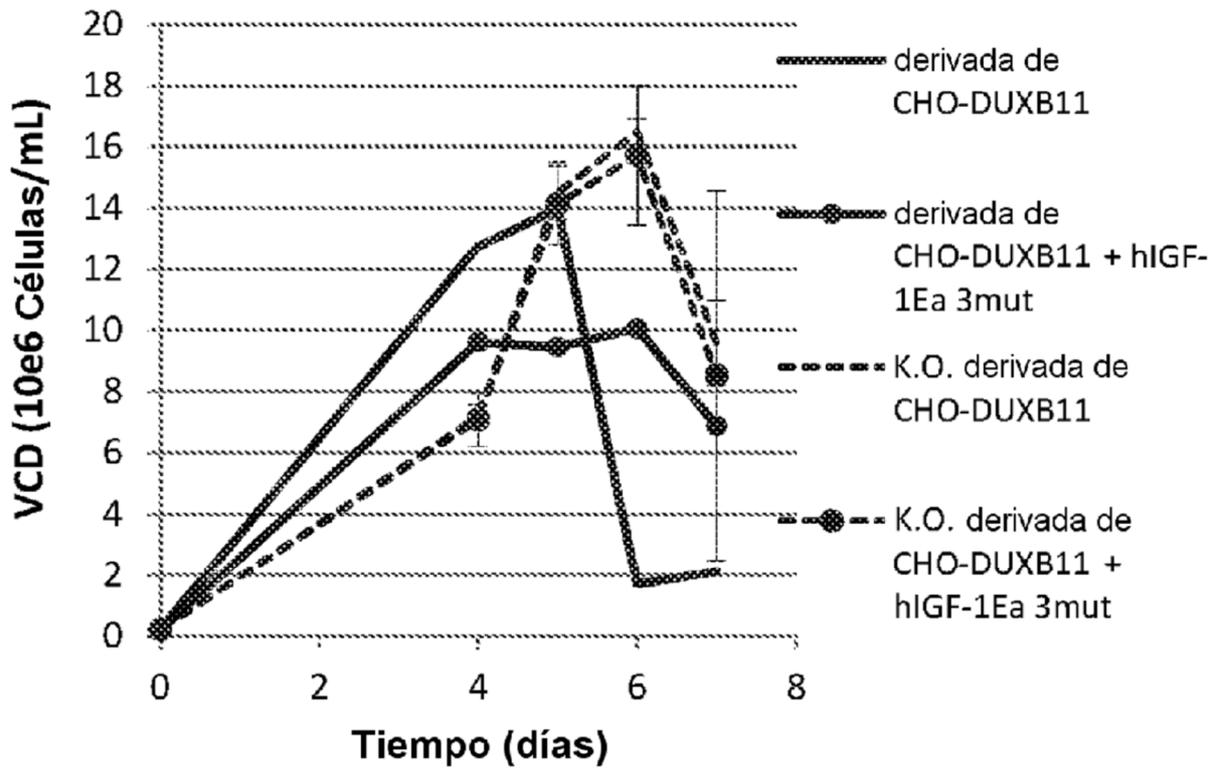
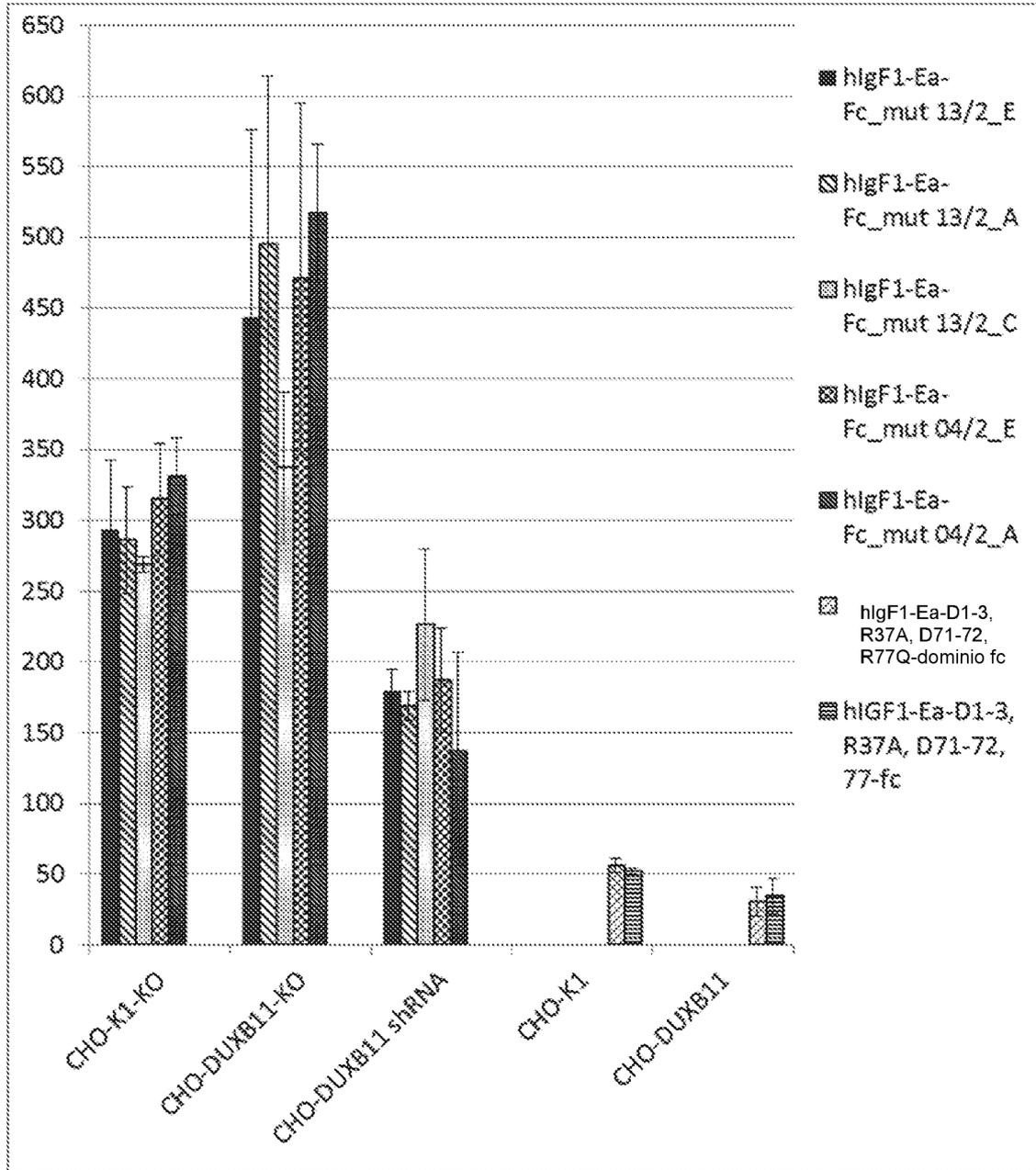


Figura 9:



D= deleción; Ea= péptido Ea; dominio fc= región Fc de inmunoglobulina

Figura 10:

