

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 670**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/US2016/019915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16138467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16710378 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3262168**

54 Título: **Modificación de proteína de células huésped**

30 Prioridad:

27.02.2015 US 201562126213 P
23.02.2016 US 201662298869 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2020

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

BURAKOV, DARYA;
GOREN, MICHAEL y
CHEN, GANG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 751 670 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

Modificación de proteína de células huésped

5 **Listado de secuencias**

La presente solicitud incluye una lista de secuencias en forma legible por computadora en un archivo llamado 10143US01_ST25.txt creado el 26 de febrero de 2016 (41,768 bytes), que se incorpora en el presente documento como referencia.

10

Campo de la invención

La invención proporciona células y procedimientos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes en células eucariotas. En particular, la invención incluye procedimientos y composiciones para la expresión de proteínas en células eucariotas, particularmente líneas celulares de hámster chino (*Cricetulus griseus*), que emplean la regulación por disminución de la expresión génica de proteínas endógenas para controlar la producción de dichas proteínas de células huésped "pegajosas" no deseadas. La invención incluye polinucleótidos y células modificadas que facilitan la purificación de una proteína recombinante exógena de interés. Los procedimientos de la invención se dirigen eficazmente a las proteínas de la célula huésped en el genoma celular del hámster chino para facilitar la expresión mejorada y estable de proteínas recombinantes expresadas por las células modificadas.

15

20

Antecedentes

Los sistemas de expresión celular tienen como objetivo proporcionar una fuente fiable y eficiente para la fabricación de productos biofarmacéuticos para uso terapéutico. La purificación de cualquier proteína recombinante producida por células eucariotas o procariontes en dichos sistemas es un desafío continuo debido, por ejemplo, a la gran cantidad de proteínas de la célula huésped y moléculas de ácido nucleico que deben eliminarse del producto final de grado farmacéutico.

25

Ciertas dinámicas de las proteínas de la célula huésped, vistas como subproductos impuros, se han estudiado durante varias etapas del bioprocesamiento. Se realizó una cromatografía líquida avanzada/espectrometría de masas (LC/MS) para detectar y monitorizar las PCH de *E. coli* que acompañan a los péptidos producidos por cultivo celular (Schenauer, MR., et al, 2013, Biotechnol Prog 29 (4): 951-7). La información obtenida por los perfiles de PCH es útil para monitorizar el desarrollo del procedimiento y evaluar la calidad y pureza del producto con el fin de evaluar los riesgos de seguridad planteados por una o más PCH (s).

30

35

Se ha demostrado que los cambios en las condiciones de cultivo celular de las células eucariotas afectan la pureza de las proteínas fabricadas, como se ve por el aumento de la cantidad de PCH de las células CHO en las alteraciones del bioprocesamiento aguas abajo (Tait, et al, 2013, Biotechnol Prog 29 (3): 688-696) El efecto perjudicial de los PS sobrantes en cualquier producto puede afectar la calidad o cantidad general, o tanto la calidad como la cantidad del producto. Los protocolos actuales buscan alterar la proteína de interés producida por la célula (por ejemplo, anticuerpo terapéutico) para eliminar la unión diferencial o la interacción con la proteína de interés y la proteína de la célula huésped (Zhang, Q. et al, mAbs, publicado en línea: 11 de febrero de 2014).

40

A pesar de la disponibilidad de numerosos sistemas de expresión celular, las líneas celulares y los sistemas diseñados que no afectan negativamente las propiedades biológicas de una proteína de interés expresada son particularmente ventajosos. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de procedimientos mejorados para la preparación de muestras de proteínas de calidad para el bioprocesamiento posterior y su posterior uso comercial.

45

50 **Sumario breve**

Se contempla el uso de herramientas de edición de genes para eliminar una proteína de la célula huésped contaminante y, por lo tanto, se proporcionan células huésped diseñadas para un procesamiento de proteínas más eficiente.

55

En un aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante, en la que la célula se modifica para disminuir los niveles de expresión de esterasa en relación con los niveles de expresión de esterasa en una célula no modificada.

60

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante, en la que la célula se modifica para que no tenga expresión de una esterasa diana.

En algunas realizaciones, la esterasa es una fosfolipasa, particularmente una proteína de tipo fosfolipasa B. En realizaciones adicionales, la fosfolipasa es una proteína 2 de tipo fosfolipasa B.

65

En algunas realizaciones, un gen de interés se agrega exógenamente a la célula huésped recombinante. En otras realizaciones, el gen añadido exógenamente codifica una proteína de interés (POI), por ejemplo, el POI se selecciona del grupo que consiste en cadena pesada de anticuerpo, cadena ligera de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y proteína de fusión Fc.

5 La invención proporciona una célula que comprende una proteína PLBD2 no funcional.

10 La invención proporciona la fabricación de una célula mediante la interrupción del objetivo PLBD2. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende una nucleasa específica del sitio para interrumpir o editar el genoma celular en un sitio o secuencia objetivo. En algunas realizaciones, el sitio objetivo de PLBD2 comprende una posición dentro de la SEQ ID NO: 33 o adyacente a una posición dentro de la SEQ ID NO: 33 seleccionada del grupo que consiste en nucleótidos que abarcan posiciones numeradas 1-20, 10-30, 20-40, 30-50, 30-60, 30-70, 40-60, 40-70, 50-70, 60-80, 70-90, 80-100, 90-110, 110-140, 120-140, 130- 150, 140-160, 150-170, 160-180, 160-180, 170-190, 180-200, 180-220, 190-230, 190-210, 200-220, 210-230, 220-240, 230-250, 240-260 y 250-270 de la SEQ ID NO: 33.

15 En otra realización, el sitio objetivo en una posición dentro de la SEQ ID NO: 33 o adyacente a una posición dentro de la SEQ ID NO: 33 se selecciona del grupo que consiste en nucleótidos que abarcan posiciones numeradas 37-56, 44-56, 33-62, 40-69, 110-139, 198-227, 182-211 y 242-271 de SEQ ID NO: 33. A este respecto, el sitio objetivo de PLBD2 está parcial o totalmente dentro o incluido por las posiciones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 provistas en este documento, y la interrupción o edición del genoma celular en el sitio o secuencia objetivo puede consistir en eliminar o insertar uno o más nucleótidos dentro de las posiciones de nucleótidos de SEQ ID NO: 33 proporcionados en el presente documento, mientras que la interrupción o la edición altera una transcripción posterior en comparación con la transcrita desde una célula de tipo salvaje (es decir, una célula libre de interrupción genómica o edición de genes). En algunas realizaciones, la transcripción posterior de un gen alterado da como resultado un desplazamiento de marco de la proteína traducida. En algunas realizaciones, la transcripción posterior de un gen alterado da como resultado una proteína alterada que está sujeta a degradación, no es detectable por un procedimiento estándar tal como espectrometría de masas, o no tiene actividad detectable. En algunas realizaciones, la interrupción o edición dirigida ocurre en ambos alelos del gen (es decir, interrupción bialélica o alteración bialélica).

20 En ciertas realizaciones, la célula integra además una secuencia de ácido nucleico exógeno. En otras realizaciones, la célula es capaz de producir una proteína exógena de interés. En otras realizaciones más, la proteína alterada que resulta de un gen alterado no se une a la proteína de interés producida por la célula.

25 En otro aspecto, se proporciona una célula aislada de ovario de hámster chino (CHO) que comprende una secuencia de ácido nucleico diseñada que comprende una variante del gen PLBD2 (tal como una variante de SEQ ID NO: 33). En una realización, el gen PLBD2 comprende GACAGTCACG TGGCCCGACT GAGGCACGCG, nucleótidos 1-30 de SEQ ID NO: 33 (SEQ ID NO: 44). En otra realización, el gen PLBD2 está diseñado para interrumpir la expresión del marco de lectura abierto. En otras realizaciones, la invención proporciona una célula CHO aislada que comprende (a) un gen PLBD2 alterado que comprende GACAGTCACG TGGCCCGACT GAGGCACGCG (SEQ ID NO: 44, también nucleótidos 1-30 de SEQ ID NO: 33), (b) un gen de esterasa alterado que comprende un nucleótido que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos en la Tabla 1, o (c) un fragmento de proteína de la Tabla 1 expresado por un gen PLBD2 alterado; y una secuencia de ácido nucleico exógeno que comprende un gen de interés.

30 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir una proteína de interés usando una célula huésped recombinante, en el que la célula huésped se modifica para disminuir los niveles de expresión de esterasa en relación con los niveles de expresión de esterasa en una célula no modificada.

35 En otra realización, el procedimiento comprende la célula huésped modificada que tiene una expresión de esterasa disminuida y una secuencia de ácido nucleico exógena que comprende un gen de interés (GDI).

40 En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico exógeno comprende uno o más genes de interés. En algunas realizaciones, el uno o más genes de interés se seleccionan del grupo que consiste en un primer GDI, un segundo GDI y un tercer GDI.

45 En otro aspecto, la invención proporciona sistemas de expresión que comprenden la célula huésped recombinante que comprende esterasa modificada o no funcional.

50 En otra realización más, la célula comprende un GDI operativamente unido a un promotor capaz de dirigir la expresión del GDI, en el que el promotor comprende un promotor eucariota que puede regularse mediante un activador o inhibidor. En otras realizaciones, el promotor eucariota está operativamente unido a un operador procariota, y la célula eucariota opcionalmente comprende además una proteína represora procariota.

55

60

65

- En otra realización, la célula huésped modificada expresa uno o más marcadores seleccionables. En algunas realizaciones, los genes de interés y/o el uno o más marcadores seleccionables están operativamente unidos a un promotor, en el que el promotor puede ser igual o diferente. En otra realización, el promotor comprende un promotor eucariota (tal como, por ejemplo, un promotor CMV o un promotor tardío SV40), opcionalmente controlado por un operador procariota (tal como, por ejemplo, un operador tet). En otras realizaciones, la célula comprende además un gen que codifica un represor procariota (tal como, por ejemplo, un represor tet).
- En un aspecto, se proporciona una célula huésped CHO, que comprende sitios de reconocimiento de recombinasa. En algunas realizaciones, los sitios de reconocimiento de recombinasa se seleccionan de un sitio LoxP, un sitio Lox511, un sitio *Lox2272*, un sitio *Lox2372*, un sitio *Lox5171*, y un sitio *frt*.
- En otra realización, la célula comprende además un gen capaz de expresar una recombinasa. En algunas realizaciones, la recombinasa es una recombinasa Cre.
- En una realización, el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a fármacos. En otra realización, el gen de resistencia a fármacos es un gen de resistencia a neomicina o un gen de resistencia a higromicina. En otra realización, el segundo y tercer genes marcadores seleccionables codifican dos proteínas fluorescentes diferentes. En una realización, las dos proteínas fluorescentes diferentes se seleccionan del grupo que consiste en *Discosoma* coral (DsRed), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), proteína ciano fluorescente (CFP), proteína ciano fluorescente mejorada (eCFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla mejorada (eYFP) y proteína fluorescente de color rojo lejano (mKate).
- En una realización, el primer, segundo y tercer promotores son iguales. En otra realización, los promotores primero, segundo y tercero son diferentes entre sí. En otra realización, el primer promotor es diferente del segundo y tercer promotores, y el segundo y tercer promotores son iguales. En más realizaciones, el primer promotor es un promotor tardío SV40, y el segundo y tercer promotores son cada uno un promotor de CMV humano. En otras realizaciones, el primer y segundo promotores están operablemente unidos a un operador procariota.
- En una realización, la línea celular huésped tiene un gen añadido de forma exógena que codifica una recombinasa integrada en su genoma, unida operativamente a un promotor. En otra realización, la recombinasa es Cre recombinasa. En otra realización, la célula huésped tiene un gen que codifica una proteína reguladora integrada en su genoma, unida operativamente a un promotor. En más realizaciones, la proteína reguladora es una proteína represora tet.
- En una realización, el primer GDI y el segundo GDI codifican una cadena ligera, o fragmento del mismo, de un anticuerpo o una cadena pesada, o fragmento del mismo, de un anticuerpo. En otra realización, el primer GDI codifica una cadena ligera de un anticuerpo y el segundo GDI codifica una cadena pesada de un anticuerpo.
- En ciertas realizaciones, el primer, segundo y tercer GDI codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una primera cadena ligera, o fragmento de la misma, una segunda cadena ligera, o fragmento de la misma y una cadena pesada, o fragmento de la misma. En otra realización más, el primer, segundo y tercer GDI codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una cadena ligera, o un fragmento de la misma, una primera cadena pesada, o un fragmento de la misma y una segunda cadena pesada, o un fragmento de la misma.
- En un aspecto, se proporciona un procedimiento para hacer una proteína de interés, que comprende (a) introducir en una célula huésped CHO un gen de interés (GDI), en el que el GDI se integra en un locus específico tal como un locus descrito en la patente de Estados Unidos n.º 7771997B2, emitida el 10 de agosto de 2010 u otro locus de integración estable y/o potenciador de la expresión; (b) cultivar la célula de (a) en condiciones que permitan la expresión del GDI; y (c) recuperar la proteína de interés. En una realización, la proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en una subunidad de una inmunoglobulina, o fragmento de la misma, y un receptor, o fragmento de unión a ligando de la misma. En ciertas realizaciones, la proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de la misma.
- En ciertas realizaciones, el genoma de la célula huésped CHO comprende modificaciones adicionales, y comprende uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa como se ha descrito anteriormente, y el GDI se introduce en un locus específico a través de la acción de una recombinasa que reconoce el sitio de reconocimiento de recombinasa.
- En algunas realizaciones, el GDI se introduce en la célula empleando un vector de direccionamiento para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) cuando el genoma de la célula huésped CHO comprende al menos una secuencia de reconocimiento exógeno dentro de un locus específico.
- En otra realización, el GDI se introduce en la célula empleando un vector de orientación para la recombinación homóloga, y en el que el vector de orientación comprende un brazo de homología 5' homólogo a una secuencia presente en el locus específico, un GDI y un brazo de homología 3' homólogo a una secuencia presente en el locus

específico. En otra realización, el vector de direccionamiento comprende además dos, tres, cuatro o cinco o más genes de interés. En otra realización, uno o más de los genes de interés están operablemente unidos a un promotor.

5 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para modificar un genoma de células CHO para integrar una secuencia de ácido nucleico exógeno, que comprende la etapa de introducir en la célula un vehículo que comprende una secuencia de ácido nucleico exógeno en el que el ácido nucleico exógeno se integra dentro de un locus del genoma.

10 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación de proteína estable que comprende los pasos de: (a) extraer una fracción de proteína de la célula huésped modificada de la invención que tiene una expresión disminuida o ablacionada de esterasa, (b) contactar la proteína fracción que comprende una proteína de interés con una columna seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de afinidad de proteína A (PA), intercambio catiónico (CEX) y de intercambio aniónico (AEX), (c) recolectar la proteína de interés del medio, en el que el nivel de la actividad esterasa está asociado con la fracción de proteína recogida en la etapa (c),
15 proporcionando así una formulación de proteína estable.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para reducir la actividad de esterasa en una formulación de proteína que comprende los pasos de: (a) modificar una célula huésped para disminuir o eliminar la expresión de esterasa, (b) transfectar la célula huésped con una proteína de interés, (c) extraer una fracción de proteína de la célula huésped modificada, (c) contactar la fracción de proteína que comprende la proteína de interés con una columna seleccionada del grupo que consiste en afinidad de proteína A (PA), intercambio catiónico (CEX) e intercambio aniónico (AEX) cromatografía, (d) recolectar la proteína de interés de los medios, y (e) combinar la proteína de interés con un éster de ácido graso, y opcionalmente un tampón y estabilizador térmico, proporcionando así una formulación de proteína esencialmente libre de esterasa detectable actividad. En algunas realizaciones, la formulación de proteína está esencialmente libre de proteína PLBD2 o actividad PLBD2.
20
25

En otro aspecto más, se proporciona un procedimiento para modificar un genoma de células CHO para expresar un agente terapéutico que comprende un vehículo para introducir, en el genoma, un ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia para la expresión del agente terapéutico, en el que el vehículo comprende un brazo de homología 5' homólogo a una secuencia presente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33, un ácido nucleico que codifica el agente terapéutico, y un brazo de homología 3' homólogo a una secuencia presente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33.
30

En un aspecto más, la invención proporciona una célula huésped CHO modificada que comprende un genoma CHO modificado en el que el genoma CHO se modifica mediante la interrupción de la secuencia diana dentro de una secuencia de nucleótidos al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 33.
35

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped eucariota modificada que comprende un genoma eucariota modificado en el que el genoma eucariota se modifica en una secuencia diana en una región codificante del gen PLBD2 por una nucleasa específica del sitio. En algunas realizaciones, la nucleasa específica del sitio comprende una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), un dímero de ZFN, una nucleasa efectora activadora de la transcripción (TALEN), una proteína de fusión del dominio efector TAL o una endonucleasa de ADN guiada por ARN. La invención también proporciona procedimientos para fabricar dicha célula huésped eucariota modificada.
40

45 En cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente, la secuencia objetivo puede colocarse en la orientación indicada como en la SEQ ID NO: 33, o en el reverso de la orientación de la SEQ ID NO: 33.

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende un gen PLBD2 alterado. En algunas realizaciones, se proporciona una célula huésped recombinante en la que el gen PLBD2 se altera por la interrupción de una región codificante. En otras realizaciones, la región de codificación interrumpida está dentro de la secuencia de nucleótidos de exón seleccionada del grupo que consiste en Exón 1, Exón 2, Exón 3, Exón 4, Exón 5, Exón 6, Exón 7, Exón 8, Exón 9, Exón 10, Exón 11 y Exón 12. En ciertas realizaciones, la región de codificación interrumpida está dentro de la secuencia de nucleótidos de exón seleccionada del grupo que consiste en Exón 1 y Exón 2.
50
55

En una realización, se proporciona una célula huésped recombinante en la que la alteración del gen PLBD2 comprende una alteración bialélica.

En otra realización, se proporciona una célula huésped recombinante en la que la alteración del gen PLBD2 comprende una delección de 1 o más pares de bases, 2 o más pares de bases, 3 o más pares de bases, 4 o más pares de bases, 5 o más pares de bases, 6 o más pares de bases, 7 o más pares de bases, 8 o más pares de bases, 9 o más pares de bases, 10 o más pares de bases, 11 o más pares de bases, 12 o más pares de bases, 13 o más pares de bases, 14 o más pares de bases, 15 o más pares de bases, 16 o más pares de bases, 17 o más pares de bases, 18 o más pares de bases, 19 o más pares de bases o 20 o más pares de bases.
60
65

Cualquiera de los aspectos y realizaciones de la invención puede usarse junto con cualquier otro aspecto o realización de la invención, a menos que se especifique lo contrario o sea evidente por el contexto.

Otros objetos y ventajas se harán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

5

Breve descripción de los dibujos

10 **La figura 1** representa los resultados de los experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa Taqman® (PCRC) para detectar genómica (ADNg) o transcripciones (ARNm) de los clones modificados. Los cebadores y las sondas se diseñaron para flanquear las secuencias predichas como sujetas a la interrupción dirigida dentro del exón 1, ya sea comenzando en el nucleótido 37 (ARNsg1) o comenzando en el nucleótido 44 (ARNsg2) de la SEC ID NO: 33. Se grafica la cantidad relativa de amplicones de clones a los que se dirige ARNsg1 o ARNsg2 (es decir, en relación con los amplicones derivados de los clones de transfección de control negativo que no estaban sujetos a ARNsg o ARNsg incomparable). El clon 1, por ejemplo, no tiene relativamente ADNg amplificado ni ARNm por PCRC de la región del exón 1 objetivo. El clon 1 y varios otros clones se seleccionaron para el análisis de seguimiento.

20 **La figura 2A** y **la figura 2B** ilustran los resultados de un análisis de PCR adicional de una población de células Clone 1 en comparación con las células de ovario de hámster chino salvaje (CHO). **La figura 2A** muestra un amplicón de PCR del clon 1 que tiene una longitud más corta (pb) en comparación con el amplicón del ADN genómico de las células de tipo salvaje. **La figura 2B** muestra un amplicón de PCR del clon 1 que tiene una longitud más corta (pb) en comparación con el amplicón de ARNm de células de tipo salvaje. La secuenciación confirmó una delección de 11 pb en el gen PLBD2 del Clon 1.

25 **La figura 3** ilustra el título relativo de proteína de las células Clone 1 (RS001) que expresan el anticuerpo monoclonal 1 (mAb1) o las células CHO de tipo salvaje que expresan mAb1 (RS0WT) sujetas a las mismas condiciones de cultivo alimentado por lotes durante 12 días. Se extrajeron muestras de medio acondicionado para cada cultivo, y la fracción de unión a la proteína A se cuantificó en los días 0, 3, 5, 7, 10 y 13.

30 **La figura 4** muestra los resultados de las células RS001 o RS0WT después del cultivo de producción y la purificación de proteínas usando la proteína A (PA) sola o la cromatografía de intercambio aniónico (AEX) y PA. El mAb1 purificado con PA de RS001 y RS0WT se analizó para determinar la abundancia de lipasa usando espectrometría de masas de digestión con tripsina. Como tal, los digeridos de tripsina de mAb1 producido por RS001 y RS0WT se inyectaron en una columna de cromatografía líquida de fase inversa acoplada a un conjunto de espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para controlar un fragmento de producto PLBD2 específico (como en la Tabla 1). Las reacciones de control que contienen muestras de referencia de mAb1 (sin PLBD2 endógeno) enriquecidas con cantidades variables de PLBD2 recombinante también se analizaron y se representaron gráficamente. Las señales detectadas en los experimentos se compararon con las reacciones de control para determinar la concentración de PLBD2. El mAb1 producido a partir del Clon 1 no muestra cantidades detectables de PLBD2 cuando se purifica con PA solo.

40

Descripción detallada

45 Antes de que se describan los procedimientos presentes, debe entenderse que esta invención no se limita a procedimientos particulares, y condiciones experimentales descritas, ya que tales procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un procedimiento" incluye uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción.

55 A menos que se defina lo contrario, o se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

60 Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen procedimientos y materiales particulares. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Definiciones

65

- La frase "gen añadido exógenamente" o "ácido nucleico añadido exógenamente" se refiere a cualquier secuencia de ADN o gen no presente dentro del genoma de la célula como se encuentra en la naturaleza. por ejemplo, un "gen añadido exógenamente" dentro de un genoma CHO, puede ser un gen de cualquier otra especie (por ejemplo, un gen humano), un gen quimérico (por ejemplo, humano/ratón), o un gen de hámster que no se encuentra en la naturaleza dentro del locus CHO particular en el que se inserta el gen (es decir,, un gen de hámster de otro locus en el genoma del hámster), o cualquier otro gen que no se encuentre en la naturaleza para existir dentro de un locus CHO de interés.
- Porcentaje de identidad, cuando se describe una esterasa, por ejemplo, una proteína o gen de fosfolipasa, como SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33, respectivamente, está destinado a incluir secuencias homólogas que muestran la identidad recitada a lo largo de regiones de homología contigua, pero la presencia de espacios, deleciones o inserciones que no tener homólogo en la secuencia comparada no se tienen en cuenta al calcular el porcentaje de identidad.
- Una determinación de "porcentaje de identidad" entre, por ejemplo, SEQ ID NO: 32 con un homólogo de especie no incluiría una comparación de secuencias donde el homólogo de especie no tiene una secuencia homóloga para comparar en una alineación (es decir,, SEQ ID NO: 32 en comparación con un fragmento del mismo, o el homólogo de la especie tiene una brecha o deleción, según sea el caso). Por lo tanto, el "porcentaje de identidad" no incluye penalizaciones por huecos, eliminaciones e inserciones.
- La "interrupción dirigida" de un gen o secuencia de ácido nucleico se refiere a procedimientos de direccionamiento de genes que dirigen la escisión o ruptura (como rupturas bicatenarias) en el ADN genómico y, por lo tanto, provocan una modificación en la secuencia de codificación de dicho gen o secuencia de ácido nucleico. Los sitios de destino de genes son los sitios seleccionados para escisión o ruptura por una nucleasa. La ruptura del ADN normalmente se repara mediante la vía de reparación del ADN de unión final no homóloga (NHEJ). Durante la reparación de NHEJ, pueden ocurrir inserciones o deleciones (InDels), como tal, se inserta o elimina un pequeño número de nucleótidos al azar en el sitio de la ruptura y estos InDels pueden cambiar o interrumpir el marco de lectura abierto (ORF) del gen objetivo. Los cambios en el ORF pueden causar cambios significativos en la secuencia de aminoácidos resultante aguas abajo de la ruptura del ADN, o pueden introducir un codón de parada prematuro, por lo tanto, la proteína expresada, si la hay, se vuelve no funcional o está sujeta a degradación.
- La "inserción dirigida" se refiere a los procedimientos de selección de genes empleados para dirigir la inserción o integración de un gen o secuencia de ácido nucleico a una ubicación específica en el genoma, es decir,, para dirigir el ADN a un sitio específico entre dos nucleótidos en una cadena de polinucleótidos contigua. La inserción dirigida también se puede realizar para introducir una pequeña cantidad de nucleótidos o para introducir un casete de genes completo, que incluye múltiples genes, elementos reguladores y/o secuencias de ácido nucleico. "Inserción" e "integración" se usan indistintamente.
- "Sitio de reconocimiento" o "secuencia de reconocimiento" es una secuencia de ADN específica reconocida por una nucleasa u otra enzima para unir y dirigir la escisión específica del sitio de la cadena principal de ADN. Las endonucleasas escinden el ADN dentro de una molécula de ADN. Los sitios de reconocimiento también se denominan en la técnica como sitios objetivo de reconocimiento.
- Los polisorbatos son ésteres de ácido graso de sorbitán o iso-sorbido (mono- o diésteres de polioxietileno sorbitano o iso-sorbido). El polioxietileno sirve como el grupo principal hidrofílico y el ácido graso como la cola hidrofóbica lipofílica. La efectividad como tensioactivo del polisorbato depende de la naturaleza anfifílica de la molécula con la cabeza hidrofílica y la cola hidrofóbica presentes (en una sola molécula). Cuando un polisorbato se degrada (hidroliza) en su grupo de cabeza componente y cola de ácido graso, pierde su efectividad como estabilizador de proteínas, lo que potencialmente permite la agregación y la posterior formación de partículas subvisibles (SVP) es un indicador de dicha degradación. Los SVP pueden atribuirse a la inmunogenicidad. Las autoridades reguladoras como la United States Food and Drug Administration (USFDA) establecen limitaciones en el número de partículas subvisibles (SVP) permitidas en una formulación farmacéutica. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) publica estándares para la fuerza, la pureza y la calidad de los medicamentos y los ingredientes de los medicamentos, así como los ingredientes alimentarios y los suplementos dietéticos.
- La frase "actividad esterasa" se refiere a la actividad enzimática de una enzima hidrolasa que escinde (hidroliza) los ésteres, como los ésteres de ácidos grasos, en ácidos (es decir, ácidos grasos libres) y alcoholes (es decir, compuestos que contienen éster).
- La fracción de unión a proteína A se refiere a la fracción de lisado celular de células cultivadas que expresa una proteína de interés que se une a un formato de afinidad de proteína A. Se entiende bien en la técnica que la cromatografía de afinidad de proteína A, tal como el medio de cromatografía de proteína A, tal como resinas, perlas, columnas y similares, se utilizan para capturar proteínas que contienen Fc debido a su afinidad con la proteína A.
- La proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2) se refiere a los homólogos de un gen de fosfolipasa conocido como NCBI RefSeq. XM_003510812.2 (SEQ ID NO: 33) o proteína conocida como NCBI RefSeq. XP_003510860.1 (SEQ

ID NO: 32), y se describe adicionalmente en el presente documento. PLBD2 también se conoce en la técnica como supuesta proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBL2), proteína de 76 kDa, proteína de tipo LAMA, homólogo PLB 2, homólogo 2 de ancestro de lámina, proteína asociada a la proteína manosa-6-fosfato p76, p76, forma de proteína 2 de tipo fosfolipasa B 32 kDa, forma de proteína 2 de tipo fosfolipasa B 45 kDa, o proteína lisosomal 66.3 kDa.

5 El término "célula" o "línea celular" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariontes y eucariontes (células individuales o células múltiples), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp. *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células de mamíferos, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o quadromas. En ciertas realizaciones, la célula es una célula humana, mono, mono, hámster, rata o ratón. En ciertas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (p. Ej. CHO K1, DXB-11 CHO, Veggio-CHO), COS (p. Ej. COS-7), células retinianas, Vero, CV1, riñón (p. Ej. HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmico), CV-1, U937, 3T3, Célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, célula MMT, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, Una célula retiniana que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®).

20 Descripción general

25 La invención se basa al menos en parte en una célula huésped recombinante y un sistema de expresión celular de la misma que disminuye la expresión de una proteína de fosfolipasa endógena de la célula huésped, disminuye la función enzimática o la capacidad de unión de una proteína de fosfolipasa endógena de la célula huésped, o no tiene un huésped endógeno detectable proteína de fosfolipasa celular. Los inventores descubrieron que la interrupción de la expresión de la proteína PLBD2 permite una purificación optimizada y eficiente de productos biofarmacéuticos en tales sistemas de expresión. La invención puede emplearse de varias maneras, tales como 1) utilizando herramientas de edición de genes para eliminar totalmente la expresión de fosfolipasa, mientras que no se expresa fosfolipasa de longitud completa medible en la célula debido a la interrupción del gen de fosfolipasa; 2) utilizando herramientas de edición de genes para eliminar o reducir la actividad enzimática, mientras que la proteína fosfolipasa se expresa pero se vuelve no funcional debido a interrupciones en el gen; y 3) utilizando herramientas de edición de genes para eliminar o reducir la capacidad de una proteína de fosfolipasa endógena de la célula huésped para unirse a la proteína recombinante exógena producida por la célula. La actividad esterasa se determinó en fracciones proteicas de ciertas células productoras de anticuerpos. Se determinó una esterasa particular, similar a la fosfolipasa B (PLBD2) como contaminante en estas fracciones de proteínas. Los sitios objetivo de edición de genes se identificaron en un gen PLBD2 de hámster que permite la interrupción dirigida del gen en el genoma de la célula de hámster (es decir, CHO).

40 Una célula huésped optimizada que comprende un gen PLBD2 modificado es útil para el bioprocesamiento de proteínas de alta calidad y se prevé que reduzca la carga de ciertos pasos de purificación, reduciendo así el tiempo y el costo, al tiempo que aumenta el rendimiento de producción.

45 La invención también se basa en la orientación específica de un gen exógeno al sitio de integración. Los procedimientos de la invención permiten la modificación eficiente del genoma celular, produciendo así una célula huésped modificada o recombinante útil como sistema de expresión celular para el bioprocesamiento de productos proteicos terapéuticos u otros productos de proteínas comerciales. Con este fin, los procedimientos de la invención emplean estrategias de edición de genes del genoma celular para la alteración de genes particulares de interés que de otro modo podrían disminuir o contaminar la calidad de las formulaciones de proteínas recombinantes, o requerir múltiples pasos de purificación.

50 Las composiciones de la invención, p. las herramientas de edición de genes también se pueden incluir en construcciones de expresión, por ejemplo, en vectores de expresión para clonar e diseñar nuevas líneas celulares. Estas líneas celulares comprenden las modificaciones descritas en el presente documento, y se prevén modificaciones adicionales para la incorporación óptima de construcciones de expresión con el propósito de la expresión de proteínas. Los vectores de expresión que comprenden polinucleótidos pueden usarse para expresar proteínas de interés de forma transitoria, o pueden integrarse en el genoma celular mediante recombinación aleatoria o dirigida, tal como, por ejemplo, recombinación homóloga o recombinación mediada por recombinasas que reconocen sitios de recombinación específicos (por ejemplo, Recombinación mediada por Cre-lox).

60 Los sitios objetivo para la interrupción o inserción de ADN generalmente se identifican teniendo en cuenta el efecto máximo de la interrupción o inserción del gen. por ejemplo, las secuencias diana se pueden elegir cerca del extremo N de la región de codificación del gen de interés, mientras que se introduce una ruptura de ADN dentro del primer o segundo exón del gen. Los intrones (regiones no codificantes) no suelen ser objeto de interrupción, ya que la reparación de la ruptura del ADN en esa región puede no alterar el gen objetivo. Los cambios introducidos por estas modificaciones son permanentes para el ADN genómico del organismo.

Esencialmente, después de la identificación de un sitio objetivo de SEQ ID NO: 33, se emplearon protocolos de edición de genes para generar un gen no funcional. Una vez que se elimina la proteína de la célula huésped contaminante, también se usan los protocolos conocidos en la técnica para introducir un gen de interés expresable (GDI), como un anticuerpo de múltiples subunidades, junto con cualquier otro elemento deseable como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores, operadores, sitios de unión a ribosomas (por ejemplo, sitios internos de entrada de ribosomas), etc.

La línea celular recombinante resultante proporciona convenientemente procedimientos de bioprocedimiento aguas abajo más eficientes con respecto a genes de interés exógenos (GDI) expresables, ya que los pasos de purificación para proteínas de interés exógenas se eliminan debido a la ausencia de la proteína de la célula huésped contaminante. Eliminar o refinar los procedimientos de purificación también da como resultado cantidades más altas (título) de la proteína de interés recuperada.

15 Caracterización física y funcional de células CHO modificadas

Los solicitantes han descubierto una actividad enzimática asociada con la desestabilización de los polisorbatos (incluidos el polisorbato 20 y el polisorbato 80). Se descubrió que esa actividad estaba asociada con una esterasa, como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias enumeradas en la Tabla 1. Una búsqueda BLAST de esas secuencias de péptidos reveló identidad con una supuesta proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2, también referido como PLBL2). PLBD2 está altamente conservado en hámster (SEQ ID NO: 32), ratones (SEQ ID NO: 34), rata (SEQ ID NO: 35), humano (SEQ ID NO: 36) y bovino (SEQ ID NO: 37). Los solicitantes descubrieron que PLBD2, que copurifica bajo ciertos procedimientos con algunas clases de proteínas de interés fabricadas en una línea celular de mamífero, tiene actividad esterasa responsable de la hidrólisis del polisorbato 20 y 80. Los solicitantes prevén esa otra especie de esterasa, de las cuales PLBD2 Es un ejemplo, puede contribuir a la inestabilidad del polisorbato, dependiendo de la proteína particular de interés y/o el fondo genético/epigenético de la célula huésped. En la Tabla 1 se ejemplifican fragmentos de esterasa de mamífero, particularmente PLBD2, que tienen identidad entre múltiples especies.

TABLA 1

Identificador de secuencia	de	Secuencia de aminoácidos	Identificador de secuencia	de	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO:1		DLLVAHNTWNSYQNMLR	SEQ ID NO:16		LTLQLKGLEDSYEGR
SEQ ID NO:2		LIRYNNFLHDPLSLCEACIPKP	SEQ ID NO:17		MSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:3		SVLLDAASGQLR	SEQ ID NO:18		VTSFSLAKR
SEQ ID NO:4		DQSLVEDMNSMVR	SEQ ID NO:19		QNLDPVSR
SEQ ID NO:5		QFNSGTYNQWMIVDYK	SEQ ID NO:20		IHKYQLQFR
SEQ ID NO:6		QGPQEAYPLIAGNNLVFSSY	SEQ ID NO:21		AQIFQRDQSLVEDMNSMVR
SEQ ID NO:7		SMLHMGQPDWTFSPISVP	SEQ ID NO:22		LIRYNNFLHDPLSLCEACIPKP
SEQ ID NO:8		YNNFLHDPLSLCEACIPKNA	SEQ ID NO:23		SVLLDAASGQLR
SEQ ID NO:9		LALDGATWADIFK	SEQ ID NO:24		DQSLVEDMNSMVR
SEQ ID NO:10		LSLGSWSCSAIK	SEQ ID NO:25		DLLVAHNTWNSYQNMLR
SEQ ID NO:11		YVQPQGCVLEWIR	SEQ ID NO:26		YNNFLHDPLSLCEACIPKNA
SEQ ID NO:12		RMSMLAASGPTWDQLPPFQ	SEQ ID NO:27		RMSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:13		SFLEINLEWMQR	SEQ ID NO:28		SMLHMGQPDWTFSPISVP
SEQ ID NO:14		VTILEQIPGMVVADADKTED	SEQ ID NO:29		MSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:15		VRSVLLDAASGQLR	SEQ ID NO:30		VRSVLLDAASGQLR
			SEQ ID NO:31		QNLDPVSR

La hidrólisis del éster del polisorbato 80 se informó recientemente (ver Labrenz, S.R., "Hidrólisis de éster de polisorbato 80 en un medicamento de mAb: evidencia en apoyo del riesgo hipotético después de la observación de partículas visibles en formulaciones de mAb", J. Pharma. Sci. 103 (8): 2268-77 (2014)). Ese documento informó la formación de partículas visibles en una formulación que contiene IgG. El autor postuló que las partículas coloidales

de IgG se formaron debido a la hidrólisis enzimática de los ésteres de oleato de polisorbato 80. Aunque no se identificó directamente esterasa, el autor especula que una lipasa o interpolación copurificó con la IgG, que fue responsable de la degradación del polisorbato 80. Curiosamente, las IgG formuladas con polisorbato 20 no formaron partículas y la supuesta esterasa no hidrolizó el polisorbato 20. El autor informó que la supuesta lipasa asociada con la IgG no afectó al ácido graso saturado C12 (es decir, laurato) (Id en 7.)

Las fosfolipasas son una familia de enzimas esterases que catalizan la escisión de los fosfolípidos. Cada subclase de fosfolipasa tiene una especificidad de sustrato diferente en función de su sitio de escisión objetivo. La fosfolipasa B (PLB) se identificó como relacionada con un grupo de proteínas de lipasa procariotas y eucariotas en virtud de la presencia de un motivo de secuencia de aminoácidos altamente conservado, Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL) (Upton, C y Buckley, JT. A new family of lipolytic enzymes? Trends Biochem Sci. 1995; 20: 178-179) Sin embargo, la fosfolipasa B también se clasifica con las hidrolasas GDSL (S) conocidas, y tiene poca homología de secuencia con las lipasas verdaderas, y se diferencia estructuralmente de las fosfolipasas al tener un motivo que contiene serina más cerca del extremo N que otras lipasas. Por lo tanto, las proteínas similares a la fosfolipasa B también se clasifican como hidrolasas nucleófilas N-terminales (Ntn). Funcionalmente, las enzimas similares a la fosfolipasa B hidrolizan su sustrato objetivo (ésteres de ácidos grasos como los diacilglicerofosfolípidos) para producir ácidos grasos libres y compuestos que contienen éster (por ejemplo, produce glicerofosfolina), de manera similar a otras fosfolipasas. Se ha sugerido que las proteínas similares a PLB, como la proteína 1 similar a la fosfolipasa B (PLBD1) y la proteína 2 similar a la fosfolipasa B (PLBD2), también tienen actividad amidasa, similar a otras hidrolasas Ntn (Repo, H. et al, Proteins 2014; 82: 300-311).

La eliminación de un gen de la célula huésped, como una esterasa, más particularmente la proteína 2 similar a la fosfolipasa B, se puede lograr de varias maneras. Hacer que el gen de fosfolipasa no sea funcional o reducir la actividad funcional de la fosfolipasa diana se puede hacer mediante la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia genómica de fosfolipasa, particularmente en los exones (regiones codificantes). Se identificó la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 33 y las secuencias aguas arriba y aguas abajo del sitio objetivo (es decir, brazos homólogos) pueden utilizarse para integrar un casete de expresión que comprende un gen mutado por recombinación homóloga. Otras herramientas de edición de genes se describen en el presente documento de acuerdo con la invención.

Las líneas celulares desprovistas de actividad esterasa, particularmente la actividad PLBD2, son útiles para la producción de proteínas terapéuticas para ser purificadas y almacenadas a largo plazo, y tales líneas celulares resuelven problemas asociados con el almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas en una formulación que contiene un tensioactivo de éster de ácido graso manteniendo la estabilidad de la proteína y reduciendo la formación de partículas subvisibles (SVP) (véase también la solicitud internacional PCT No. PCT/US15/54600 presentada el 8 de octubre de 2015, que se incorpora en su totalidad a la especificación).

Los ensayos para detectar la actividad enzimática de una fosfolipasa incluyen mediciones de degradación de polisorbato (actividad de esterasa putativa). Los sobrenadantes o fracciones de proteínas no purificadas de las células CHO, y el sobrenadante en cada paso o secuencia de pasos cuando se somete a pasos de purificación secuenciales, se prueba para determinar la estabilidad del polisorbato, como el polisorbato 20 u 80. La medición del porcentaje de polisorbato intacto informado es inversamente proporcional a la cantidad de actividad esterasa contaminante. En la técnica se conocen otras mediciones para la detección de actividad de esterasa o presencia de esterasa en una muestra de proteína. Detección de esterasa (por ejemplo, lipasa, fosfolipasa o PLBD2) se puede hacer mediante espectrometría de masas de digestión con tripsina.

Se presume que la estabilidad del detergente no iónico, es decir, El tensioactivo como el polisorbato, en una formulación de proteína (p. ej., anticuerpo) está directamente relacionado con la formación de partículas subvisibles. Por lo tanto, la degradación del polisorbato incurre en pérdida de actividad tensioactiva y, por lo tanto, permite que la proteína se agregue y forme partículas subvisibles. Además o alternativamente, los ácidos grasos liberados por los ésteres de ácido graso de sorbitán que se degradan también pueden contribuir a la formación de partículas subvisibles como gotas de ácido graso inmiscibles. Por lo tanto, los niveles de partículas subvisibles ≥ 10 micrómetros de diámetro pueden contarse en la formulación de proteínas para detectar la actividad esterasa.

Otros ensayos para detectar actividad de fosfolipasa son conocidos en la técnica. por ejemplo, formación de glicerofosfo[³H]colina a partir de fosfatidil[³H]colina después de la incubación de fosfatidil[³H]colina y el sobrenadante de proteínas pueden determinarse por cromatografía en capa fina (siguiendo protocolos similares de acuerdo con Kanoh, H. y col. 1991 Comp Biochem Physiol 102B (2): 367-369).

La SEQ ID NO: 32 desvelada en el presente documento se identificó a partir de proteínas expresadas en células CHO. Se descubrió que otras especies de mamíferos (como, por ejemplo, humanos, ratas, ratones) tienen una alta homología con la esterasa identificada. Las secuencias homólogas también se pueden encontrar en líneas celulares derivadas de otros tipos de tejidos de *Cricetulus griseus*, u otras especies homólogas, y pueden identificarse y aislarse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica. por ejemplo, uno puede identificar otras secuencias homólogas por hibridación entre especies o técnicas basadas en PCR. Además, las variantes de PLBD2 pueden analizarse para determinar la actividad de esterasa como se describe en el presente documento. Se espera que los

ADN que son al menos aproximadamente un 80 % idénticos en identidad de ácido nucleico con SEQ ID NO: 32, o variantes de los mismos, y que tienen actividad esterasa exhiban su actividad esterasa en composiciones biofarmacéuticas y son candidatos para la interrupción dirigida en la línea celular modificada. Por consiguiente, los homólogos de la SEQ ID NO: 32 o variantes de los mismos, y las células que expresan tales homólogos también están abarcadas por realizaciones de la invención.

Las secuencias PLBD2 de mamíferos (ácido nucleico y aminoácido) se conservan entre genomas de hámster, humanos, ratones y ratas. La Tabla 2 identifica ejemplos de proteínas PLBD2 de mamíferos y su grado de homología.

TABLA 2: Identidad de aminoácidos de los homólogos de PLBD2

Mamífero	SEQ ID NO:	% id Humano	% id Ratón	% id Rata	% id Hámster
Hámster	32	80	89,7	89	-
Ratón	34	80,8	-	92,6	89,7
Rata	35	-	92,6	-	89
Humano	36	-	80,8	-	80

En ciertas realizaciones, la interrupción dirigida de SEQ ID NO: 33 se dirige a la región seleccionada del grupo que consiste en nucleótidos que abarcan posiciones numeradas 1-20, 10-30, 20-40, 30-50, 30-60, 30-70, 40-60, 40-70, 50-70, 60-80, 70-90, 80-100, 90-110, 110-140, 120-140, 130-150, 140-160, 150-170, 160-180, 160-180, 170-190, 180-200, 180-220, 190-210, 190-230, 200-220, 210-230, 220-240, 230-250, 240-260, 250-270, 33-62, 37-56, 40-69, 44-63, 110-139, 198-227, 182-211 y 242-271 de SEQ ID NO: 33.

En otra realización, la secuencia objetivo está total o parcialmente dentro de la región seleccionada del grupo que consiste en nucleótidos que abarcan posiciones numeradas 1-20, 10-30, 20-40, 30-50, 30-60, 30-70, 40-60, 40-70, 50-70, 60-80, 70-90, 80-100, 90-110, 110-140, 120-140, 130-150, 140-160, 150-170, 160-180, 160-180, 170-190, 180-200, 180-220, 190-210, 190-230, 200-220, 210-230, 220-240, 230-250, 240-260, 250-270, 33-62, 37-56, 40-69, 44-63, 110-139, 198-227, 182-211 y 242-271 de SEQ ID NO: 33.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico de esterasa es al menos aproximadamente 80 % idéntica, al menos aproximadamente 81 % idéntica, al menos aproximadamente 82 % idéntica, al menos aproximadamente 83 % idéntica, al menos aproximadamente 84 % idéntica, al menos aproximadamente 85 % idéntico, al menos aproximadamente 86 % idéntico, al menos aproximadamente 87 % idéntico, al menos aproximadamente 88 % idéntico, o al menos aproximadamente 89 % idéntico, al menos aproximadamente 90 % idéntico, al menos aproximadamente 91 % idéntico, al menos aproximadamente 92 % idéntico, al menos aproximadamente 93 % idéntico, al menos aproximadamente 94 % idéntico, al menos aproximadamente 95 % idéntico, al menos aproximadamente 96 % idéntico, al menos aproximadamente 97 % idéntico, al menos aproximadamente 98 % idéntico o al menos aproximadamente 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 33 o secuencia objetivo de la misma.

Las poblaciones celulares que expresan niveles mejorados de una proteína de interés pueden desarrollarse usando las líneas celulares y los procedimientos proporcionados en el presente documento. La proteína comercial aislada, el sobrenadante de proteína o fracción del mismo, producida por las células de la invención no tiene actividad esterasa o esterasa detectable. Se espera que las agrupaciones de células modificadas adicionalmente con secuencia (s) exógena (s) integradas dentro del genoma de las células modificadas de la invención sean estables a lo largo del tiempo y puedan tratarse como líneas celulares estables para la mayoría de los propósitos. Las etapas de recombinación también pueden retrasarse hasta más adelante en el procedimiento de desarrollo de las líneas celulares de la invención.

Modificación genética de la proteína de la célula huésped objetivo

Los procedimientos para diseñar genéticamente un genoma de la célula huésped en una ubicación particular (es decir, proteína de la célula huésped) puede lograrse de varias maneras. Se usaron técnicas de edición genética para modificar una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota, en el que la secuencia de ácido nucleico es una secuencia endógena que normalmente se encuentra en dichas células y que expresa una proteína de la célula huésped contaminante. La expansión clonal es necesaria para garantizar que la progenie celular comparta las características genotípicas y fenotípicas idénticas de la línea celular diseñada. En algunos ejemplos, las células nativas se modifican mediante una técnica de recombinación homóloga para integrar una secuencia de ácido nucleico diana no funcional o mutada que codifica una proteína de la célula huésped, como una variante de la SEQ ID NO: 33.

Uno de estos procedimientos de edición de la secuencia genómica CHO PLBD2 implica el uso de ARN guía y una enzima Cas tipo II para dirigirse específicamente a un exón PLBD2. Se han empleado ARN guía específicos dirigidos al exón 1 de CHO PLBD2 (ver por ejemplo, Tabla 4) en un procedimiento de edición de nucleasa específico del sitio como se describe en este documento. Se pueden emplear otros procedimientos de edición dirigida del genoma, por ejemplo nucleasas, procedimientos basados en recombinación o interferencia de ARN, para modificar el gen PLBD2 para la disrupción dirigida del genoma CHO.

En un aspecto, los procedimientos y composiciones para la eliminación o regulación negativa de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la célula huésped que tiene un 90 % de identificación con la SEQ ID NO: 33, o una variante de unión a anticuerpos de la misma, se realizan mediante recombinación homóloga. Una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, que codifica una esterasa de interés, puede ser dirigida por recombinación homóloga o mediante el uso de procedimientos de nucleasa específicos del sitio que se dirigen específicamente a secuencias en el sitio de expresión de esterasa del genoma de la célula huésped. Para la recombinación homóloga, moléculas de polinucleótidos homólogos (es decir, brazos homólogos) se alinean e intercambian un tramo de sus secuencias. Se puede introducir un transgén durante este intercambio si el transgén está flanqueado por secuencias genómicas homólogas. En un ejemplo, también se puede introducir un sitio de reconocimiento de recombinasa en el genoma de la célula huésped en los sitios de integración.

La recombinación homóloga en células eucariotas se puede facilitar mediante la introducción de una ruptura en el ADN cromosómico en el sitio de integración. Los sistemas modelo han demostrado que la frecuencia de recombinación homóloga durante la selección de genes aumenta si se introduce una ruptura de doble cadena dentro de la secuencia diana cromosómica. Esto se puede lograr dirigiendo ciertas nucleasas al sitio específico de integración. Las proteínas de unión a ADN que reconocen secuencias de ADN en el gen objetivo son conocidas en la técnica. Los vectores de direccionamiento génico también se emplean para facilitar la recombinación homóloga. En ausencia de un vector de direccionamiento genético para la reparación dirigida por homología, las células cierran con frecuencia la ruptura de doble cadena por unión final no homóloga (NHEJ) que puede conducir a la eliminación o inserción de múltiples nucleótidos en el sitio de escisión. La construcción del vector de direccionamiento génico y la selección de nucleasas están dentro de la habilidad del artesano al que pertenece esta invención.

En algunos ejemplos, las nucleasas de dedo de cinc (ZFN), que tienen una estructura modular y contienen dominios de dedo de cinc individuales, reconocen una secuencia particular de 3 nucleótidos en la secuencia diana. Algunas realizaciones pueden utilizar ZFN con una combinación de dominios de dedo de cinc individuales que se dirigen a secuencias diana múltiples. Procedimientos ZFN para atacar la disrupción del gen PLBD2 (por ejemplo, en el exón 1 o exón 2) también están incorporados por la invención.

Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TAL) (TALEN) también pueden emplearse para la edición del genoma específica del sitio. El dominio de unión al ADN de la proteína efectora TAL se utiliza típicamente en combinación con un dominio de escisión no específico de una nucleasa de restricción, tal como FokI. En algunas realizaciones, se emplea una proteína de fusión que comprende un dominio de unión al ADN de la proteína efectora TAL y un dominio de escisión de la nucleasa de restricción para reconocer y escindir el ADN en una secuencia diana dentro de un exón del gen que codifica la proteína de la célula huésped diana, por ejemplo una esterasa, como una proteína 2 de tipo fosfolipasa B u otra fosfolipasa de mamífero. La interrupción dirigida o la inserción de secuencias exógenas en el exón específico de la proteína CHO codificada por la SEQ ID NO: 33 se puede hacer empleando una nucleasa TALE (TALEN) dirigida a ubicaciones dentro del exón 1, exón 2, exón 3, etc. ADN genómico de esterasa (ver Tablas 3 y 4). El sitio de escisión de destino TALEN dentro de la SEQ ID NO: 33 puede seleccionarse en base a ZiFit.partners.org (ZiFit Targeter Versión 4.2) y luego los TALEN están diseñados en base a procedimientos conocidos (Boch J et al., 2009 Science 326: 1509-1512; Bogdanove, A. J. y Voytas, D. F. 2011 Science 333, 1843-1846; Miller, J. C. et al., 2011 Nat Biotechnol 29, 143-148) Los procedimientos TALEN para atacar la disrupción del gen PLBD2 (por ejemplo, el exón 1 o el exón 2) también están incorporados por la invención.

Las endonucleasas guiadas por ARN (RGEN) son herramientas de ingeniería del genoma programables que se desarrollaron a partir de maquinaria inmunitaria adaptativa bacteriana. En este sistema, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR)/respuesta inmune asociada a CRISPR (Cas), la proteína Cas9 forma una endonucleasa específica de secuencia cuando se compleja con dos ARN, uno de los cuales guía la selección del objetivo. Los RGEN consisten en componentes (Cas9 y ARNtracr) y un ARN CRISPR específico de objetivo (ARNcr). Tanto la eficiencia de la escisión del blanco del ADN como la ubicación de los sitios de escisión varían según la posición de un motivo adyacente protospacer (PAM), un requisito adicional para el reconocimiento del blanco (Chen, H. y col., J. Biol. Chem publicado en línea el 14 de marzo de 2014, como el manuscrito M113.539726). Los procedimientos CRISPR-Cas9 para atacar la disrupción del gen PLBD2 (por ejemplo, el exón 1 o el exón 2) también están incorporados por la invención.

Todavía hay otros procedimientos de recombinación homóloga disponibles para el experto en la materia, como las nucleasas derivadas de BuD (BuDN) con especificidades precisas de unión al ADN (Stella, S. y col. Acta Cryst. 2014, D70, 2042-2052) Un único código de residuo a nucleótido guía el BuDN al objetivo de ADN específico dentro de la SEQ ID NO: 33.

Las endonucleasas específicas de secuencia, o cualquier técnica de recombinación homóloga, pueden dirigirse a una secuencia diana en cualquiera de los exones que codifican PLBD2, por ejemplo en el genoma CHO-K1, Secuencia de referencia NCBI: NW_003614971.1, en: Exón 1 dentro de los nucleótidos (nt) 175367 a 175644 (SEQ ID NO: 47); Exón 2 dentro de nt 168958 a 169051 (SEQ ID NO: 48); Exón 3 dentro de nt 166451 a 166060 (SEQ ID NO: 49); Exón 4 dentro de nt 164966 a 165066 (SEQ ID NO: 50); Exón 5 dentro de nt 164564 a 164778 (SEQ ID NO: 51); Exón 6 dentro de nt 162682 a 162779 (SEQ ID NO: 52); Exón 7 dentro de nt 160036 a 160196 (SEQ ID NO: 53); Exón 8 dentro de nt 159733 a 159828 (SEQ ID NO: 54); Exón 9 dentro de nt 159491 a 159562 (SEQ ID NO: 55); Exón 10 dentro de nt 158726 a 158878 (SEQ ID NO: 56); Exón 11 dentro de nt 158082 a 158244 (SEQ ID NO: 57); o el exón 12 en los nucleótidos (nt) 157747 a 157914 (SEQ ID NO: 58), en el que los exones PLBD2 1-12 se describen en el gen de la cadena negativa y el complemento de cada secuencia también se incorpora en el presente documento.

Los procedimientos precisos de modificación del genoma se eligen en función de las herramientas disponibles compatibles con secuencias diana únicas dentro de la SEQ ID NO: 33 para evitar la interrupción del fenotipo celular.

Proteínas de Interés

Cualquier proteína de interés adecuada para la expresión en células procariotas o eucariotas se puede usar en los sistemas de células huésped diseñados que se proporcionan. por ejemplo, la proteína de interés incluye, pero no se limita a, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un ScFv o fragmento del mismo, una proteína de fusión Fc o un fragmento del mismo, un factor de crecimiento o un fragmento del mismo, una citocina o un fragmento del mismo, o un dominio extracelular de un receptor de la superficie celular o un fragmento del mismo. Las proteínas de interés pueden ser polipéptidos simples que consisten en una sola subunidad, o proteínas complejas de múltiples subunidades que comprenden dos o más subunidades. La proteína de interés puede ser un producto biofarmacéutico, aditivo alimentario o conservante, o cualquier producto proteico sujeto a estándares de purificación y calidad.

Células huésped y transfección

Las células huésped utilizadas en los procedimientos de la invención son células huésped eucariotas que incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células humanas, células de rata y células de ratón. En una realización preferida, la invención proporciona una célula que comprende un fragmento de secuencia de ácido nucleico interrumpido de SEQ ID NO: 33.

La invención incluye una célula huésped de mamífero diseñada por ingeniería genética transfectada además con un vector de expresión que comprende un gen exógeno de interés, dicho gen que codifica el producto biofarmacéutico. Si bien se puede usar cualquier célula de mamífero, en una realización particular la célula huésped es una célula CHO.

Las células huésped transfectadas incluyen células que se han transfectado con vectores de expresión que comprenden una secuencia que codifica una proteína o polipéptido. Las proteínas expresadas se secretarán preferiblemente en el medio de cultivo para su uso en la invención, dependiendo de la secuencia de ácido nucleico seleccionada, pero pueden retenerse en la célula o depositarse en la membrana celular. Se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteínas recombinantes. Otras líneas celulares desarrolladas para esquemas de selección o amplificación específicos también serán útiles con los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento, siempre que un gen de esterasa que tenga al menos un 80 % de homología con SEQ ID NO: 33 se haya regulado negativamente, eliminado o alterado de otra manera de acuerdo con la invención. Una línea celular incorporada es la línea celular CHO designada K1. Para lograr una producción de alto volumen de proteínas recombinantes, la línea celular huésped se puede adaptar previamente al medio biorreactor en el caso apropiado.

Se conocen varios protocolos de transfección en la técnica y se revisan en Kaufman (1988) Meth. Enzimología 185:537. El protocolo de transfección elegido dependerá del tipo de célula huésped y la naturaleza del GDI, y puede elegirse en base a la experimentación de rutina. Los requisitos básicos de cualquier protocolo de este tipo son primero introducir el ADN que codifica la proteína de interés en una célula huésped adecuada, y luego identificar y aislar las células huésped que han incorporado el ADN heterólogo de una manera expresable y relativamente estable.

Un procedimiento utilizado habitualmente para introducir ADN heterólogo en una célula es la precipitación de fosfato de calcio, por ejemplo, según lo descrito por Wigler y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567, 1980) El ADN introducido en una célula huésped por este procedimiento frecuentemente se reordena, lo que hace que este procedimiento sea útil para la cotransfección de genes independientes.

La fusión inducida por polietileno de protoplastos bacterianos con células de mamífero (Schaffner y col., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77:2163) es otro procedimiento útil para introducir ADN heterólogo. Los protocolos de fusión de protoplastos con frecuencia producen múltiples copias del ADN plasmídico integrado en el genoma de

la célula huésped de mamífero, y esta técnica requiere que el marcador de selección y amplificación esté en el mismo plásmido que el GDI.

5 La electroporación también se puede usar para introducir ADN directamente en el citoplasma de una célula huésped, por ejemplo, según lo descrito por Potter y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7161, 1988) o Shigekawa y col. (BioTechniques 6: 742, 1988) A diferencia de la fusión de protoplastos, la electroporación no requiere que el marcador de selección y el GDI estén en el mismo plásmido.

10 Se han descrito otros reactivos útiles para introducir ADN heterólogo en una célula de mamífero, como el reactivo Lipofectine™ y el reactivo Lipofectamine™ (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.). Ambos reactivos disponibles en el mercado se usan para formar complejos de lípido-ácido nucleico (o liposomas) que, cuando se aplican a células cultivadas, facilitan la absorción del ácido nucleico en las células.

15 Los procedimientos para amplificar el GDI también son deseables para la expresión de la proteína recombinante de interés, y típicamente implica el uso de un marcador de selección (revisado en Kaufman *supra*) La resistencia a los fármacos citotóxicos es la característica más utilizada como marcador de selección, y puede ser el resultado de un rasgo dominante (por ejemplo, se puede usar independientemente del tipo de célula huésped) o un rasgo recesivo (por ejemplo, útil en tipos de células huésped particulares que son deficientes en cualquier actividad para la que se selecciona). Varios marcadores amplificables son adecuados para su uso en las líneas celulares de la invención y pueden introducirse mediante vectores de expresión y técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, como se describe en Sambrook, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; pág. 16.9-16.14).

25 También se pueden incluir marcadores útiles seleccionables y otras herramientas para la amplificación de genes, tales como elementos reguladores, descritos previamente o conocidos en la técnica, en las construcciones de ácido nucleico utilizadas para transfectar células de mamífero. El protocolo de transfección elegido y los elementos seleccionados para su uso dependerán del tipo de célula huésped utilizada. Los expertos en la materia conocen numerosos protocolos y células huésped diferentes para adaptar la invención a un uso particular, y pueden seleccionar un sistema apropiado para la expresión de una proteína deseada, en función de los requisitos del sistema de cultivo celular.

Otras características de la invención serán evidentes en el curso de las siguientes descripciones de realizaciones ejemplares que se dan para ilustrar la invención y no pretenden ser limitantes de la misma.

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica cómo hacer y usar los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidad, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

45 Ejemplo 1. Interrupción dirigida de un gen de esterasa en la célula huésped

Para emplear la interrupción del gen de la esterasa diana, es decir, el gen 2 de tipo fosfolipasa B, de origen de células CHO, un sistema CRISPR/Cas Tipo II que requiere al menos 20 nucleótidos (nt) de homología entre un ARN quimérico (es decir, ARN guía) y se utilizó su objetivo genómico. Las secuencias de ARN guía se diseñaron para el direccionamiento específico de un exón dentro del ácido nucleico CHO proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2) (SEQ ID NO: 33) y se consideran únicas (para minimizar los efectos fuera del objetivo en el genoma). Se sintetizaron múltiples ARN guía pequeños (ARNsg) para su uso en el procedimiento de edición del genoma dirigido a los siguientes segmentos genómicos de PLBD2 enumerados en la Tabla 3.

55

TABLA 3

SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 33 de números nucleótidos	SEQ ID NO: 47 (números de nt. de exón 1 en el locus genómico)	secuencia de ADN genómico
38	110-139	170-199	5'-CTGAGGTGTTGCTGAATTGCCCGGCGGGCG-3'
39	227-198	82-111	5'-GACGCGGCGTCCAGCAGCACCGAGCGGACG-3'
40	182-211	98-127	5'-ACCCGCCGGTCTCCCGCGTCCGCTCGGTGC-3'
41	242-271	212-241	5'-TGGTGGACGGCATCCATCCCTACGCGGTGG-3'
42	33-62	3-32	5'-GGCGGCCCCCATGGACCGGAGCCCCGGCGG-3'
43	40-69	10-39	5'-CCCATGGACCGGAGCCCCGGCGGCCGGGCG-3'

El plásmido de expresión de ARNsg (System Biosciences, CAS940A-1) contiene un promotor H1 humano que impulsa la expresión del ARN guía pequeño y el ARNtracr que sigue al ARNsg. Las células inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO) se transfectaron con el plásmido que codifica la enzima Cas9-H1 seguido de una de las secuencias de ARNsg, por ejemplo ARNsg1 (SEQ ID NO: 45) o ARNsg2 (SEQ ID NO: 46), diseñado para apuntar al primer exón de CHO PLBD2. Se predijo que ARNsg1 y ARNsg2 generarían una ruptura de doble cadena (DSB) en o alrededor de los nucleótidos 53 y 59 de SEQ ID NO: 33, respectivamente. Por lo tanto, se predijo que un DSB ocurriría aprox. 23 o 29 nucleótidos aguas abajo del codón de inicio PLBD2. (Tenga en cuenta que los nucleótidos 1-30 de la SEQ ID NO: 33 codifican un péptido señal.) Se realizó una transfección de control negativo donde la línea CHO parental se transfectó con el plásmido que codifica la enzima Cas9-H1 sin un ARNsg o un ARNsg que codifica un secuencia de genes no presente en el genoma CHO.

TABLA 4

Designación de ARNsg	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 33 de números nucleótidos	SEQ ID NO: 47 (números de nt. de exón 1 en el locus genómico)	ARNsg (secuencia de nt de vectores)
ARNsg1	45	37-56	7-26	5'-GCCCCCATGGACCGGAGCCC -3'
ARNsg2	46	44-63	14-33	5'-TGGACCGGAGCCCCGGCGGC -3'

Después de la transfección, las células se cultivaron durante 6 días en medio sin suero y luego se clonaron en una sola célula utilizando citometría de flujo. Después de 12 días en cultivo, se aislaron clones estables con propiedades de crecimiento deseables, se expandieron en medio sin suero, se recogieron gránulos celulares para genotipar y se depositaron las líneas celulares clonales.

El ADN genómico (ADNg) y el ARN mensajero (ARNm) se aislaron de los gránulos de células clonales y se analizaron por PCR cuantitativa (PCRc). Los cebadores y las sondas PCRc se diseñaron para superponerse con la secuencia de ARNsg utilizada para el evento de direccionamiento de ruptura de doble cadena, con el fin de detectar la interrupción del ADN genómico y su transcripción. La abundancia relativa del gen PLBD2 o la transcripción en los clones candidatos se determinó utilizando el procedimiento relativo PCRc, donde los clones derivados de la transfección de control negativo se usaron como un calibrador. Ver Figura 1. Los cebadores y las sondas PCRc se diseñaron para detectar secuencias en la posición ARNsg1 o ARNsg2 en el exón 1. PLBD2. Tanto el ADNg como el ARN aislado del clon 1 no pudieron soportar la amplificación PCRc del exón 1 PLBD2 en las regiones ARNsg1 o ARNsg2, pero se detectó la amplificación del gen de limpieza, GAPDH. En base a estos datos, el clon 1 se identificó como una posible eliminación de PLBD2 en la que se interrumpieron ambos alelos genómicos de PLBD2 del exón1.

Se observa que la amplificación de ADN genómico y ARNm no se detectó en el Clon 8 usando cebadores superpuestos con ARNsg2, sin embargo, los cebadores/sondas de ARNsg1 detectaron ADN genómico por encima de los valores de control. El clon 8 y otros se analizaron más a fondo para comprender el rendimiento del procedimiento de nucleasa dirigida al sitio.

El tamaño de todo el exón 1 de PLBD2 en el clon 1 se analizó por PCR a partir de plantillas derivadas de ADNg o ARN y se comparó con el amplificado de las células CHO de tipo salvaje. La longitud de los fragmentos de amplicón se determinó usando el instrumento Caliper GX (Figura 2). Tanto la amplificación de ADNg como de ARNm del clon 1 dio como resultado un solo fragmento de PCR que era más corto que el amplificado de las células de control de tipo salvaje.

Los productos de amplificación se secuenciaron, dando como resultado que el clon 1 se identificara como inactivación de PLBD2, en el que se descubrió que el gen PLBD2 tenía una delección de 11 pb dando como resultado un desplazamiento de marco.

Los inventores también identificaron inesperadamente el Clon 8 como un defectivo en PLBD2 a pesar del hecho de que los fragmentos de ADN genómico fueron identificados por cebadores PCRc superpuestos con la secuencia ARNsg1. La identificación de un clon que no tiene actividad de fosfolipasa detectable o que no tiene proteína de fosfolipasa detectable era técnicamente difícil y requería mucho tiempo. Las técnicas de nucleasa dirigidas al sitio pueden proporcionar una facilidad de uso, sin embargo, es necesario realizar un examen cuidadoso y eliminar los falsos positivos y aún puede haber resultados impredecibles con respecto a la identidad de un solo clon que tiene dos alelos alterados. Sorprendentemente, solo el 1 % de los clones seleccionados utilizando las técnicas descritas anteriormente se identificaron como clones defectivos en PLBD2 viables. Véase la tabla 5.

TABLA 5

		n.º de clones	% del total
Clones examinados	Todos los clones	191	100,0 %
	Clones de ARN1sg	96	50,3 %
	Clones de ARN2sg	95	49,7 %
PCRc	Coincidencias positivas de los 191 clones examinados	14	7,3 %
	Coincidencias de ARN1sg	7	3,7 %
	Coincidencias de ARN2sg	7	3,7 %
Tamaño del exón 1 por PCR	Todas las coincidencias de PCRc	14	7,3 %
	Falsos positivos por PCRc	6	3,1 %
	Coincidencias de ARN1sg	5	2,6 %
	Coincidencias de ARN2sg	3	1,6 %
Secuenciación	Todas las coincidencias	8	4,2 %
	Def. + SV	1	0,5%
	heterocigoto confuso	3	1,6 %
	Interrupción en el marco	2	1,0 %
	Interrupción DEF	2	1,0 %

Ejemplo 2. Introducción y expresión de un anticuerpo monoclonal (mAb1) en las líneas celulares clonales candidatas

5 El clon 1 y la línea celular huésped de control de tipo salvaje se transfectaron con plásmidos que codifican las cadenas ligeras y pesadas de mAb1, una IgG completamente humana, en presencia de Cre recombinasa para facilitar el intercambio de casetes mediado por recombinación (RMCE) en el locus EESYR (Patente de Estados Unidos n.º 7771997B2, emitida el 10 de agosto de 2010) Los cultivos transfectados se seleccionaron durante 11 días en medio sin suero que contenía higromicina 400 ug/ml. Las células que se sometieron a RMCE, se aislaron por citometría de flujo. PLBD2 eliminó el clon 1 y la línea celular huésped de tipo salvaje produjo una población recombinante observada equivalente (datos no mostrados). La línea celular isogénica derivada del clon 1 que expresa mAb1 se designó RS001, y la línea celular que expresa mAb1 se originó a partir del huésped de tipo salvaje PLBD2 se designó RS0WT

15 La producción por lotes alimentados de mAb1 a partir de RS001 o RS0WT se llevó a cabo en un procedimiento estándar de 12 días. El medio acondicionado para cada cultivo de producción se muestreó los días 0, 3, 5, 7, 10 y 13 y se cuantificó la fracción de unión a proteína A (Figura 3). El título de proteína de mAb1 del cultivo RS001 fue comparable al producido por RS0WT, e inesperadamente no hubo diferencias observables en el comportamiento de las células con respecto a los dos cultivos. No se puede predecir si la interrupción de PLBD2 o cualquier gen endógeno en una célula huésped CHO no tendría un efecto perjudicial observable en la producción de una proteína recombinante exógena, especialmente un anticuerpo monoclonal terapéutico.

Ejemplo 3. Detección de actividad esterasa en células CHO no modificadas

25 Se midió la degradación de polisorbato 20 o polisorbato 80 para detectar la supuesta actividad de esterasa en los sobrenadantes de mutantes PLBD2. El sobrenadante de proteína no purificada de células CHO, y el sobrenadante tomado en cada paso o secuencia de pasos cuando se sometió a pasos de purificación secuenciales, se probó para determinar la estabilidad del polisorbato. El porcentaje de polisorbato intacto informado fue inversamente proporcional a la cantidad de actividad de esterasa contaminante. El sobrenadante de proteína no purificada de células CHO, y el sobrenadante en cada paso o secuencia de pasos cuando se sometió a pasos de purificación secuenciales, se probó en ensayos que midieron la degradación de polisorbato. Los niveles relativos de polisorbato intacto reportados son inversamente proporcionales a los niveles de actividad de esterasa contaminante.

35 Se examinó la degradación del polisorbato 20 para determinar el agente etiológico responsable de la degradación del polisorbato 20 en una formulación de anticuerpo monoclonal. El anticuerpo tamponado (150 mg/ml) se separó en dos fracciones por filtración de 10 kDa: una fracción de proteína y una fracción de tampón. Estas dos fracciones, así como el anticuerpo tamponado intacto, se añadieron al 0,2 % (p/v) de polisorbato súper refinado 20 (PS20-B) y se estresaron a 45 ° C durante hasta 14 días. El estudio mostró (Tabla 6, parte A, columnas 1-2) que la fracción proteica, no la fracción tampón, tuvo un efecto sobre la degradación del laurato de sorbitán (es decir, el componente principal del polisorbato 20), y que la degradación del polisorbato 20 se correlacionó con la concentración del anticuerpo (Tabla 6, parte B, columnas 3-4).

TABLA 6, parte A

TABLA 6, parte N

Fracción	% de éster restante (14 días a 45 °C)	Concentración de anticuerpos (mg/ml)	% de éster restante (12 días a 45 °C)
Substancia de droga	75 %	150	82 %
Fracción proteica	75 %	75	92 %
Fracción de tampón	100 %	25	98 %

55 El anticuerpo monoclonal se produjo en una célula CHO no modificada y se purificó por diferentes procedimientos y la actividad de esterasa se midió en porcentaje de polisorbato intacto 20, como en la Tabla 7.

60

65

TABLA 7

n.º de procedimiento	Etapas de purificación	Porcentaje de polisorbato intacto 20
1	Captura de afinidad de proteína A (PA)	54 %
2	PA> intercambio catiónico (CEX)	25 %
3	PA> CEX> intercambio aniónico (AEX)	86 %
4	PA> CEX> interacción hidrofóbica (HIC)	90 %
5	PA> AEX	83 %
6	PA> AEX> HIC	92 %

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) fue más eficiente en la eliminación de PLBD2 residual. En algunas circunstancias, se podría lograr una reducción en el número de pasos de purificación y un menor coste. Por lo tanto, se contempló que una célula CHO modificada que tiene niveles reducidos de expresión de fosfolipasa reduce los pasos de purificación, y por ejemplo, puede eliminar la necesidad de purificación de HIC.

Ejemplo 4. Abundancia de proteína esterasa y detección de actividad en mAb1 purificado de células CHO modificadas en comparación con no modificadas.

Se produjo mAb1 a partir de RS001 y RS0WT y se purificó a partir de los medios acondicionados usando PA solo o cromatografía PA y AEX. Se analizó la abundancia de lipasa en mAb1 purificado con PA de RS001 y RS0WT usando espectrometría de masas de digestión con tripsina. Los digeridos con tripsina de RS001 y RS0WT mAb1 se inyectaron en una columna de cromatografía líquida de fase inversa acoplada a un conjunto de espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para monitorizar un ion de producto específico fragmentado a partir de SEQ ID NO: 32. Paralelamente, se preparó una serie de patrones de PLBD2 añadiendo cantidades variables de PLBD2 recombinante en mAb1 sin PLBD2 endógeno. Las señales de las reacciones experimentales y de control se usaron para cuantificar la abundancia de PLBD2 en mAb1 de RS001 y RS0WT (Figura 4). No se observaron cantidades detectables de proteína PLBD2 en las muestras purificadas de mAb1 producido por el clon 8 cuando se purificó con PA solo (datos no mostrados).

La presente invención puede realizarse en otras realizaciones específicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 <120> MODIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE CÉLULAS HUÉSPED
 <130> 10143WO01
 <140> PCT presentada en el presente documento
 <141> 2016-02-26
 <150> US 62/126,213
 <151> 2015-02-27
 <150> US 62/298,869
 <151> 2016-02-23
 <160> 60
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 1
 Asp Leu Leu Val Ala His Asn Thr Trp Asn Ser Tyr Gln Asn Met Leu
 1 5 10 15

Arg
 <210> 2
 <211> 22
 <212> PRT

ES 2 751 670 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 2
 Leu Ile Arg Tyr Asn Asn Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu
 1 5 10 15

 Ala Cys Ile Pro Lys Pro
 5 20
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 3
 Ser Val Leu Leu Asp Ala Ala Ser Gly Gln Leu Arg
 1 5 10
 <210> 4
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 4
 Asp Gln Ser Leu Val Glu Asp Met Asn Ser Met Val Arg
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 5
 Gln Phe Asn Ser Gly Thr Tyr Asn Asn Gln Trp Met Ile Val Asp Tyr
 1 5 10 15

 Lys
 30 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Sintética
 <400> 6
 Gln Gly Pro Gln Glu Ala Tyr Pro Leu Ile Ala Gly Asn Asn Leu Val
 1 5 10 15

 Phe Ser Ser Tyr
 20
 <210> 7
 <211> 19
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 7
 Ser Met Leu His Met Gly Gln Pro Asp Leu Trp Thr Phe Ser Pro Ile
 1 5 10 15

 45 Ser Val Pro
 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT

ES 2 751 670 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 8
 Tyr Asn Asn Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu Ala Cys Ile
 1 5 10 15

 Pro Lys Pro Asn Ala
 5 20
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 9
 Leu Ala Leu Asp Gly Ala Thr Trp Ala Asp Ile Phe Lys
 1 5 10
 <210> 10
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 10
 Leu Ser Leu Gly Ser Gly Ser Cys Ser Ala Ile Ile Lys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 11
 Tyr Val Gln Pro Gln Gly Cys Val Leu Glu Trp Ile Arg
 1 5 10
 30 <210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Sintética
 <400> 12
 Arg Met Ser Met Leu Ala Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro
 1 5 10 15

 Pro Phe Gln
 <210> 13
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 13
 Ser Phe Leu Glu Ile Asn Leu Glu Trp Met Gln Arg
 45 1 5 10
 <210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sintética
 <400> 14

ES 2 751 670 T3

Val Leu Thr Ile Leu Glu Gln Ile Pro Gly Met Val Val Val Ala Asp
 1 5 10 15

Ala Asp Lys Thr Glu Asp
 20

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 15
 Val Arg Ser Val Leu Leu Asp Ala Ala Ser Gly Gln Leu Arg
 1 5 10

10 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15 <223> Sintética
 <400> 16
 Leu Thr Leu Leu Gln Leu Lys Gly Leu Glu Asp Ser Tyr Glu Gly Arg
 1 5 10 15

20 <210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 17
 Met Ser Met Leu Ala Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro Pro
 1 5 10 15

25 Phe Gln
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética
 <400> 18
 Val Thr Ser Phe Ser Leu Ala Lys Arg
 1 5

35 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

40 <223> Sintética
 <400> 19
 Gln Asn Leu Asp Pro Pro Val Ser Arg
 1 5

45 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Sintética
 <400> 20
 Ile Ile Lys Lys Tyr Gln Leu Gln Phe Arg
 1 5 10

50 <210> 21
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 751 670 T3

<220>
 <223> Sintética
 <400> 21
 Ala Gln Ile Phe Gln Arg Asp Gln Ser Leu Val Glu Asp Met Asn Ser
 1 5 10 15

Met Val Arg
 5 <210> 22
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Sintética
 <400> 22
 Leu Ile Arg Tyr Asn Asn Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Ala Cys Ile Pro Lys Pro
 20
 <210> 23
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 23
 Ser Val Leu Leu Asp Ala Ala Ser Gly Gln Leu Arg
 20 1 5 10

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sintética
 <400> 24
 Asp Gln Ser Leu Val Glu Asp Met Asn Ser Met Val Arg
 1 5 10

30 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 35 <400> 25
 Asp Leu Leu Val Ala His Asn Thr Trp Asn Ser Tyr Gln Asn Met Leu
 1 5 10 15

Arg
 <210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 26
 Tyr Asn Asn Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu Ala Cys Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Asn Ala
 20
 45 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 751 670 T3

<220>
 <223> Sintética
 <400> 27
 Arg Met Ser Met Leu Ala Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro
 1 5 10 15

5 Pro Phe Gln
 <210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Sintética
 <400> 28
 Ser Met Leu His Met Gly Gln Pro Asp Leu Trp Thr Phe Ser Pro Ile
 1 5 10 15

15 Ser Val Pro
 <210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Sintética
 <400> 29
 Met Ser Met Leu Ala Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro Pro
 1 5 10 15

20 Phe Gln
 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintética
 <400> 30
 Val Arg Ser Val Leu Leu Asp Ala Ala Ser Gly Gln Leu Arg
 1 5 10

30 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> Sintética
 <400> 31
 Gln Asn Leu Asp Pro Pro Val Ser Arg
 1 5

<210> 32
 <211> 585
 <212> PRT

40 <213> Cricetulus griseus
 <400> 32

45

ES 2 751 670 T3

5 Met Ala Ala Pro Met Asp Arg Ser Pro Gly Gly Arg Ala Val Arg Ala
1 5 10 15

10 Leu Arg Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Leu Thr Glu Val Leu Leu Asn
20 25 30

15 Cys Pro Ala Gly Ala Leu Pro Thr Gln Gly Pro Gly Arg Arg Arg Gln
35 40 45

20 Asn Leu Asp Pro Pro Val Ser Arg Val Arg Ser Val Leu Leu Asp Ala
50 55 60

25 Ala Ser Gly Gln Leu Arg Leu Val Asp Gly Ile His Pro Tyr Ala Val
65 70 75 80

30 Ala Trp Ala Asn Leu Thr Asn Ala Ile Arg Glu Thr Gly Trp Ala Tyr
85 90 95

35 Leu Asp Leu Gly Thr Asn Gly Ser Tyr Asn Asp Ser Leu Gln Ala Tyr
100 105 110

40 Ala Ala Gly Val Val Glu Ala Ser Val Ser Glu Glu Leu Ile Tyr Met
115 120 125

45 His Trp Met Asn Thr Met Val Asn Tyr Cys Gly Pro Phe Glu Tyr Glu
130 135 140

50 Val Gly Tyr Cys Glu Lys Leu Lys Ser Phe Leu Glu Ile Asn Leu Glu
145 150 155 160

55 Trp Met Gln Arg Glu Met Glu Leu Ser Gln Asp Ser Pro Tyr Trp His

ES 2 751 670 T3

				165					170					175		
5	Gln	Val	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	Tyr
				180					185					190		
10	Glu	Gly	Arg	Leu	Thr	Phe	Pro	Thr	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Leu
			195					200					205			
15	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Gly	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln
		210					215					220				
20	Ala	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Thr	Lys	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Cys
	225					230						235				240
25	Ser	Ala	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
				245						250					255	
30	His	Asn	Thr	Trp	Asn	Ser	Tyr	Gln	Asn	Met	Leu	Arg	Ile	Ile	Lys	Lys
			260						265					270		
35	Tyr	Gln	Leu	Gln	Phe	Arg	Gln	Gly	Pro	Gln	Glu	Ala	Tyr	Pro	Leu	Ile
			275					280					285			
40	Ala	Gly	Asn	Asn	Leu	Val	Phe	Ser	Ser	Tyr	Pro	Gly	Thr	Ile	Phe	Ser
		290					295					300				
45	Gly	Asp	Asp	Phe	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Thr
	305					310						315				320
50	Thr	Ile	Gly	Asn	Lys	Asn	Pro	Ala	Leu	Trp	Lys	Tyr	Val	Gln	Pro	Gln
				325						330					335	
55	Gly	Cys	Val	Leu	Glu	Trp	Ile	Arg	Asn	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	Leu	Ala
				340					345					350		
60	Leu	Asp	Gly	Ala	Thr	Trp	Ala	Asp	Ile	Phe	Lys	Gln	Phe	Asn	Ser	Gly
			355					360					365			
65	Thr	Tyr	Asn	Asn	Gln	Trp	Met	Ile	Val	Asp	Tyr	Lys	Ala	Phe	Ile	Pro
		370					375						380			
70	Asn	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Ser	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Gln	Ile
	385					390					395					400
75	Pro	Gly	Met	Val	Val	Val	Ala	Asp	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Tyr	Lys	Thr
				405						410					415	

ES 2 751 670 T3

Thr Tyr Trp Ala Ser Tyr Asn Ile Pro Phe Phe Glu Ile Val Phe Asn
 420 425 430
 5
 Ala Ser Gly Leu Gln Asp Leu Val Ala Gln Tyr Gly Asp Trp Phe Ser
 435 440 445
 10
 Tyr Thr Lys Asn Pro Arg Ala Gln Ile Phe Gln Arg Asp Gln Ser Leu
 450 455 460
 15
 Val Glu Asp Met Asn Ser Met Val Arg Leu Ile Arg Tyr Asn Asn Phe
 465 470 475 480
 20
 Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu Ala Cys Ile Pro Lys Pro Asn
 485 490 495
 25
 Ala Glu Asn Ala Ile Ser Ala Arg Ser Asp Leu Asn Pro Ala Asn Gly
 500 505 510
 30
 Ser Tyr Pro Phe Gln Ala Leu Tyr Gln Arg Pro His Gly Gly Ile Asp
 515 520 525
 35
 Val Lys Val Thr Ser Phe Ser Leu Ala Lys Arg Met Ser Met Leu Ala
 530 535 540
 40
 Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro Pro Phe Gln Trp Ser Leu
 545 550 555 560
 45
 Ser Pro Phe Arg Ser Met Leu His Met Gly Gln Pro Asp Leu Trp Thr
 565 570 575
 50
 Phe Ser Pro Ile Ser Val Pro Trp Asp
 580 585

<210> 33
 <211> 2218
 55 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 33

60

ES 2 751 670 T3

gacagtcacg tggcccgact gaggcacgcg atggcggccc ccatggaccg gagccccggc 60
ggccggggcgg tccggggcgt gaggctagcg ctggcgctgg cctcgctgac tgaggtgttg 120
5 ctgaattgcc cggcggggcgc cctccccacg cagggggcccg gcaggcggcg ccaaaacctc 180
gaccgcccgg tctcccgcgt ccgctcgggt ctgctggacg ccgcgtcggg tcagctgcgc 240
10 ctggtggacg gcatccatcc ctacgcgggt gcctgggcca acctcaccaa cgccattcgc 300
gagaccgggt gggcctatct ggacttgggt acaaatggaa gctacaatga cagcctgcag 360
gcctatgcag ctggtgtggt ggaggcttct gtgtctgagg agctcatcta catgcaactgg 420
15
20

ES 2 751 670 T3

atgaacacaa tgggtcaacta ctgtggcccc ttcgagtatg aagttggcta ctgtgagaag 480
 ctcaagagct tcctggagat caacctggag tggatgcaga gggagatgga actcagccag 540
 5 gactctccat attggcacca ggtgcggctg accctcctgc agctgaaagg cctagaggac 600
 agctacgaag gccgtttgac cttcccaact gggaggttca ccattaaacc cttggggttc 660
 10 ctctgctgc agattgccgg agacctggaa gacctagagc aagccctgaa taagaccagc 720
 accaagcttt ccctgggctc cggttcctgc tccgctatca tcaagttgct gccaggcgca 780
 cgtgacctcc tgggtggcaca caacacatgg aactcctacc agaacatgct acgcatcatc 840
 15 aagaagtacc agctgcagtt cgggcagggg cctcaagagg cgtaccccct gattgctggc 900
 aacaatttgg tcttttcgtc ttaccggggc accatcttct ctggcgatga cttctacatc 960
 ctgggcagtg ggctggtcac cctggagacc accattggca acaagaatcc agccctgtgg 1020
 aagtacgtgc agccccaggg ctgtgtgctg gagtggattc gaaacatcgt ggccaaccgc 1080
 ctggccttgg acggggccac ctgggcagac atcttcaagc agttcaatag tggcacgtat 1140
 25 aataaccaat ggatgattgt ggactacaag gcattcatcc ccaacggggc cagccctgga 1200
 agccgagtgc ttaccatcct agaacagatc ccgggcatgg tgggtggtggc cgacaagact 1260
 gaagatctct acaagacaac ctactgggct agctacaaca tcccgttctt tgagattgtg 1320
 30 ttcaacgcca gtgggctgca ggacttgggtg gcccaatatg gagattgggtt ttcctacact 1380
 aagaaccctc gagctcagat cttccagagg gaccagtcgc tgggtggagga catgaattcc 1440
 35 atggtccggc tcataaggta caacaacttc cttcacgacc ctctgtcact gtgtgaagcc 1500
 tgtatcccga agcccaatgc agagaatgcc atctctgccc gctctgacct caatcctgcc 1560
 aatggctcct acccatttca agccctgtac cagcgtcccc acgggtggcat cgatgtgaag 1620
 40 gtgaccagct tttcactggc caagcgcagc agcatgctgg cagccagtgg cccaacgtgg 1680
 gatcagttgc cccattcca gtggagtta tcgccgttcc gcagcatgct tcacatgggc 1740
 cagcctgatc tctggacatt ctcacccatc agtgtcccat gggactgaga ctttgcctcc 1800
 acccagttgc cttcattctg tgtggccagt agggtcacac acctgctacc cacccttgg 1860
 ggctctgtcc tcaactggact ctggtctgtg tggctctctc tgcagggaca caaaccagc 1920
 50 aggctcagag ctgactccat cccaagtct tctgccctcc atcactcctt ctctctgccc 1980
 ctgtcaccag tgggctgggg cttgtgcttg gctgtgggcc tgggtgggatt ctgggcgcca 2040
 ttttctagt gctggctcct cagtgtgtgt gtgggggaca ttgatagggc ttatcattgc 2100
 55 tgtcactact agcctgcggg cccatctcct cagggagcag tccatgtccc cttctctggg 2160
 cagctttcct gaggatagaa gcttgaaaac aaaaaaccaa agtttctggc tgctttta 2218
 60

<210> 34
 <211> 594
 <212> PRT
 65 <213> Mus musculus
 <400> 34

ES 2 751 670 T3

Val Arg Leu Met Arg Tyr Asn Asp Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu
 485 490 495
 5
 Cys Glu Ala Cys Asn Pro Lys Pro Asn Ala Glu Asn Ala Ile Ser Ala
 500 505 510
 10
 Arg Ser Asp Leu Asn Pro Ala Asn Gly Ser Tyr Pro Phe Gln Ala Leu
 515 520 525
 15
 His Gln Arg Ala His Gly Gly Ile Asp Val Lys Val Thr Ser Phe Thr
 530 535 540
 20
 Leu Ala Lys Tyr Met Ser Met Leu Ala Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp
 545 550 555 560
 25
 Gln Cys Pro Pro Phe Gln Trp Ser Lys Ser Pro Phe His Ser Met Leu
 565 570 575
 30
 His Met Gly Gln Pro Asp Leu Trp Met Phe Ser Pro Ile Arg Val Pro
 580 585 590
 35
 Trp Asp
 40 <210> 35
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 35
 45

ES 2 751 670 T3

5 Met Ala Ala Pro Met Asp Arg Thr His Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Arg Arg Ala Leu Ala Leu Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ser
 20 25 30
 10 Gly Leu Ala Gly Ala Leu Pro Thr Leu Gly Pro Gly Trp Arg Arg Gln
 35 40 45
 15 Asn Pro Glu Pro Pro Ala Ser Arg Thr Arg Ser Leu Leu Leu Asp Ala
 50 55 60
 20 Ala Ser Gly Gln Leu Arg Leu Glu Tyr Gly Phe His Pro Asp Ala Val
 65 70 75 80
 25 Ala Trp Ala Asn Leu Thr Asn Ala Ile Arg Glu Thr Gly Trp Ala Tyr
 85 90 95
 30

ES 2 751 670 T3

Leu Asp Leu Gly Thr Asn Gly Ser Tyr Asn Asp Ser Leu Gln Ala Tyr
 100 105 110
 5 Ala Ala Gly Val Val Glu Ala Ser Val Ser Glu Glu Leu Ile Tyr Met
 115 120 125
 10 His Trp Met Asn Thr Val Val Asn Tyr Cys Gly Pro Phe Glu Tyr Glu
 130 135 140
 15 Val Gly Tyr Cys Glu Lys Leu Lys Ser Phe Leu Glu Ala Asn Leu Glu
 145 150 155 160
 20 Trp Met Gln Arg Glu Met Glu Leu Ser Pro Asp Ser Pro Tyr Trp His
 165 170 175
 25 Gln Val Arg Leu Thr Leu Leu Gln Leu Lys Gly Leu Glu Asp Ser Tyr
 180 185 190
 30 Glu Gly Arg Leu Thr Phe Pro Thr Gly Arg Phe Asn Ile Lys Pro Leu
 195 200 205
 35 Gly Phe Leu Leu Leu Gln Ile Ser Gly Asp Leu Glu Asp Leu Glu Pro
 210 215 220
 40 Ala Leu Asn Lys Thr Asn Thr Lys Pro Ser Val Gly Ser Gly Ser Cys
 225 230 235 240
 45 Ser Ala Leu Ile Lys Leu Leu Pro Gly Ser His Asp Leu Leu Val Ala
 245 250 255
 50 His Asn Thr Trp Asn Ser Tyr Gln Asn Met Leu Arg Ile Ile Lys Lys
 260 265 270
 55 Tyr Arg Leu Gln Phe Arg Glu Gly Pro Gln Glu Glu Tyr Pro Leu Ile
 275 280 285
 60 Ala Gly Asn Asn Leu Ile Phe Ser Ser Tyr Pro Gly Thr Ile Phe Ser
 290 295 300
 65 Gly Asp Asp Phe Tyr Ile Leu Gly Ser Gly Leu Val Thr Leu Glu Thr
 305 310 315 320
 60 Thr Ile Gly Asn Lys Asn Pro Ala Leu Trp Lys Tyr Val Gln Pro Gln
 325 330 335
 65 Gly Cys Val Leu Glu Trp Ile Arg Asn Ile Val Ala Asn Arg Leu Ala
 340 345 350

ES 2 751 670 T3

Leu Asp Gly Ala Thr Trp Ala Asp Val Phe Arg Arg Phe Asn Ser Gly
 355 360 365
 5
 Thr Tyr Asn Asn Gln Trp Met Ile Val Asp Tyr Lys Ala Phe Ile Pro
 370 375 380
 10
 Asn Gly Pro Ser Pro Gly Ser Arg Val Leu Thr Ile Leu Glu Gln Ile
 385 390 395 400
 15
 Pro Gly Met Val Val Val Ala Asp Lys Thr Ala Glu Leu Tyr Lys Thr
 405 410 415
 20
 Thr Tyr Trp Ala Ser Tyr Asn Ile Pro Tyr Phe Glu Ser Val Phe Asn
 420 425 430
 25
 Ala Ser Gly Leu Gln Ala Leu Val Ala Gln Tyr Gly Asp Trp Phe Ser
 435 440 445
 30
 Tyr Thr Arg Asn Pro Arg Ala Lys Ile Phe Gln Arg Asp Gln Ser Leu
 450 455 460
 35
 Val Glu Asp Val Asp Thr Met Val Arg Leu Met Arg Tyr Asn Asp Phe
 465 470 475 480
 40
 Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Glu Ala Cys Ser Pro Lys Pro Asn
 485 490 495
 45
 Ala Glu Asn Ala Ile Ser Ala Arg Ser Asp Leu Asn Pro Ala Asn Gly
 500 505 510
 50
 Ser Tyr Pro Phe Gln Ala Leu Arg Gln Arg Ala His Gly Gly Ile Asp
 515 520 525
 55
 Val Lys Val Thr Ser Val Ala Leu Ala Lys Tyr Met Ser Met Leu Ala
 530 535 540
 60
 Ala Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro Pro Phe Gln Trp Ser Lys
 545 550 555 560
 65
 Ser Pro Phe His Asn Met Leu His Met Gly Gln Pro Asp Leu Trp Met
 565 570 575
 Phe Ser Pro Val Lys Val Pro Trp Asp
 580 585

ES 2 751 670 T3

<210> 36
 <211> 589
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 36

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

ES 2 751 670 T3

Ser Gly Ser Cys Ser Ala Leu Ile Lys Leu Leu Pro Gly Gln Ser Asp
 245 250 255
 5
 Leu Leu Val Ala His Asn Thr Trp Asn Asn Tyr Gln His Met Leu Arg
 260 265 270
 10
 Val Ile Lys Lys Tyr Trp Leu Gln Phe Arg Glu Gly Pro Trp Gly Asp
 275 280 285
 15
 Tyr Pro Leu Val Pro Gly Asn Lys Leu Val Phe Ser Ser Tyr Pro Gly
 290 295 300
 20
 Thr Ile Phe Ser Cys Asp Asp Phe Tyr Ile Leu Gly Ser Gly Leu Val
 305 310 315 320
 25
 Thr Leu Glu Thr Thr Ile Gly Asn Lys Asn Pro Ala Leu Trp Lys Tyr
 325 330 335
 30
 Val Arg Pro Arg Gly Cys Val Leu Glu Trp Val Arg Asn Ile Val Ala
 340 345 350
 35
 Asn Arg Leu Ala Ser Asp Gly Ala Thr Trp Ala Asp Ile Phe Lys Arg
 355 360 365
 40
 Phe Asn Ser Gly Thr Tyr Asn Asn Gln Trp Met Ile Val Asp Tyr Lys
 370 375 380
 45
 Ala Phe Ile Pro Gly Gly Pro Ser Pro Gly Ser Arg Val Leu Thr Ile
 385 390 395 400
 50
 Leu Glu Gln Ile Pro Gly Met Val Val Val Ala Asp Lys Thr Ser Glu
 405 410 415
 55
 Leu Tyr Gln Lys Thr Tyr Trp Ala Ser Tyr Asn Ile Pro Ser Phe Glu
 420 425 430
 60
 Thr Val Phe Asn Ala Ser Gly Leu Gln Ala Leu Val Ala Gln Tyr Gly
 435 440 445
 65
 Asp Trp Phe Ser Tyr Asp Gly Ser Pro Arg Ala Gln Ile Phe Arg Arg
 450 455 460
 70
 Asn Gln Ser Leu Val Gln Asp Met Asp Ser Met Val Arg Leu Met Arg
 465 470 475 480
 75
 Tyr Asn Asp Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Lys Ala Cys Asn

ES 2 751 670 T3

				485					490					495		
5	Pro	Gln	Pro	Asn 500	Gly	Glu	Asn	Ala	Ile 505	Ser	Ala	Arg	Ser	Asp 510	Leu	Asn
10	Pro	Ala	Asn 515	Gly	Ser	Tyr	Pro	Phe 520	Gln	Ala	Leu	Arg	Gln 525	Arg	Ser	His
15	Gly	Gly 530	Ile	Asp	Val	Lys	Val 535	Thr	Ser	Met	Ser	Leu 540	Ala	Arg	Ile	Leu
20	Ser 545	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser 550	Gly	Pro	Thr	Trp	Asp 555	Gln	Val	Pro	Pro	Phe 560
25	Gln	Trp	Ser	Thr	Ser 565	Pro	Phe	Ser	Gly	Leu 570	Leu	His	Met	Gly	Gln 575	Pro
30	Asp	Leu	Trp	Lys 580	Phe	Ala	Pro	Val	Lys 585	Val	Ser	Trp	Asp			
35	Met 1	Val	Ala	Pro	Met 5	Tyr	Gly	Ser	Pro	Gly 10	Gly	Arg	Leu	Ala 15	Arg	Ala
40	Val	Thr	Arg	Ala 20	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu 25	Val	Leu	Ala	Leu	Leu 30	Val	Gly
45	Leu	Phe	Leu	Ser 35	Gly	Leu	Thr	Gly 40	Ala	Ile	Pro	Thr	Pro 45	Arg	Gly	Gln
50	Arg	Gly 50	Arg	Gly	Met	Pro	Val 55	Pro	Pro	Ala	Ser	Arg 60	Cys	Arg	Ser	Leu
55	Leu 65	Leu	Asp	Pro	Glu	Thr 70	Gly	Gln	Leu	Arg 75	Leu	Val	Asp	Gly	Arg	His 80
60	Pro	Asp	Ala	Val	Ala 85	Trp	Ala	Asn	Leu	Thr 90	Asn	Ala	Ile	Arg	Glu 95	Thr
65	Gly	Trp	Ala	Phe 100	Leu	Glu	Leu	His	Thr 105	Asn	Gly	Arg	Phe	Asn 110	Asp	Ser
	Leu	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu

<210> 37
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 37

ES 2 751 670 T3

	115		120		125												
	Leu	Ile	Tyr	Met	Tyr	Trp	Met	Asn	Thr	Val	Val	Asn	Tyr	Cys	Gly	Pro	
	130						135					140					
5	Phe	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly	Tyr	Cys	Glu	Arg	Leu	Lys	Asn	Phe	Leu	Glu	
	145					150					155					160	
10	Ala	Asn	Leu	Glu	Trp	Met	Gln	Lys	Glu	Met	Glu	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	
					165					170					175		
15	Ala	Tyr	Trp	His	Gln	Val	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	
				180					185					190			
20	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Gly	Lys	Phe	Thr	
			195					200					205				
25	Val	Lys	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Glu	
	210						215					220					
30	Asp	Leu	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	Lys	Thr	Lys	Thr	Asn	His	Ala	Met	Gly	
	225					230					235					240	
35	Ser	Gly	Ser	Cys	Ser	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Asp	
					245					250					255		
40	Leu	Leu	Val	Ala	His	Asn	Thr	Trp	His	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Met	Leu	Arg	
				260					265					270			
45	Ile	Met	Lys	Lys	Tyr	Trp	Phe	Gln	Phe	Arg	Glu	Gly	Pro	Gln	Ala	Glu	
			275					280					285				
50	Ser	Thr	Arg	Ala	Pro	Gly	Asn	Lys	Val	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr	Pro	Gly	
		290					295					300					
55	Thr	Ile	Phe	Ser	Cys	Asp	Asp	Phe	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	
	305					310					315					320	
60	Thr	Leu	Glu	Thr	Thr	Ile	Gly	Asn	Lys	Asn	Pro	Ala	Leu	Trp	Lys	Tyr	
					325					330					335		
65	Val	Gln	Pro	Thr	Gly	Cys	Val	Leu	Glu	Trp	Met	Arg	Asn	Val	Val	Ala	
				340					345					350			
70	Asn	Arg	Leu	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Ser	Trp	Ala	Asp	Ile	Phe	Lys	Arg	
			355					360					365				

ES 2 751 670 T3

5 Phe Asn Ser Gly Thr Tyr Asn Asn Gln Trp Met Ile Val Asp Tyr Lys
370 375 380

10 Ala Phe Val Pro Gly Gly Pro Ser Pro Gly Arg Arg Val Leu Thr Val
385 390 400

15 Leu Glu Gln Ile Pro Gly Met Val Val Val Ala Asp Arg Thr Ser Glu
405 410 415

20 Leu Tyr Gln Lys Thr Tyr Trp Ala Ser Tyr Asn Ile Pro Ser Phe Glu
420 425 430

25 Ser Val Phe Asn Ala Ser Gly Leu Pro Ala Leu Val Ala Arg Tyr Gly
435 440 445

30 Pro Trp Phe Ser Tyr Asp Gly Ser Pro Arg Ala Gln Ile Phe Arg Arg
450 455 460

35 Asn His Ser Leu Val His Asp Leu Asp Ser Met Met Arg Leu Met Arg
465 470 475 480

40 Tyr Asn Asp Phe Leu His Asp Pro Leu Ser Leu Cys Lys Ala Cys Thr
485 490 495

45 Pro Lys Pro Asn Gly Glu Asn Ala Ile Ser Ala Arg Ser Asp Leu Asn
500 505 510

50 Pro Ala Asn Gly Ser Tyr Pro Phe Gln Ala Leu His Gln Arg Ser His
515 520 525

55 Gly Gly Ile Asp Val Lys Val Thr Ser Thr Ala Leu Ala Lys Ala Leu
530 535 540

60 Arg Leu Leu Ala Val Ser Gly Pro Thr Trp Asp Gln Leu Pro Pro Phe
545 550 555 560

65 Gln Trp Ser Thr Ser Pro Phe Ser Gly Met Leu His Met Gly Gln Pro
565 570 575

Asp Leu Arg Lys Phe Ser Pro Ile Glu Val Ser Trp Asp
580 585

<210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sintética
 <400> 38
 ctgaggtgtt gctgaattgc ccggcgggcg 30
 <210> 39
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 15 <400> 39
 gacgcggcgt ccagcagcac cgagcggacg 30
 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 40
 accgcgggt ctccgcgtc cgctcgggtgc 30
 25 <210> 41
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sintética
 <400> 41
 tggtagcgg catccatccc tacgcggtgg 30
 <210> 42
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 42
 40 ggcggcccc atgaccgga gccccggcgg 30
 <210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 43
 cccatggacc ggagccccgg cggccgggcg 30
 <210> 44
 50 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 55 <400> 44
 gacagtcacg tggcccgact gaggcacgcg 30
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 45
 gccccatgg accggagccc 20
 65 <210> 46
 <211> 20

ES 2 751 670 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 5 <400> 46
 tggaccggag ccccgcggc 20
 <210> 47
 <211> 278
 <212> ADN
 10 <213> Cricetulus griseus
 <400> 47
 ccggtctcgc gaatggcggt ggtgaggtg gcccaggcca ccgcgtaggg atggatgccg 60
 tccaccaggc gcagctgacc cgacgcggcg tccagcagca ccgagcggac gcgggagacc 120
 ggcgggtcga ggttttggcg ccgcctgccg ggcccctgcy tggggagggc gcccgccggg 180
 caattcagca acacctcagt cagcgaggcc agcgcagcg ctagcctcag cgccccgacc 240
 gcccgccgc cggggctccg gtccatgggg gccgccat 278
 <210> 48
 <211> 94
 15 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 48
 ctctcagac acagaagcct ccaccacacc agctgcatag gcctgcaggc tgtcattgta 60
 20 gcttccattt gtaccaagt ccagataggc ccac 94
 <210> 49
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 25 <400> 49
 ctggtgcca tatggagagt cctggctgag ttccatctcc ctctgcatcc actccaggtt 60
 gatctccagg aagctcttga gcttctcaca gtagccaact tcatactcga aggggccaca 120
 gtagttgacc attgtgttca tccagtgcac gtagatgag 159
 <210> 50
 <211> 101
 <212> ADN
 30 <213> Cricetulus griseus
 <400> 50
 aggaacccca agggtttaat ggtgaacctc ccagttggga aggtcaaacg gccttcgtag 60
 ctgtcctcta ggcctttcag ctgcaggagg gtcagccgca c 101
 <210> 51
 <211> 215
 <212> ADN
 35 <213> Cricetulus griseus
 <400> 51
 cttgaggccc ctgcccgaac tgcagctggt acttcttgat gatgcgtagc atgttctggt 60
 aggagtcca tgtgttgtgt gccaccagga ggtcacgtgc gcctggcagc aacttgatga 120
 tagcggagca ggaaccggag cccaggaaa gcttggtgct ggtcttattc agggcttgct 180
 ctaggtcttc caggtctccg gcaatctgca gcagg 215
 <210> 52
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 52
 40 cagcccactg cccaggatgt agaagtcac gccagagaag atggtgcccg ggtaagacga 60
 aaagacaaa ttgttgccag caatcagggg gtacgcct 98
 <210> 53
 <211> 161

ES 2 751 670 T3

<212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 53
 gtgccactat tgaactgctt gaagatgtct gccaggtgg ccccgccaa ggccaggcgg 60
 ttggccacga tgtttcgaat cactccagc acacagccct ggggctgcac gtacttccac 120
 5 agggctggat tcttggtgcc aatggtggtc tccagggtga c 161
 <210> 54
 <211> 96
 <212> ADN
 10 <213> Cricetulus griseus
 <400> 54
 gggatctggt ctaggatggt aagcactcgg cttccagggc tgggcccggt ggggatgaat 60
 gcctttagt ccacaatcat ccattggtta ttatac 96
 <210> 55
 <211> 72
 <212> ADN
 15 <213> Cricetulus griseus
 <400> 55
 gggatggtt agctagccca gtaggtgtc ttgtagagat cttcagtctt gtcggccacc 60
 accaccatgc cc 72
 <210> 56
 20 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 56
 cttatgagcc ggaccatgga attcatgtcc tccaccagcg actggtccct ctggaagatc 60
 tgagctcgag ggttcttagt gtaggaaaac caatctccat attgggccac caagtctcgc 120
 agcccactgg cgttgaacac aatctcaaag aac 153
 25 <210> 57
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 57
 cttcacatcg atgccaccgt ggggacgctg gtacagggct tgaatgggt aggagccatt 60
 ggcaggattg agtccagagc gggcagagat ggcattctct gcattgggct tcgggataca 120
 30 ggcttcacac agtgacagag ggtcgtgaag gaagttggtg tac 163
 <210> 58
 <211> 168
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 35 <400> 58
 tcagtcccat gggacactga tgggtgagaa tgtccagaga tcaggctggc ccatgtgaag 60
 catgctgcgg aacggcgata aactccactg gaatggggc aactgatccc acgttgggcc 120
 actggctgcc agcatgctca tgcgcttggc cagtgaaaag ctggtcac 168
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 59
 gggcuccggu ccaugggggc 20
 45 <210> 60
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 751 670 T3

<223> Sintética
<400> 60
gccgccgggg cuccggucca 20

5

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped recombinante que comprende una modificación en una secuencia codificante de un polinucleótido que codifica una proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2), en la que la modificación disminuye el nivel de expresión de la proteína PLBD2 en relación con el nivel de expresión de una proteína PLBD2 en una célula que carece la modificación, en la que la célula no expresa la proteína PLBD2 detectable y en la que la célula además comprende un gen añadido de forma exógena que codifica una proteína de interés.
2. La célula huésped de la reivindicación 1, en la que:
- (a) todos los alelos de la secuencia codificante del polinucleótido que codifica la proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2) comprenden la modificación; y/o
- (b) la modificación comprende una inserción o delección de nucleótidos dentro del exón 1 de la secuencia de codificación del polinucleótido que codifica la proteína PLBD2.
3. La célula huésped de la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína PLBD2 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 32.
4. La célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína PLBD2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36.
5. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la modificación comprende una inserción o delección de nucleótidos dentro de la SEQ ID NO: 47.
6. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína exógena de interés se selecciona del grupo que consiste en una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno y una proteína de fusión Fc.
7. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la célula produce una fracción de unión a proteína A que no tiene actividad esterasa detectable.
8. La célula huésped recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que:
- (a) la modificación del gen PLBD2 comprende una modificación bialélica; y/o
- (b) la modificación del gen PLBD2 comprende una eliminación de 1 o más pares de bases, 2 o más pares de bases, 3 o más pares de bases, 4 o más pares de bases, 5 o más pares de bases, 6 o más pares de bases, 7 o más pares de bases, 8 o más pares de bases, 9 o más pares de bases, 10 o más pares de bases, 11 o más pares de bases, 12 o más pares de bases, 13 o más pares de bases, 14 o más pares de bases, 15 o más pares de bases, 16 o más pares de bases, 17 o más pares de bases, 18 o más pares de bases, 19 o más pares de bases, o 20 o más pares de bases del gen PLBD2: y/o
- (c) la modificación del gen PLBD2 da como resultado un desplazamiento de marco de la proteína PLBD2 traducida.
9. La célula huésped recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la modificación es una interrupción dirigida en un sitio objetivo, en el que el sitio objetivo se selecciona del grupo que consiste en los nucleótidos que abarcan posiciones numeradas 37-56, 44-56, 33 -62, 40-69, 110-139, 198-227, 182-211 y 242-271 de SEQ ID NO: 33.
10. La célula huésped recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la célula huésped recombinante es una célula eucariota; opcionalmente
- en la que la célula eucariota es una célula de mamífero; opcionalmente
- en el que la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en la célula CHO K1, una célula DXB-11 CHO, una célula Veggie-CHO, una célula COS-7, una célula Vero, una célula CV1, una célula HEK293, una célula 293 EBNA, una célula MSR 293, una célula MDCK, una célula HaK, una célula BHK21, una célula HeLa, una célula HepG2, una célula WI38, una célula MRC 5, una célula Colo25, una célula HB 8065, una célula HL-60, una célula Jurkat, una célula Daudi, una célula A431, una célula U937, una célula 3T3, una célula L, una célula C127, una célula SP2/0, una célula NS-0 y una célula MMT; opcionalmente
- en la que la célula es una célula CHO.

11. Un procedimiento para reducir la actividad de esterasa en una formulación de proteína que comprende las etapas de: (a) modificar una célula huésped para disminuir o eliminar la expresión de la proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2), (b) transfectar la célula huésped con un codificador de polinucleótidos una proteína de interés, (c) extraer una fracción de proteína que comprende la proteína de interés de la célula huésped, (d) contactar la fracción de proteína con una columna de cromatografía seleccionada del grupo que consiste en afinidad de proteína A (PA), intercambio catiónico (CEX) e intercambio aniónico (AEX), (e) recolectar la proteína de interés de los medios y (f) combinar la proteína de interés con un éster de ácido graso y, opcionalmente, un tampón y estabilizador térmico.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la etapa de modificar una célula huésped para disminuir o eliminar la expresión de la proteína 2 de tipo fosfolipasa B (PLBD2) comprende insertar o eliminar al menos un nucleótido dentro del exón 1 de un polinucleótido que codifica la proteína PLBD2.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en la que el polinucleótido que codifica la proteína PLBD2 comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 32.

20

PCRc para el exón 1 de PLBD2 en clones DEF. en PLBD2 de CHO candidatos

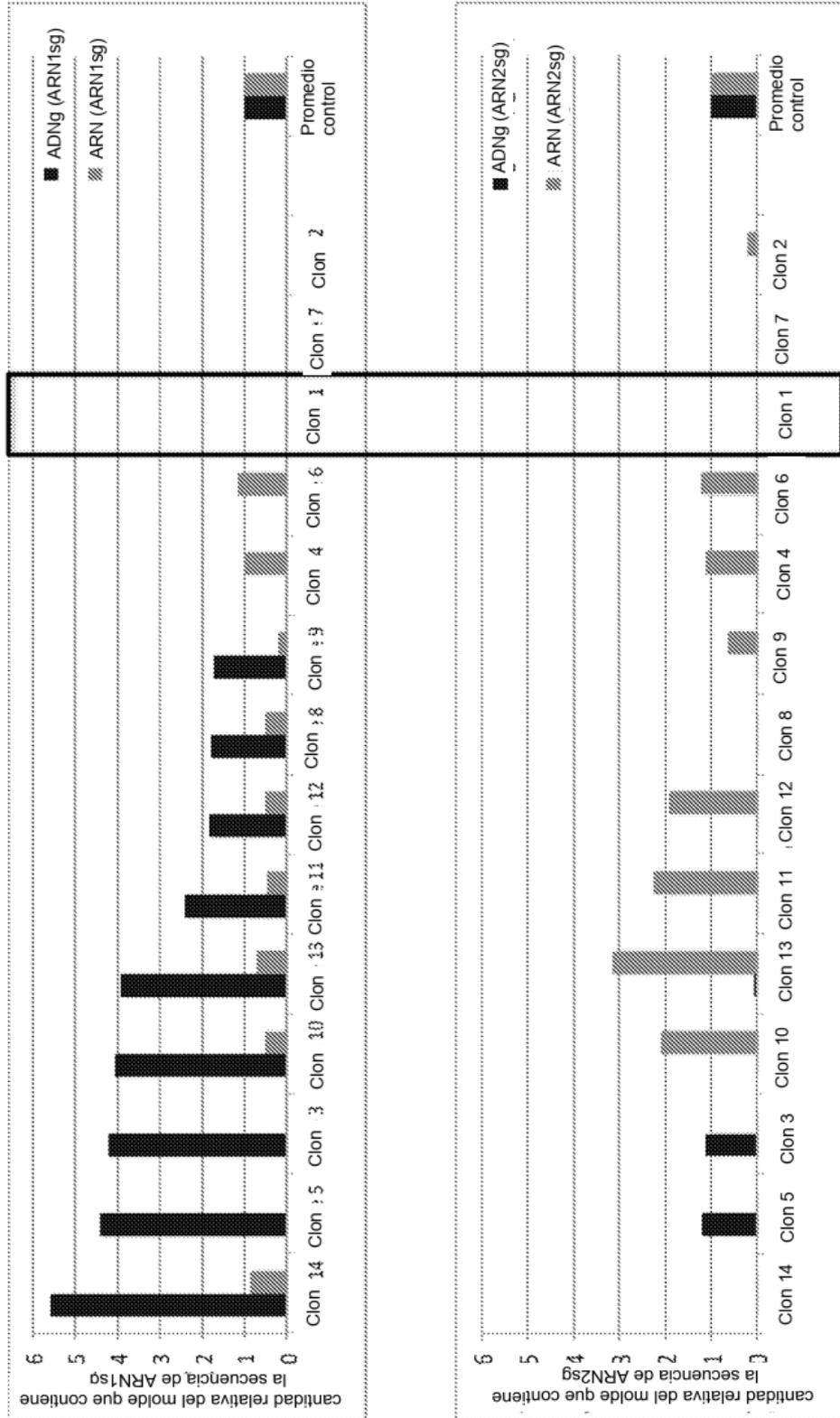


Fig. 1

Análisis PCR del exón 1 de PLBD2 en el clon 1 y las líneas de células huésped CHO SV

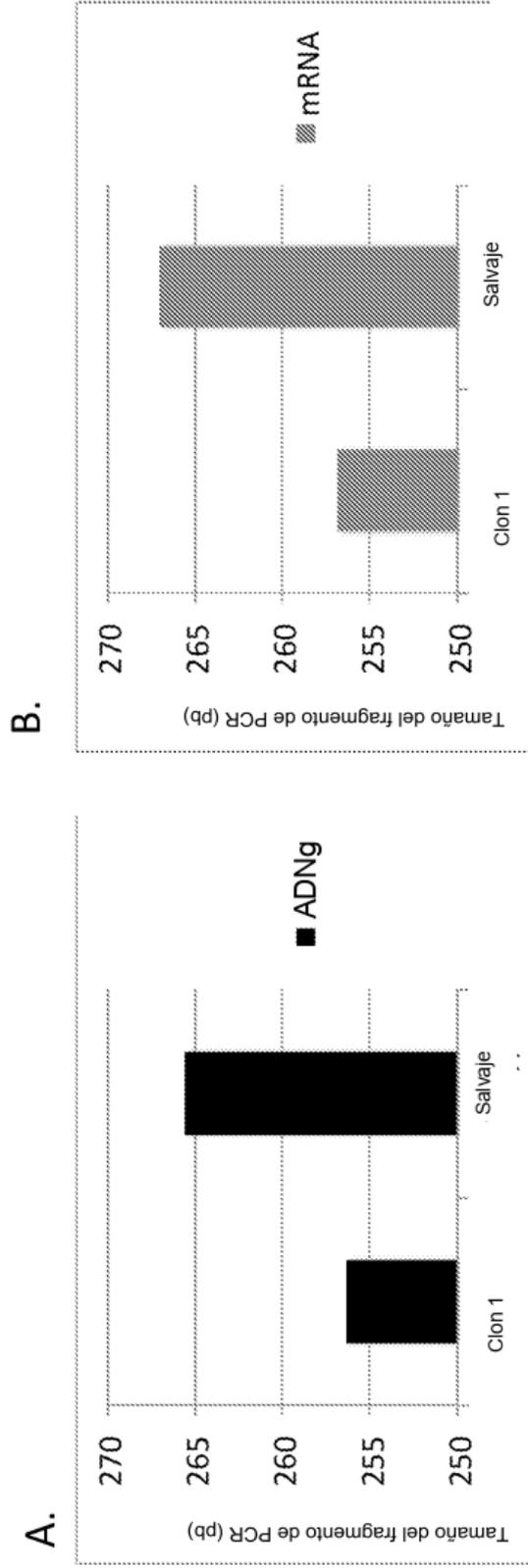


Fig. 2

Producción discontinua de mAb1 en el clon 1 en comparación con las células CHO SV

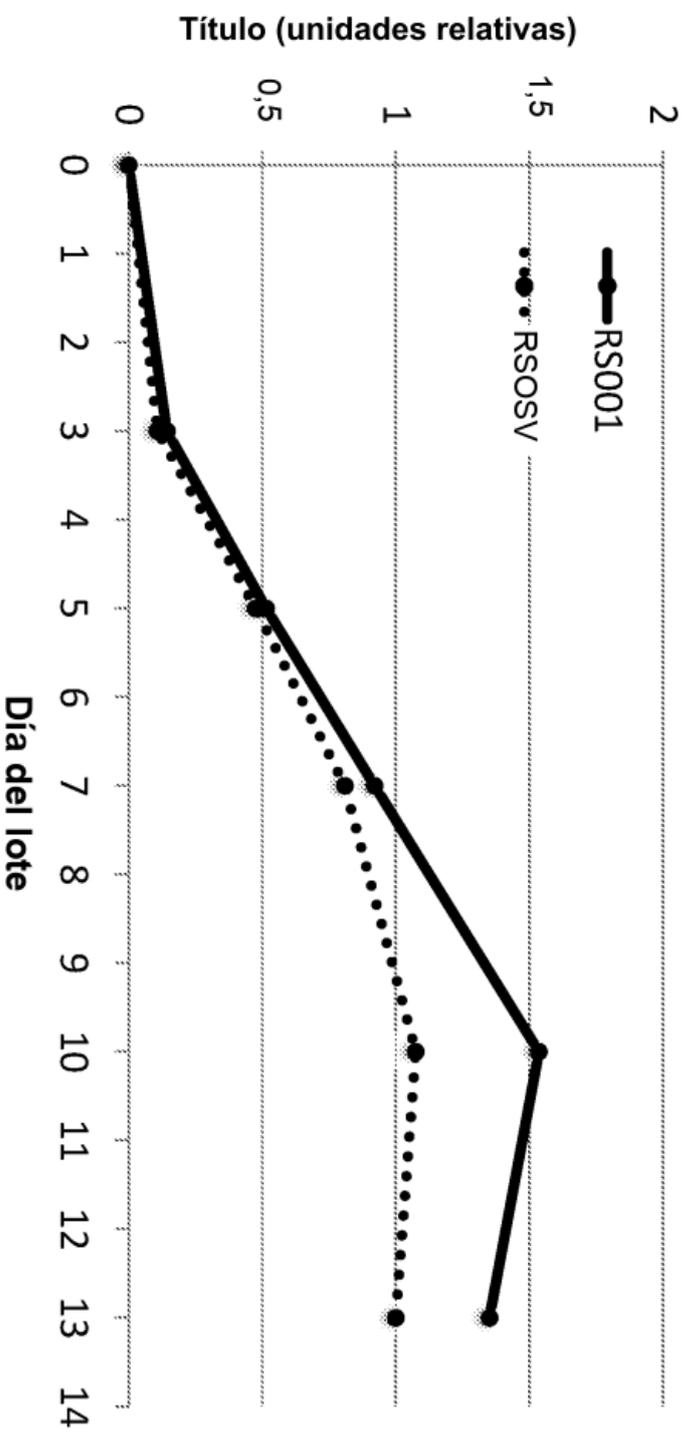


Fig. 3

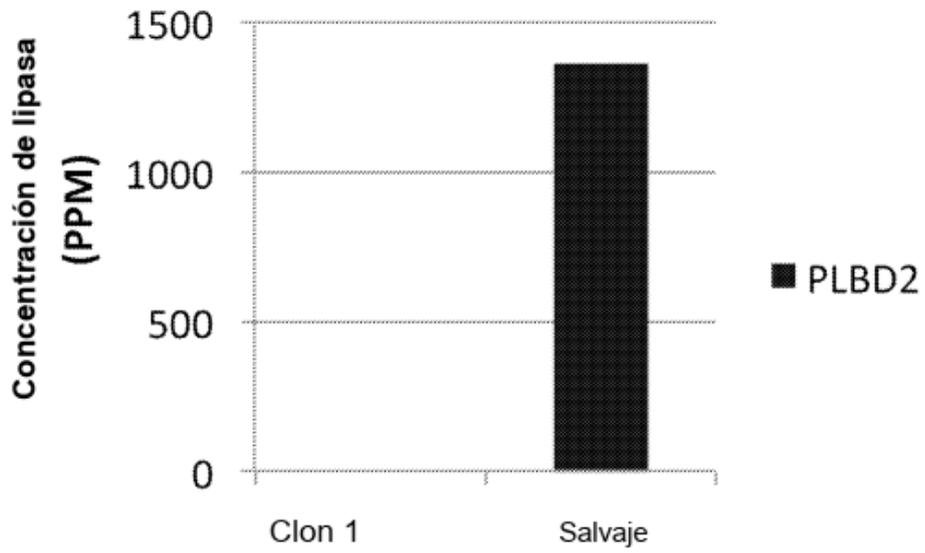


Fig. 4