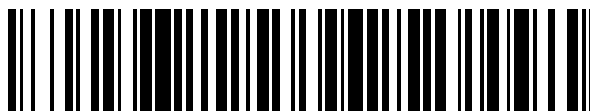


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 504**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/IB2014/067073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14821859 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3083676**

54 Título: **Células eucariotas novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un producto de interés**

30 Prioridad:

20.12.2013 US 201361919313 P

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

05.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOSTOCK, THOMAS;
LAUX, HOLGER y
RITTER, ANETT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 758 504 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células eucariotas novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un producto de interés

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere al campo de tecnologías de expresión recombinante. Proporciona, entre otras cosas, células eucariotas alteradas que tienen capacidad de producción potenciada de un producto de interés, así como su uso en métodos de expresión recombinante. Además, se proporcionan herramientas que permiten, al principio del proceso de selección, la identificación de células eucariotas que expresen un producto recombinante con alto rendimiento y estabilidad mejorada basándose en el perfil de expresión de la célula eucariota. La célula eucariota preferiblemente es una célula de mamífero.

15 Antecedentes de la divulgación

El mercado de biofármacos sigue creciendo a alta velocidad ya que los biofármacos cada vez son más importantes en la medicina actual. Actualmente, se produce un número creciente de biofármacos en células eucariotas, tal como, en particular, células de mamífero. Por tanto, la producción de alto rendimiento satisfactoria de biofármacos en células de mamífero es crucial. El tiempo para generar dicha línea celular que produzca una proteína terapéutica de interés es una parte esencial del tiempo necesario para producir cualquier biofármaco en clínica. Además, considerando también los costes de producción de los biofármacos, es importante tener líneas celulares eucariotas recombinantes de expresión alta y estable, en particular líneas celulares de mamífero.

Por motivos de eficacia de producción de biofármacos en particular a escala industrial, se está dedicando un tremendo esfuerzo al proceso de selección de clones, con el objetivo de identificar clones de alta producción con buena estabilidad de expresión y características de crecimiento en una corta cantidad de tiempo. La generación de clones celulares recombinantes para la producción de proteínas terapéuticas habitualmente comprende un cribado excesivo de clones individuales para detectar y aislar clones de alta expresión. Sin embargo, incluso si se identifican clones de alta expresión en el transcurso del proceso de cribado, estos clones inicialmente de alta expresión a menudo pierden sus características de expresión ventajosas y el rendimiento de expresión disminuye a lo largo del tiempo. Esta pérdida gradual de expresión de proteínas recombinantes en los clones celulares durante subcultivo prolongado es un problema común con muchas líneas celulares tales como líneas celulares CHO y se denomina inestabilidad. Esta inestabilidad afecta gravemente al proceso de producción industrial de polipéptidos producidos de forma recombinante. Por lo tanto, deben tomarse precauciones a fin de identificar, dentro de la población de células de expresión satisfactoria e incluso entre los clones celulares que expresan la proteína de interés inicialmente con un buen rendimiento, aquellas células, respectivamente clones celulares, que también tengan una alta estabilidad de producción durante cultivo prolongado y, por lo tanto, no sean propensas a una pérdida gradual de expresión de proteínas recombinantes. Dichos clones también se llaman clones "estables". Durante periodos de cultivo prolongados, los clones estables no deben perder más de un 30 %, preferiblemente un 25 % de su productividad inicial en un periodo de 8-12 semanas. La productividad se define como la productividad volumétrica, que es la cantidad expresada de proteína por volumen (por ejemplo, g/l) en un determinado punto temporal de cultivo, respectivamente como productividad específica celular, que es la cantidad específica de proteína expresada por célula por día (por ejemplo, pg/célula/día). Para evitar que se seleccione para posterior producción a gran escala un clon celular que sea propenso a inestabilidad y, por lo tanto, que perderá el valor cuantitativo durante cultivo prolongado, habitualmente se realizan análisis de estabilidad exhaustivos durante varias semanas hasta varios meses para eliminar aquellos clones celulares que lleguen a ser inestables durante ese periodo de tiempo y para identificar los clones estables. Por lo tanto, la generación de clones celulares recombinantes para la producción de proteínas terapéuticas y otros polipéptidos recombinantes que se producen a gran escala habitualmente comprende un cribado excesivo y lento de clones individuales para identificar los clones celulares de alta expresión que también muestran la estabilidad de expresión necesaria para producción a gran escala. Esta práctica prolonga el desarrollo de procesos biotecnológicos tales como procesos de producción de biofármacos. Incluso cuando se usan sistemas de selección muy rigurosos que favorecen la supervivencia de células de alta expresión en las condiciones de selección usadas, encontrar un clon de producción adecuado dentro de la población superviviente que combine una alta tasa de expresión con buenas características de crecimiento y estabilidad es difícil.

55 Kobayashi *et al.* (Blood 84(10): 3473-3482, 1994) analizan traslocaciones y eliminaciones en el brazo corto del cromosoma 12 en células de médula ósea o sangre periférica que se obtuvieron de pacientes individuales con neoplasias hemáticas. Oostvogels *et al.* (Leukemia 27: 642-649, 2013) tratan la inmunoterapia eficaz y segura después de trasplante de células madre alogénicas y describen que el antígeno de histocompatibilidad secundario UTA2-1 está codificado por el marco abierto de lectura C12orf35. La base de datos UniProt (en línea, 2007, recuperado del n.º de acceso a EBI UNIPROT: Q9HCM1, n.º de acceso de la base de datos Q9HCM1) muestra una entrada en la base de datos Uniprot para la proteína KIAA1551. El documento WO 2008/133711 A2 se refiere a expresión potenciada de anticuerpos de un anticuerpo de interés por líneas celulares transformadas por métodos de perturbación génica homocigótica aleatoria para aumentar o disminuir el patrón de expresión de un gen de la línea celular distinto del anticuerpo de interés.

Un objeto de la invención es mejorar la producción recombinante de un producto de interés en células eucariotas tal como, en particular, células de mamífero. En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar una línea celular eucariota novedosa que, tras la transfección con un polinucleótido que codifica un producto de interés, expresa el producto de interés con rendimiento mejorado. Además, un objeto es proporcionar un método de selección que permita identificar células transfectadas satisfactoriamente con características de expresión mejoradas. Además, un objeto es proporcionar un método mejorado para producir de forma recombinante un producto de interés. Además, un objeto es proporcionar herramientas de análisis que permitan discriminar entre clones celulares recombinantes de alta y baja producción y/o entre clones celulares estables e inestables en una etapa inicial del proceso de desarrollo.

Compendio de la divulgación

La presente invención puede definirse por las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con la reivindicación 1, un método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un producto de interés de acuerdo con la reivindicación 14, un método para producir de forma recombinante un producto de interés de acuerdo con la reivindicación 18, un método para producir una célula eucariota de acuerdo con la reivindicación 20 y un método que comprende analizar células eucariotas que expresan de forma recombinante un polipéptido de interés para su idoneidad como células hospedadoras para expresión recombinante de un producto de interés de acuerdo con la reivindicación 21.

La presente divulgación se basa, entre otras cosas, en el hallazgo inesperado de que alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en una célula eucariota, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35 en dicha célula, permite aumentar significativamente la expresión de un producto recombinante de interés en dicha célula. Por tanto, se identificó un gen clave que influye en la expresión recombinante. La alteración del efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en la célula como se describe en este documento permite mejorar significativamente la producción recombinante de un producto de interés aumentando el rendimiento de expresión. Por lo tanto, la presente invención realiza una contribución importante a la técnica anterior.

También se divulga lo siguiente:

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una célula eucariota aislada, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula. La alteración puede conseguirse, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen endógeno C12orf35 en dicha célula, por ejemplo, por silenciamiento génico, eliminación génica o por mutación del gen de modo que se exprese una proteína no funcional o menos funcional. Como se muestra por los ejemplos, tras la transfección transitoria o estable, las células eucariotas respectivamente alteradas sorprendentemente pueden producir un producto recombinante de interés con mayor rendimiento. Por tanto, estas células eucariotas son particularmente adecuadas como células hospedadoras para tecnologías de producción recombinante y pueden usarse para producción recombinante de un producto de interés.

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

- (a) proporcionar células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto como células hospedadoras, en el que dichas células hospedadoras comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés; y
- (b) seleccionar una o más células hospedadoras que expresan el producto de interés.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un método para producir de forma recombinante un producto de interés, que comprende usar una célula eucariota de acuerdo con el primer aspecto como célula hospedadora para la expresión recombinante del producto de interés. Como se describe anteriormente, debido a la capacidad de producción aumentada, estas células eucariotas novedosas son particularmente adecuadas como células hospedadoras para producción recombinante.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un método para producir una célula eucariota adecuada para producción recombinante de un producto de interés, que comprende alterar el efecto del producto de expresión de un gen endógeno C12orf35 en la célula eucariota. Esto puede conseguirse, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35 en dicha célula.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método para analizar células eucariotas para su idoneidad como células hospedadoras para expresión recombinante de un producto de interés, que comprende analizar directamente o indirectamente si el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dichas células. Este método puede usarse ventajosamente, por ejemplo, en combinación con el método de acuerdo con el cuarto aspecto para identificar, por ejemplo, si se obtuvo una célula eucariota en la que el efecto del producto de expresión del gen

C12orf35 está alterado. Además, este método puede usarse como herramienta analítica para discriminar entre clones de alta y baja expresión y en realizaciones entre clones estable e inestables que expresan el producto de interés.

De acuerdo con un sexto aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una célula eucariota aislada para expresar de forma recombinante un producto de interés, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La **Fig. 1** proporciona un resumen esquemático de la región telomérica del cromosoma 8 de células de ovario de hámster chino (CHO) y genes ubicados en dicha región telomérica. La región genómica representada en la figura es el resultado de los armazones combinados número 6 y 25 en el cromosoma 8. Puede encontrarse un resumen general sobre genes y genes putativos del cromosoma 8 de células CHO usando el archivo de acotación de la genoteca asociado con el conjunto de Brinkrolf *et al.* (Nature Biotechnology volumen 31, 694-695 (2013); véase genoteca: APMK00000000, versión APMK01000000 como se describe en dicha publicación). Además, el Beijing Genomics Institute también proporcionó una acotación de esta región (Xu *et al.*, Nature Biotechnology, volumen 29, número 8, 735-741 (2011); véase genoteca: AFTD00000000, versión AFTD01000000). Las anotaciones que están marcadas con un * en la figura 1 son del archivo de la genoteca AFTD01000000.

Puede encontrarse un resumen general correspondiente de la región telomérica del cromosoma 6 de ratón, por ejemplo, en la base de datos Ensembl. El cromosoma 6 de ratón tiene una estructura que corresponde al cromosoma 8 de hámster chino. El posterior enlace de la base de datos Ensembl muestra la región telomérica del cromosoma 6 de ratón que contiene el gen C12orf35 (llamado aquí 2810474O19Rik):

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000032712;r=6:149309414-149335658

La posterior tabla 1 proporciona un resumen general sobre abreviaturas y nombres alternativos (sobrenombres) de genes y productos codificados mostrados en la figura 1 e indica la acotación correspondiente en ratón y hámster chino (de acuerdo con Brinkrolf *et al.*, 2013 y/o Xu *et al.*, 2011) cuando sea factible. La tabla 1 también enumera nombres alternativos usados, por ejemplo, en diferentes especies. Cuando la presente divulgación se refiere a un nombre de proteína o gen específico, este también se refiere a y engloba cualquier nombre alternativo de dicha proteína o gen, por ejemplo, usado para caracterizar el gen o proteína correspondiente en una especie diferente. En particular, se engloban de ese modo homólogos y ortólogos que tienen la misma función.

Tabla 1: Abreviaturas y nombres alternativos (sobrenombres) de productos codificados por genes ubicados en el cromosoma 8 de hámster chino o el cromosoma 6 de ratón.

Abreviatura	En la acotación pública de hámster chino, el producto génico se indica como	En la acotación pública de ratón, el producto génico se indica como	Sobrenombres (véase www.genecards.org)
Ccdc91	Proteína 91 que contiene dominio superenrollado	91 que contiene dominio superenrollado	91 que contiene dominio superenrollado P56 Compañero de unión a GGA Proteína accesoria P56 DKFZp779L1558 FLJ11088 Proteína 91 que contiene dominio superenrollado Compañero de unión a GGA GGABP
Far2	Isoforma 1 de la acil CoA reductasa 1 de ácidos grasos	Acil CoA reductasa 2 de ácidos grasos	Acil CoA reductasa 2 de ácidos grasos MLSTD1 SDR10E2 Proteína 1 que contiene dominio de esterilidad masculina EC 1.2.1.N2 FLJ10462

ES 2 758 504 T3

			1 que contiene dominio de esterilidad masculina Acil CoA reductasa 2 de ácidos grasos Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, familia 10E, miembro 2
Ergic2	Proteína 2 del compartimiento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi	ERGIC y golgi 2	ERGIC y Golgi 2 PTX1 Erv41 Cd002 Proteína CD14 Proteína 2 del compartimiento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi ERV41 CDA14
RPS4Y2	Proteína S4 ribosómica de 40S, de tipo isoforma X	Proteína S4 ribosómica, 2 ligada al Y	Proteína S4 ribosómica, 2 ligada al Y RPS4Y2P Proteína S4 ribosómica, pseudogén 2 ligado al Y Proteína S4 ribosómica de 40S, Y Proteína S4 ribosómica de 40S, isoforma Y 2
Tmtc1	Proteína 1 transmembranaria y que contiene repetición TPR	1 transmembranaria y que contiene repetición de tetratricopéptido	1 transmembranaria y que contiene repetición de tetratricopéptido OLF ARG99 FLJ31400 FLJ41625 TMTC1A 1A transmembranaria y que contiene repetición de tetratricopéptido Proteína 1 transmembranaria y que contiene repetición TPR
Zfp 1	Proteína 1 que contiene dominio HIT de dedos de cinc		Proteína de dedos de cinc ZFP1 ZNF475 Proteína 475 de dedos de cinc FLJ34243 Proteína 1 de dedos de cinc Homólogo de proteína 1 de dedos de cinc (ratón) Zfp-1 Homólogo de proteína 1 de dedos de cinc
IPO8	Similar a importina-8	Importina-8	Importina 8 RANBP8 Proteína 8 de unión a RAN Proteína 8 de unión a Ran IMP8 Imp8 Importina-8 RanBP8
Caprin2	Proteína de tipo caprina-2	Miembro 2 de la familia de caprina	Miembro 2 de la familia de caprina C1QDC1 EEG1 RNG140 Caprina-2 Proteína 2 asociada a activación/proliferación citoplásmica Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos en cáncer gástrico Proteína 1 que contiene dominio C1q Proteína 140 de gránulo de ARN FLJ11391 FLJ22569 1 que contiene dominio C1q EEG-1

			KIAA1873 Proteína EEG-1
FAM60A	Proteína similar a FAM60A	Familia con similitud de secuencia 60, miembro A	Familia con similitud de secuencia 60, miembro A C12orf14 TERA Homólogo de proteína Tera Marco abierto de lectura 14 del cromosoma 12 Proteína FAM60A
Dennd5b	Similar a proteína 5B que contiene dominio Denn	5B que contiene dominio DENN/MADD	5B que contiene dominio DENN/MADD Proteína similar a Rab6IP1 MGC24039 Proteína 5B que contiene dominio DENN
METTL20	Proteína 20 de tipo metiltransferasa	4833442J19Rik	METTL20 C12orf72 DKFZp451L235 MGC50559 Marco abierto de lectura 72 del cromosoma 12 Proteína 20 de tipo metiltransferasa EC 2.1.1.
AMN1	Proteína similar a proteína putativa AMN1	Antagonista de la red de salida mitótica 1	Homólogo del antagonista de red de salida mitótica 1 (<i>S. cerevisiae</i>) Homólogo de proteína AMN1
	Proteína de tipo receptor opioideo del factor de crecimiento	Proteína de tipo receptor opioideo del factor de crecimiento	
C12orf35	Homólogo de la proteína no caracterizada C12orf35	Probable ortólogo del marco abierto de lectura 35 del cromosoma 12 de <i>H. sapiens</i> (C12orf35); 2810474O19Rik	KIAA1551, C12orf35 FLJ10652, FLJ20696 Marco abierto de lectura 35 del cromosoma 12 Proteína no caracterizada C12orf35 Proteína no caracterizada KIAA1551
Bicd 1	Proteína putativa bicaudal D	Homólogo 1 de bicaudal D	Homólogo 1 de bicaudal D (<i>Drosophila</i>) Bic-D 1 Homólogo 1 (<i>Drosophila</i>) de bicaudal D BICD Homólogo 1 de proteína bicaudal D de tipo citoesquelética Homólogo 1 de proteína bicaudal D

La **Fig. 2** muestra los niveles de expresión relativa de genes ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 en una línea celular CHO, concretamente TMTc1 (1), RPS4Y2 (2), IPO8 (3), CAPRINA2 (4), FAM60A (5), Dennd5b (6), METTL 20 (7), AMN1 (8), C12orf35 (9), Bicd1 (10).

5 La **Fig. 3A a L** muestra perfiles de FACS obtenidos después de reducir la expresión de diferentes genes diana ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 de células de hámster chino (CHO) usando ARNip. Las células que se transfectoron de forma estable con un vector de expresión y expresaban el anticuerpo codificado como producto de interés se tiñeron de forma fluorescente para detectar la cantidad de anticuerpo expresado de forma recombinante. 10 Cuanto mayor es la intensidad en el perfil de FACS, más anticuerpo se expresa en la célula teñida. El pico izquierdo mostrado en el perfil de FACS corresponde a la línea celular precursora (no transfectada y, por tanto, que no expresa el anticuerpo) que se incluyó con fines comparativos. Las otras dos curvas representan resultados obtenidos para un clon celular que se transfectó de forma estable con el vector de expresión y que expresa de forma recombinante el anticuerpo. Este clon celular se transfectó con un ARNip de control negativo (curva oscura; sin efecto sobre la 15 expresión de ningún gen) o con un ARNip que reduce la expresión del gen diana (curva gris clara). Si el silenciamiento del gen diana no tiene efecto sobre la expresión por recombinación del anticuerpo, la curva fluorescente para el ARNip de control y el ARNip diana solapan y permanecen iguales. Si el silenciamiento del gen diana aumenta la tasa de expresión del anticuerpo expresado de forma recombinante, la intensidad del correspondiente perfil de FACS aumenta y se desplaza a la derecha. **A:** gen Mettl20_1, 125 pmol, 24,9 %; **B:** gen C12orf35_1, 125 pmol, 30,6 %; **C:** gen C12orf35_2, 150 pmol, 31,7 %; **D:** gen Caprina2_6, 100 pmol, 53,3 %; **E:** FAM60A_3, 150 pmol, 48 %; **F:** lpo8_1, 125 pmol, 20,3 %; **G:** lpo8_2, 150 pmol, 57,5 %; **H:** lpo8_3, 150 pmol, 21,5 %; **I:** Dennd5b_2, 100 pmol, 36,9 %; **J:** Amn1_4, 20

125 pmol, 30,8 %; **K**: TMTC1_1, 150 pmol, 60,6 %; **L**: TMTC1_2, 150 pmol, 53,4 % (los valores porcentuales corresponden a la expresión de ARNm del gen diana entre el ARNip de referencia frente al ARNip de control). La **Fig. 3B** y **C** muestran que la regulación por disminución del gen C12orf35 aumenta significativamente la expresión del anticuerpo recombinante y, por tanto, provoca una mayor productividad que se indica por el claro desplazamiento del perfil de FACS a la derecha (véase la curva gris clara a la derecha, también marcada con una flecha).

Las **Fig. 4** y **5** muestran los niveles de expresión de ARNm de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo de dos polipéptidos modelo diferentes de interés (anticuerpo 1 y 2) en diferentes clones y combinaciones en cada caso después de reducir la expresión del gen C12orf35 en células CHO por iARN. Los niveles de ARNm de las cadenas del anticuerpo se regulan por aumento, si la expresión del gen C12orf35 se reduce por silenciamiento génico. Por tanto, la reducción de la expresión de C12orf35 sorprendentemente da lugar a mayores niveles de ARNm de HC y LC.

La **Fig. 6** muestra que, tras el silenciamiento del gen C12orf35 usando ARNip, se obtuvieron valores cuantitativos volumétricos significativamente mayores.

La **Fig. 7** también demuestra que el silenciamiento del gen C12orf35 da lugar a productividades específicas mayores (calculadas a partir de los días 3, 4, 5 y 6 de cultivo). El ARNip-1 tuvo un efecto silenciador más pronunciado que ARNip-2 y, por tanto, da lugar a mayores tasas de expresión.

La **Fig. 8** muestra que los 46 clones de máxima producción (negro) derivados de una línea celular CHO en la que la región telomérica que comprende el gen C12orf35 en el cromosoma 8 (brazo q) está eliminada (C8DEL) tienen mayores valores cuantitativos en comparación con los 45 clones de máxima producción obtenidos de la línea celular precursora que se ensayaron por IPO8 positivos (gris).

La **Fig. 9** muestra perfiles de FACS de combinaciones de células C8DEL transfectadas de forma estable después de selección usando un sistema de receptor de folato/DHFR. La concentración de MTX se aumentó de A a E (A: sin MTX; B: MTX 1 nM; C: MTX 5 nM; D: MTX 10 nM; E: MTX 50 nM). Se detectó expresión de anticuerpo recombinante basándose en la fluorescencia. En MTX 50 nM, las células predominantemente de alta producción estaban comprendidas en la combinación obtenida como se demuestra por el análisis de FACS. El perfil de la combinación obtenida se parecía notablemente al perfil del clon celular. Esto respalda el impacto extraordinario que la tecnología descrita en este documento tiene sobre el rendimiento de expresión.

La **Fig. 10** muestra los resultados de ensayos de estabilidad realizados durante 7/8 semanas con tres clones celulares diferentes (CHO de tipo silvestre y dos clones de supresión de FAM60A s16 y s23 derivados de dicho tipo silvestre) después de transfección estable con un vector de expresión que codifica un anticuerpo como producto de interés. (1) muestra los resultados de estabilidad obtenidos con las células de tipo silvestre precursoras (derivadas de CHO-K1); (2) muestra los resultados de estabilidad con el clon de supresión de FAM60A s16; (3) muestra los resultados de estabilidad con el clon de supresión de FAM60A s23. Como puede observarse, la estabilidad de la expresión se aumentó significativamente en los clones celulares que derivaban de las células de supresión de FAM60A (véase (2) y (3)). El número de clones estables se aumentó significativamente cuando se usaban las células de supresión de FAM60A para la expresión recombinante. Por tanto, alterar el efecto de FAM60A en la célula hospedadora, aquí mediante supresión génica, mejoraba significativamente la estabilidad de la expresión. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el efecto de la proteína FAM60A se altera adicionalmente en la célula eucariota, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional, para aumentar la estabilidad de la expresión tras la transfección estable.

Descripción detallada de la divulgación

La presente invención puede definirse por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se basa, entre otras cosas, en el hallazgo sorprendente de que células eucariotas, en que se altera el efecto del producto de expresión del gen C12orf35, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen endógeno C12orf35, eliminando dicho gen o introduciendo mutaciones, pueden expresar un producto recombinante de interés con rendimiento significativamente mejorado. Basándose en este hallazgo sorprendente de que el gen C12orf35 tiene un fuerte impacto sobre la expresión de un producto recombinante de interés, la presente divulgación también proporciona métodos novedosos de selección y producción y tecnologías asociadas que permiten mejorar la producción recombinante de un producto de interés. Por lo tanto, la presente divulgación realiza una contribución importante a la técnica anterior.

Los aspectos individuales y las realizaciones adecuadas y preferidas de los mismos se describirán ahora en detalle.

A. Células eucariotas modificadas

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una célula eucariota aislada, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula. Como se muestra por los ejemplos para células de mamífero, células eucariotas respectivamente modificadas muestra una productividad

significativamente mayor después de transfección estable, así como después de transfección transitoria, con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un producto de interés como se demuestra por los ejemplos. Además, la abundancia de células de alta expresión en la población de células transfectadas se mejora cuando se usan células eucariotas respectivamente alteradas. En realizaciones, también se descubrió que se mejora la estabilidad del clon. La estabilidad mejorada de la expresión permite acortar o incluso omitir los lentos estudios de estabilidad de los clones celulares de alta expresión. También se describen ventajas adicionales a continuación y también son evidentes a partir de los ejemplos. Por tanto, usar estas líneas celulares eucariotas novedosas ventajosas para la producción recombinante de un producto de interés reduce los esfuerzos de cribado para identificar células de alta expresión o clones celulares y, en particular, reduce el tiempo necesario para obtener clones celulares de alta expresión adecuados para producir el producto de interés a gran escala. Por tanto, estas líneas celulares eucariotas tienen ventajas importantes cuando se usan como células hospedadoras para tecnologías de producción recombinante.

El gen C12orf35 se expresa de forma endógena en células eucariotas tales como, por ejemplo, especies de mamíferos tales como el ser humano, ratón y hámster. El producto de expresión del gen C12orf35 es una proteína bastante grande. La lista de secuencias muestra secuencias de aminoácidos ejemplares o secuencias de aminoácidos putativas de la proteína codificada por el gen C12orf35 endógeno de diferentes especies de mamífero tales como hámster (SEQ ID NO: 1 y 2), ser humano (SEQ ID NO: 3 y 4), ratón (SEQ ID NO: 5), ganado bovino (SEQ ID NO: 6) y jabalí (SEQ ID NO: 7). La CDS (secuencia de ADN codificante) de C12orf35 de hámster chino se muestra como la SEQ ID NO: 8. Además, una sección de la UTR 5' (véase la SEQ ID NO: 9) y de la UTR 3' (véase la SEQ ID NO: 10) del ARNm de C12orf35 del hámster chino se secuenció. El gen C12orf35 también se denomina similar a C12orf35 u homólogo a C12orf35 en hámster o 2810474O19Rik en ratón. La información acerca del gen, la secuencia codificante y la proteína C12orf35 predicha también se divulga para *Cricetulus griseus* en NCBI: XM_003512865, incorporada en este documento por referencia. En seres humanos, también se denomina KIAA1551. Pueden asignarse diferentes nombres en diferentes especies para la proteína o el gen y también se enumeran nombres alternativos no limitantes (sobrenombres) anteriormente en la tabla 1. El término "C12orf35", como se usa en este documento, también engloba cualquier homólogo y ortólogo de C12orf35 que tenga la misma función que C12orf35. Por consiguiente, la expresión "gen C12orf35", como se usa en este documento, en particular engloba cualquier gen endógeno que codifique una proteína que comparta al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología o identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO 8. La proteína codificada por dicho gen preferiblemente tiene la misma función que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una o más de las SEQ ID NO: 2 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8. Dicho gen puede modificarse como se describe en este documento para alterar la función del producto de expresión que se expresa por la célula no modificada. La proteína expresada por el gen C12orf35 no se ha descrito en detalle en la bibliografía. Las expresiones "proteína C12orf35" o "producto de expresión del gen C12orf35 endógeno" y expresiones similares, como se usan en este documento, engloban homólogos y ortólogos de C12orf35 y, en particular, engloban cualquier proteína que comparta al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología o identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO 8. Dicha proteína C12orf35 preferiblemente tiene la misma función que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o como se muestra en una o más de las SEQ ID NO: 2 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8. La homología, respectivamente la identidad se puede calcular sobre la longitud completa de la proteína de referencia.

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a células eucariotas modificadas, tales como preferiblemente células de mamífero, en las que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35, que habitualmente se expresa de forma endógena por una célula eucariota correspondiente no modificada, está alterado en dicha célula. Como se demuestra por los ejemplos, esta modificación de la célula que puede ser transitoria o permanente permite aumentar la expresión de un producto de interés recombinante.

Hay varias posibilidades para modificar una célula eucariota para alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula. El efecto del producto de expresión del gen C12orf35 y, por tanto, la proteína C12orf35 puede alterarse, por ejemplo, a nivel génico o a nivel proteínico. El efecto de C12orf35 puede alterarse, por ejemplo, por modificación de la estructura/secuencia de la proteína C12orf35, la transcripción y/o la traducción. En lo sucesivo se describen opciones no limitantes.

De acuerdo con una realización, el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 se altera en la célula eucariota porque la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina en dicha célula. Como se muestra por los ejemplos, alterar la expresión del gen C12orf35, por ejemplo, por silenciamiento génico o por eliminación de dicho gen, es una medida muy eficaz para proporcionar células eucariotas que puedan expresar un producto recombinante de interés con alto rendimiento. Cuando el nivel de expresión del gen C12orf35 se reduce o elimina en una célula eucariota y, por tanto, se produce menos o nada de proteína C12orf35 funcional por la célula respectivamente alterada, el rendimiento de expresión de un producto recombinante de interés se aumenta significativamente. Esta correlación

entre la expresión de C12orf35 funcional y el rendimiento de la expresión de proteína recombinante es un hallazgo inesperado.

La reducción o eliminación de la expresión funcional del gen C12orf35 puede conseguirse por diversos medios. La expresión funcional puede reducirse, por ejemplo, reduciendo el nivel de expresión del gen C12orf35 o dañando la función de C12orf35 o por una combinación de dichas metodologías. De acuerdo con una realización, la célula se altera de modo que la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina por supresión génica, mutación génica, eliminación génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores. De acuerdo con una realización, la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina en la célula por supresión génica. Una supresión génica es una técnica genética mediante la que se hace que un gen sea afuncional dañando su función. Por ejemplo, se puede insertar un ácido nucleico en la secuencia codificante, dañando de ese modo la función del gen. Además, el gen C12orf35 completo o una parte del mismo puede eliminarse, por lo que no se expresa proteína o se expresa proteína que no es funcional por la célula respectivamente alterada. Otra opción consiste en introducir una o más mutaciones de supresión en la secuencia codificante, lo que conduce a un producto de expresión no funcional o menos funcional. Por ejemplo, se pueden introducir una o más mutaciones de desplazamiento del marco que den como resultado una proteína no funcional o menos funcional. Como alternativa o de forma adicional, se pueden introducir uno o más codones de parada en la secuencia codificante, de modo que se obtenga una proteína truncada, no funcional o menos funcional. Por tanto, de acuerdo con una realización, el gen C12orf35 comprende una o más mutaciones que proporcionan un producto de expresión no funcional o menos funcional. Otras opciones incluyen, pero sin limitación, una o más mutaciones en el promotor, en la UTR 5' y/o 3' u otros elementos reguladores. De acuerdo con una realización, la función promotora del gen C12orf35 se daña, por ejemplo, introduciendo una eliminación del promotor o introduciendo una construcción entre el promotor y el inicio de la transcripción. Los métodos para conseguir una supresión génica para suprimir o eliminar la expresión del gen diana también son bien conocidos por los expertos en la materia y, por tanto, no tienen que describirse detalladamente en este documento. A pesar de ello, a continuación se describen algunos ejemplos no limitantes.

De acuerdo con una realización, el gen C12orf35 se suprime funcionalmente por modificación genética. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, edición genómica, tal como edición genómica con nucleasas modificadas genéticamente (GEEN). Esta es un tipo de modificación genética en la que se inserta, reemplaza o elimina ADN de un genoma usando nucleasas modificadas genéticamente de forma artificial o "tijeras moleculares". Las nucleasas crean roturas bicatenarias específicas (DSB) en ubicaciones deseadas del genoma y se aprovechan de los mecanismos endógenos de la célula para reparar la rotura inducida mediante procesos naturales de recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Hay al menos cuatro familias de nucleasas modificadas genéticamente que pueden usarse: Nucleasas de dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), CRISPR y endonucleasas de asentamiento remodeladas genéticamente a partir de meganucleasa modificada genéticamente.

De acuerdo con una realización, se alteran una o más copias del gen C12orf35 presentes en el genoma de la célula eucariota, por ejemplo, se suprimen o eliminan, para reducir o eliminar y, por tanto, alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en la célula eucariota. Por tanto, de acuerdo con una realización, se elimina o inactiva funcionalmente al menos una copia del gen C12orf35 en el genoma de la célula eucariota. Por ejemplo, puede insertarse una o más mutaciones en la copia o copias del gen C12orf35 (si hay más de una copia presente) para proporcionar un producto de expresión no funcional o menos funcional o para eliminar o reducir la expresión en conjunto y, por tanto, alterar el efecto de C12orf35 en la célula de mamífero. De ese modo, el gen C12orf35 se inactiva básicamente en el genoma. De acuerdo con una realización, en caso de que haya más de una copia presente, todas las copias del gen C12orf35 se alteran respectivamente en la célula eucariota, que preferiblemente es una célula de mamífero.

De acuerdo con una realización, la célula eucariota es una célula metazoica, una célula de vertebrado o preferiblemente, una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, una parte del cromosoma se elimina en dicha célula, en la que la parte eliminada comprende el gen C12orf35. De acuerdo con una realización, una parte cromosómica que comprende el gen C12orf35 se elimina en todos los cromosomas que comprenden una copia del gen C12orf35. De ese modo, todas las copias del gen C12orf35 se eliminan del genoma.

De acuerdo con una realización, una parte de la región telomérica de un cromosoma se elimina, en el que la parte eliminada comprende el gen C12orf35. De acuerdo con una realización preferida, la célula alterada es una célula de roedor. De acuerdo con una realización, la célula es una célula de hámster tal como, por ejemplo, una célula CHO y al menos una parte de la región telomérica del cromosoma 8 está eliminada en el genoma, en la que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35. El significado del término "C12orf35" se explica anteriormente y también se indican nombres alternativos no limitantes de homólogos y ortólogos que también están englobados por el alcance de dicho término en la tabla 1. De acuerdo con una realización, dicha eliminación se produce en el brazo q del cromosoma 8 de una célula de hámster, en particular una célula de hámster chino, que comprende el gen FAM60A. Como se muestra por los ejemplos, una célula CHO que comprende una eliminación respectiva en la región telomérica del cromosoma 8 es particularmente adecuada como célula hospedadora para expresión recombinante. Después de la transfección estable o transitoria con un vector de expresión, estas células muestran una productividad significativa

mayor en comparación con células en las que dicha parte de la región telomérica del cromosoma 8 no se ha perdido. Además, la abundancia y, por tanto, la cantidad, respectivamente la proporción de células de alta expresión en la población de células transfectadas se aumenta significativamente. En el caso de transfección estable, la estabilidad de la expresión recombinante se aumenta significativamente, por ejemplo, en dichas células de hámster que han perdido dicha parte de la región telomérica del cromosoma 8. Se describen ventajas adicionales ventajosas en detalle en los ejemplos en los que se caracterizan adicionalmente células CHO en que una parte respectiva de la región telomérica del cromosoma 8 está eliminada debido a rotura del cromosoma. Las propiedades ventajosas hacen que estas células de hámster sean particularmente adecuadas como líneas celulares de producción industrial. Como alternativa, la célula de roedor alterada puede ser una célula de ratón en la que al menos una parte de la región telomérica del cromosoma 6 está eliminada en el genoma, en la que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35. La región telomérica del cromosoma 6 de ratón es muy similar a la región telomérica del cromosoma 8 de hámster.

De acuerdo con una realización, al menos una parte de la región telomérica se elimina o no está presente en ambos cromosomas del par de cromosomas 8 de hámster (o el par de cromosomas 6 en el caso de células de ratón), en la que las partes eliminadas comprenden el gen C12orf35.

De acuerdo con una realización, al menos una parte de la región telomérica se elimina en un cromosoma del par de cromosomas 8 de hámster (o el par de cromosomas 6 en el caso de ratón), en la que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35 y la expresión del gen C12orf35 en el otro cromosoma está reducida o eliminada. Las maneras adecuadas para reducir o eliminar la expresión de un gen son conocidas por los expertos en la materia y también se describen en este documento ejemplos no limitantes. De acuerdo con una realización, dicha eliminación se produce en el brazo q del cromosoma 8 de hámster, en particular hámster chino.

De acuerdo con una realización, la región cromosómica eliminada comprende el gen C12orf35 y adicionalmente uno o más o todos los genes seleccionados del grupo que consiste en Bcd1, Amn1, proteína 20 de tipo metiltransferasa, Dennd5b, FAM60A, Caprina2 e Ipo8. De acuerdo con una realización, todos los genes mencionados anteriormente están eliminados. De acuerdo con una realización, la región cromosómica eliminada comprende adicionalmente al menos una parte de o la totalidad del gen Tmtc1. En células de hámster, tales como células CHO, estos genes también están ubicados en la región telomérica del cromosoma 8. De acuerdo con una realización, la región cromosómica eliminada adicionalmente comprende el gen RPS4Y2 si está presente. Se proporciona un resumen general sobre la región telomérica del cromosoma 8 del genoma de hámster chino en el que se muestra la ubicación de los genes mencionados anteriormente como figura 1. Como se muestra por los ejemplos, las células CHO que comprenden una eliminación respectiva en la región telomérica del cromosoma 8 (brazo q) tienen propiedades ventajosas particulares con respecto al rendimiento de expresión y la estabilidad de la expresión. En células de ratón, los genes mencionados anteriormente están ubicados en la región telomérica del cromosoma 6. También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente y/o proteínas codificadas incluyendo homólogos y ortólogos en la tabla 1 anterior y los genes respectivos están englobados por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales.

De acuerdo con una realización, la eliminación del gen C12orf35 se debe a una rotura del cromosoma. Una rotura del cromosoma puede inducirse, por ejemplo, tratando las células eucariotas con un agente tóxico que promueve la rotura del cromosoma, tal como, por ejemplo, MTX, afidicolina o higromicina. Otras opciones para inducir roturas del cromosoma incluyen, pero sin limitación, radiación, irradiación, mutágenos, sustancias carcinógenas y bleomicina. Las roturas del cromosoma también pueden producirse espontáneamente durante la transfección, por ejemplo, electroporación. Los métodos para inducir rotura del cromosoma también son conocidos por los expertos en la materia y, por tanto, no tienen que describirse detalladamente aquí. Después de inducir la rotura del cromosoma, las células eucariotas que tienen el punto de rotura deseado (que provoca una eliminación del gen C12orf35) pueden identificarse, por ejemplo, analizando el ADN o usando el método de acuerdo con el quinto aspecto de la presente divulgación. Por ejemplo, el perfil de expresión de las células tratadas puede analizarse para determinar si el gen C12orf35 o los genes ubicados centroméricos del gen C12orf35 se expresan, si la expresión se reduce o si los genes no se expresan. Por ejemplo, en el caso de células de ratón o hámster, puede analizarse si el gen C12orf35 se expresa y, como alternativa o además de ello, puede analizarse si uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en proteína 20 de tipo metiltransferasa, Dennd5b, FAM60A, Caprina2, Ipo8, Tmtc1 o genes que están ubicados teloméricos de los genes mencionados anteriormente (en los que teloméricos a este respecto significa en la dirección del extremo telomérico) se expresan por la célula y/o si la expresión se reduce o elimina. Si el punto de rotura inducido está ubicado centromérico del uno o más genes respectivos (en los que centromérico a este respecto significa lejos en el cromosoma y, por tanto, muy lejos del extremo telomérico), el extremo telomérico que comprende dichos genes se elimina, lo que elimina o reduce (si existen otras copias del gen en otra parte que se expresan) su expresión. Como es evidente a partir de la figura 1, el gen C12orf35 está ubicado telomérico de los genes mencionados anteriormente, es decir, está ubicado lejos en la dirección del extremo telomérico. Por tanto, si los genes mencionados anteriormente se eliminan por una rotura cromosómica, la región eliminada también incluye el gen C12orf35. Por tanto, los genes anteriores pueden usarse de forma válida como marcadores para básicamente determinar indirectamente si la rotura del cromosoma inducida provocaba una eliminación de una parte del cromosoma que incluye el gen C12orf35. Además, se descubrió que aunque está ubicado telomérico del gen C12orf35, también el gen Bcd1 puede usarse como marcador para determinar si se indujo una rotura del cromosoma que provocaba una eliminación del gen

C12orf35. Se descubrió en células CHO que si el gen Bcd1 se elimina a causa de una rotura del cromosoma, la eliminación habitualmente también incluye el gen C12orf35. Se confirmó, analizando las características de expresión de varios cientos de clones, que los genes mencionados anteriormente pueden usarse de forma válida como marcadores para discriminar clones celulares con características de expresión alta y estable de los clones celulares que tienen características de expresión baja e inestable. La expresión relativa de los genes mencionados anteriormente en células CHO se muestra en la figura 2. Como puede observarse de la figura 2, los genes Ipo8 (3), FAM60A (5) y C12orf35 (9) se expresan de forma relativamente alta en comparación con otros genes que están ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 en células CHO normales tales como células CHO-K1, que no comprenden una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8. Por tanto, es ventajoso incluir uno o más de los genes mencionados anteriormente en el análisis, ya que esto simplifica la detección de que su expresión está eliminada o reducida. También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente y proteínas codificadas incluyendo homólogos y ortólogos en la tabla 1 anterior y los genes respectivos están englobados por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales.

De acuerdo con una realización, el punto de rotura en el cromosoma 8 está ubicado centromérico del gen de la proteína 20 de tipo metiltransferasa, centromérico del gen Dennd5b, centromérico del gen FAM60A, centromérico del gen Caprina2, centromérico del gen Ipo8 o centromérico del gen RPS4Y2. Se descubrió que el punto de rotura en el cromosoma 8 del genoma de hámster a menudo está ubicado centromérico del gen Ipo8. De acuerdo con una realización, el punto de rotura en el cromosoma 8 está ubicado dentro del gen Tmtc1 y dicho gen no se expresa o su expresión es baja. De acuerdo con una realización, el gen Ergic2, que está ubicado centromérico del gen Tmtc1, no está eliminado en el cromosoma 8. Por tanto, de acuerdo con esta realización, el punto de rotura es telomérico del gen Ergic 2 (en el que telomérico a este respecto significa en dirección 3' en la dirección del extremo telomérico) y el gen Ergic 2 está presente.

De acuerdo con una realización, la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina en la célula eucariota que, preferiblemente, es una célula de mamífero. La expresión funcional del gen C12orf35 puede verse influida por diversos medios, por ejemplo, alterando el promotor y/o un potenciador del gen C12orf35 de modo que se produzca menos transcrito o nada de transcrito, o por tecnologías de silenciamiento génico tales como silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional. De acuerdo con una realización, la célula eucariota aislada comprende una o más mutaciones en la región promotora del gen C12orf35. Por ejemplo, la región promotora se puede alterar para proporcionar un promotor no funcional o menos funcional; también se puede eliminar completamente el promotor. Como alternativa o adicionalmente, es posible añadir una secuencia polinucleotídica que codifique un polipéptido que incluya un codón de parada entre el promotor y el codón de inicio del gen C12orf35 que da lugar a la expresión del otro polipéptido en lugar de C12orf35. Los métodos respectivos son bien conocidos por los expertos en la materia y, por tanto, no tienen que describirse detalladamente aquí.

La reducción de la expresión del gen funcional puede conseguir un nivel en el que incluso se elimina la expresión. El silenciamiento génico postranscripcional puede conseguirse, por ejemplo, mediante moléculas de antisentido o moléculas que median la interferencia de ARN. En lo sucesivo se describirán brevemente ejemplos no limitantes.

Pueden diseñarse polinucleótidos de antisentido que se unan específicamente a ARN, provocando la formación de híbridos de ARN-ADN o ARN-ARN, con una detención de la transcripción inversa o la traducción del ARN mensajero. Se han desarrollado muchas formas de antisentido y se pueden clasificar ampliamente en antisentido dependiente de enzima o antisentido de bloqueo estérico. El antisentido dependiente de enzima incluye formas dependientes de la actividad de RNasa H para degradar ARNm diana, que incluyen antisentido de ADN monocatenario, ARN y fosforotioato. Los polinucleótidos de antisentido se generan habitualmente por la célula mediante la expresión a partir de construcciones de antisentido que contienen la hebra de antisentido como hebra transcrita. Los ARN catalíticos de escisión en trans (ribozimas) son moléculas de ARN que poseen actividad de endorribonucleasa. Las ribozimas se pueden diseñar específicamente para una diana particular y se pueden modificar genéticamente para que escindan cualquier especie de ARN de forma específica según el sitio en el entorno del ARN celular. El evento de escisión hace que el ARNm sea inestable y evita la expresión de la proteína. El genoma de la célula eucariota puede alterarse de modo que una molécula de antisentido respectiva, por ejemplo, se exprese permanentemente.

Otra opción adecuada para reducir la expresión funcional del gen C12orf35 a un nivel postranscripcional se basa en interferencia de ARN (iARN). Como se muestra por los ejemplos, reducir la expresión del gen C12orf35 por iARN es eficaz para aumentar la productividad de la célula hospedadora. Se produce significativamente más producto recombinante tras el silenciamiento del gen C12orf35 por iARN. Además, como se demuestra por los ejemplos, los niveles de expresión de ARNm del producto de interés se aumentan tras el silenciamiento del gen C12orf35. Los métodos para silenciar genes por iARN son bien conocidos por los expertos en la materia y, por tanto, no tienen que describirse detalladamente aquí. Ejemplos de compuestos inductores de iARN que pueden usarse para silenciar la expresión del gen C12orf35 incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos interferentes cortos (ANic), ARN interferente pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN en horquilla pequeño (ARNhp), así como precursores de los mismos que se procesan en la célula en el compuesto inductor de iARN real. De acuerdo con una realización, se utiliza un ARNip para el silenciamiento. El ARNip se puede proporcionar como una molécula bicatenaria con protuberancias 3' en cada hebra. También se pueden usar moléculas con extremos romos. Dicho ARNip puede comprender desoxi- así como

ribonucleótidos y, además, puede comprender nucleótidos modificados. Varias realizaciones y variaciones de compuestos de ARNip son conocidos en la técnica anterior y pueden usarse para reducir la expresión del gen C12orf35. Los ARNip adecuados dirigidos a secuencias diana identificadas/seleccionadas de los genes diana a nivel de ARN se pueden identificar usando métodos informáticos adecuados, aplicando determinados algoritmos de diseño.

5 Para obtener un ARNip contra el transcrito diana, la molécula bicatenaria se puede transfectar directamente en la célula. Como se muestra por los ejemplos, dichos métodos transitorios para reducir la expresión del gen C12orf35 son eficaces para aumentar la expresión recombinante de un producto de interés. Como alternativa, el ARNip puede proceder del procesamiento con dicer, una enzima que convierte ARNbc largos o ARN en horquilla pequeños (ARNhp) en ARNip. Estos precursores o las moléculas de ARNip finales pueden producirse de forma exógena (artificialmente) y después pueden introducirse en las células eucariotas mediante diversos métodos de transfección. De acuerdo con una realización adicional, el compuesto inductor de iARN se expresa por un vector que se transfecta en la célula eucariota. Para ARNip, esto puede hacerse, por ejemplo, mediante la introducción de un bucle entre las dos hebras, produciendo de este modo un único transcrito, que después puede procesarse en un ARNip funcional en la célula eucariota. Dichos casetes de transcripción típicamente usan un promotor de ARN polimerasa 3 (por ejemplo, U6 o H1) que habitualmente dirige la transcripción de ARN nucleares pequeños (ARNhp). Se asume que el transcrito de ARNhp resultante del vector se procesa a continuación por dicer, produciendo de este modo las moléculas de ARNip bicatenarias, que tienen preferiblemente la característica de protuberancias 3'. De acuerdo con una realización, dicho vector que proporciona ARNhp se integra de forma estable en el genoma de la célula eucariota. Esta realización es ventajosa, ya que la regulación por disminución del gen C12orf35 se debe al ARNip producido de forma constante bastante estable y no transitorio. Las células que comprenden un vector que proporciona ARNhp respectivo entonces pueden transfectarse con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el producto de interés. Como alternativa, pueden usarse estrategias de cotransfección, en las que el vector que genera el ARNhp se contrafecta con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés.

25 El silenciamiento génico transcripcional puede incluir, por ejemplo, modificaciones epigenéticas. De acuerdo con una realización, la expresión del gen C12orf35 se reduce por silenciamiento epigenético. Se identificaron células de mamífero en las que la expresión del gen C12orf35 se reduce significativamente por silenciamiento epigenético, supuestamente metilación del ADN, y la productividad recombinante de dichas células es extraordinariamente alta. Además, la secuencia del gen puede cambiarse para reducir la semivida del ARNm. Esto también consigue una reducción en el efecto de la proteína C12orf35 en la célula respectivamente alterada.

De acuerdo con una realización, la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina abordando un elemento regulador implicado en la regulación de la expresión del gen C12orf35. Por ejemplo, puede abordarse un factor de transcripción, promotor (véase también anteriormente), potenciador, UTR u otros elementos reguladores, por ejemplo, por supresión, eliminación, regulación por disminución o cualquier otra alteración que inactive o reduzca la actividad de dicho elemento regulador, impidiendo o reduciendo de ese modo la expresión funcional del gen C12orf35 y alterando de ese modo el efecto del producto de expresión endógeno.

40 De acuerdo con una realización, el genoma de la célula eucariota se altera para dañar el efecto de C12orf35 mediante expresión heteróloga de un C12orf35 mutante que es no funcional o menos funcional que la proteína C12orf35 expresada de forma endógena. En esta realización, la célula eucariota aislada comprende además del polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido de interés un polinucleótido heterólogo adicional que codifica el C12orf35 mutante. Mediante la sobreexpresión de una forma mutante respectiva no funcional o menos funcional de C12orf35, puede crearse un fenotipo negativo dominante. Una opción adicional para alterar y, por tanto, reducir el efecto de C12orf35 en la célula es la expresión heteróloga de una proteína, tal como un anticuerpo que neutralice C12orf35 y, por tanto, altere el efecto de C12orf35 en la célula. De acuerdo con una realización, el efecto de C12orf35 se altera en la célula reduciendo o eliminando la expresión funcional de moléculas que interactúan funcionalmente con C12orf35.

50 De acuerdo con otra realización, se usa un compuesto de bajo peso molecular que inhibe la expresión del gen C12orf35 inhibiendo específicamente la unión de un factor de transcripción a una región reguladora en el promotor, o inhibiendo un activador de la transcripción necesario para la transcripción del gen diana.

De acuerdo con una realización, la expresión del gen C12orf35 se reduce en al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 75 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces o al menos 125 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 750 veces, al menos 1000 veces, al menos 1250 veces, al menos 1500 veces, al menos 1750 veces o al menos 2000 veces. Esto puede determinarse, por ejemplo, usando RT-PCR en tiempo real u otros métodos de detección de ARN sensibles. Dicha reducción puede conseguirse, por ejemplo, en comparación con la célula de referencia sin modificar en la que no está reducida la expresión del gen C12orf35. De acuerdo con una realización, la expresión del gen C12orf35 es de un 0,05 % o menos, un 0,0475 % o menos, un 0,045 % o menos, un 0,0425 % o menos, un 0,04 % o menos, un 0,0375 % o menos, un 0,035 % o menos, un 0,0325 % o menos, un 0,03 % o menos, un 0,0275 % o menos, un 0,025 % o menos, un 0,0225 % o menos, un 0,02 % o menos, un 0,0175 % o menos, un 0,015 % o menos en comparación con la expresión del ARN 18S (establecida al 100 %) en la misma célula. De acuerdo con una realización, la expresión del gen C12orf35 es incluso

menor tal como de un 0,001 % o menos, un 0,0001 % o menos o incluso un 0,00001 % o menos en comparación con la expresión del ARN 18S (establecida al 100 %) en la misma célula. La expresión funcional del gen C12orf35 se reduce de manera que provoca un aumento en la expresión de un producto recombinante de interés si dicha célula eucariota modificada se transfecta con un vector de expresión que codifica el producto de interés en comparación con una célula correspondiente en la que la expresión funcional del gen C12orf35 no está reducida o eliminada. De acuerdo con una realización, la expresión del producto recombinante de interés es al menos 1,5 veces mayor, al menos 1,75 veces mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 2,5 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor o al menos 5 veces mayor que la expresión de una célula correspondiente en la que la expresión funcional del gen C12orf35 no está reducida o eliminada. De acuerdo con realizaciones, se obtienen tasas de expresión que son al menos 8 veces mayores, al menos 10 veces mayores o al menos 15 veces mayores que la expresión de una célula correspondiente en la que la expresión del gen C12orf35 no está reducida o eliminada. Por ejemplo, se determinaron tasas de expresión después de selección con G418 que eran hasta 35 veces mayores que las tasas de una célula correspondiente en la que la expresión del gen C12orf35 no está reducida o eliminada. La tasa de expresión del producto recombinante puede ensayarse usando, por ejemplo, los ensayos descritos en los ejemplos.

De acuerdo con una realización adicional, el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 se reduce o elimina usando un compuesto que contrarresta o inhibe el efecto del producto de expresión del gen C12orf35. Los compuestos inhibidores respectivos pueden ser de cualquier naturaleza e incluyen, pero sin limitación, compuestos químicos tales como, en particular, moléculas pequeñas, proteínas y péptidos. Otra posibilidad es usar compuestos tales como compuestos de bajo peso molecular que estimulan la degradación del producto proteínico, por ejemplo, estimulando la ubiquitinación de la proteína.

De acuerdo con una realización, adicionalmente el efecto del producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Bcd1, Amn1, proteína 20 de tipo metiltransferasa, Dennd5b, FAM60A, Caprina2, Ipo8, RPS4Y2 y Tmtc1 o uno o más genes ubicados teloméricos de los genes mencionados anteriormente se altera. También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente y/o las proteínas codificadas, incluyendo homólogos y ortólogos, en la tabla 1 anterior y los genes respectivos, que codifican las proteínas respectivas, están englobados por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales. La alteración del efecto puede conseguirse, asimismo, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional de los genes respectivos. Se describen tecnologías y realizaciones adecuadas anteriormente en relación al gen C12orf35 y se aplican asimismo a cualquier otro gen diana. Como se describe anteriormente, dichos genes están ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 de hámster chino y el cromosoma 6 de ratón. Si se elimina una parte de dicha región telomérica, por ejemplo, induciendo una rotura del cromosoma como se describe anteriormente, la región eliminada habitualmente comprende uno o más de los genes mencionados anteriormente.

De acuerdo con una realización preferida, en dicha célula en la que está alterado el efecto de C12orf35, adicionalmente se altera el efecto de la proteína FAM60A, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A. Un hallazgo inesperado adicional fue que la alteración del efecto de FAM60A en una célula eucariota, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A, provoca, tras la transfección estable con un polinucleótido que codifica un producto de interés, un aumento significativo en la abundancia de clones celulares obtenidos que expresan el producto recombinante con características de estabilidad mejoradas. Por tanto, con el gen FAM60A, se identificó un gen clave que influye en la estabilidad de la expresión recombinante. Además, alterar el efecto de FAM60A en las células permite mejorar significativamente la producción recombinante de un producto de interés aumentando la estabilidad de la expresión. Como se muestra en los ejemplos, alterar el efecto de FAM60A, por ejemplo, por supresión génica, mejora significativamente las características de estabilidad. Las pérdidas pronunciadas en la estabilidad de la expresión durante el cultivo prolongado son más infrecuentes con células hospedadoras respectivas y, además, si sucede, provoca una disminución menos drástica en la productividad en comparación con células en las que el genoma no se altera para dañar el efecto de la proteína FAM60A en la célula. La abundancia de clones estables se aumenta tras transfección estable. Por lo tanto, los análisis de estabilidad para identificar células hospedadoras que no sean propensas o sean menos propensas a inestabilidad durante cultivo prolongado pueden acortarse e incluso omitirse. Esta es una ventaja importante ya que acorta el tiempo que se requiere para obtener clones celulares de expresión estable que expresen el producto recombinante de interés con buen rendimiento durante un periodo de tiempo prolongado y que, por consiguiente, son adecuados con fines de producción a gran escala. Esto reduce significativamente el esfuerzo de cribado. Por lo tanto, la alteración del efecto de FAM60A y C12orf35 en la misma célula es particularmente ventajosa, porque se proporcionan células hospedadoras eucariotas que muestran características mejoradas con respecto a la estabilidad y el rendimiento de expresión. De este modo, se proporcionan células hospedadoras eucariotas que tienen propiedades particularmente ventajosas para la producción de un producto recombinante de interés. Como se describe en este documento, la célula eucariota preferiblemente es una célula de mamífero.

FAM60A es una subunidad del complejo de SIN3-histona desacetilasa (HDAC) (complejo de SIN3/HDAC) que funciona en la represión transcripcional (Munoz *et al.*, 2012, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, n.º 39, pág. 32346-32353; Smith *et al.*, 2012, Mol Cell Proteomics 11 (12): 1815-1828). Las histona desacetilasas (HDAC) catalizan la eliminación de grupos acetilo de las histonas. La acetilación de las histonas en lisinas es un mecanismo principal para modular la conformación de la cromatina. La acetilación de histonas promueve un estado

de la cromatina relajado, transcripcionalmente activo mientras que la desacetilación catalizada por las histona desacetilasas (HDAC) favorece un estado inactivo, silencioso. El análisis de bases de datos reveló la presencia de al menos un ortólogo de FAM60A en la mayoría de metazoos, pero no en nematodos. El gen FAM60A está conservado en metazoos y puede encontrarse en todos los genomas de vertebrados y la mayoría de invertebrados que se han secuenciado completamente. Por ejemplo, puede encontrarse una identidad de secuencia del 100 % de la proteína FAM60A entre ser humano, rata, ratón y vaca. La investigación de la similitud de secuencia de homólogos de FAM60A indica que, predominantemente, hay únicamente un solo miembro representativo de esta familia en el genoma. Hay únicamente pocas excepciones. De acuerdo con Smith *et al.*, 2012, la proteína FAM60A tiene una secuencia única que carece de cualquier dominio proteínico conocido. Además, se describió por Smith *et al.* 2012, que no muestra ninguna homología de secuencia con otras proteínas conocidas en el proteoma humano. La comparación de secuencias entre proteínas FAM60A de diferentes especies mostró que la proteína FAM60A generalmente comprende tres regiones: (1) un extremo N que comprende segmentos muy conservados en todos los metazoos, (2) una región central que está muy conservada entre los vertebrados, mientras que en invertebrados consiste en un espaciador no conservado de una longitud variable, (3) un extremo C que comprende segmentos muy conservados en todos los metazoos. Por tanto, la máxima conservación se observó en las regiones de extremo N y C de FAM60A. Como se describe anteriormente, la investigación indica que FAM60A se asocia con complejos de SIN3/HDAC en diversos tipos de células eucariotas tales como, en particular, células de mamífero. Sin embargo, hasta la fecha, la información funcional acerca de FAM60A está bastante restringida. Los recientes estudios funcionales (véase Smith *et al.*, 2012) indican que FAM60A puede reprimir la expresión génica y regula un subconjunto específico de genes. Smith *et al.* 2012 informan de una función de FAM60A en la regulación de la ruta de señalización de TGF-beta, que desempeña una función central en procesos como la progresión del cáncer, la metástasis, la migración celular y la vigilancia inmunitaria. Hay hallazgos que indican que FAM60A actúa como represor transcripcional de componentes de la ruta de señalización de TGF-beta, mientras que esta función de FAM60A parece permitirse mediante su función en el complejo de SIN3-HDAC. La reducción de FAM60A en diferentes líneas celulares cancerosas usando ARNip contra FAM60A provocó un cambio en la morfología normal de las células cancerosas. Además, se descubrió que los niveles de la proteína FAM60A cambian periódicamente en el transcurso del ciclo celular en células U2OS (Munoz *et al.*, 2012). Los experimentos de supresión de FAM60A usando ARNip de FAM60A en células de osteosarcoma óseo humano U2OS revelaron que FAM60A restringe la expresión génica de ciclina D1. Frente a estos antecedentes científicos, fue muy sorprendente descubrir que la alteración del efecto de la proteína FAM60A en una célula eucariota tal como, preferiblemente, una célula de mamífero, aumenta significativamente la estabilidad de la expresión génica heteróloga en dicha célula sin afectar negativamente a otras características de la célula que son importantes para la expresión recombinante. Esta correlación entre los efectos de la proteína FAM60A y la estabilidad de la expresión durante cultivo prolongado de las células fue inesperada.

Como se describe, el gen FAM60A se expresa de forma endógena en metazoos y, por tanto, en especies de mamífero tales como ser humano, ratón, rata y hámster y la secuencia de aminoácidos de FAM60A está muy conservada en especies de mamífero, así como en vertebrados. La célula eucariota alterada en la que el efecto de FAM60A está alterado, se obtiene de una célula eucariota que expresa de forma endógena FAM60A. Por motivos de simplicidad, la proteína FAM60A, así como el gen FAM60A que codifica la proteína FAM60A se escribe en este documento en letras mayúsculas aunque, en algunas especies, se usa una escritura diferente para el gen y/o la proteína. La lista de secuencias muestra secuencias de aminoácidos ejemplares de proteínas FAM60A conocidas y/o predichas de diferentes especies de vertebrados, concretamente *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 11), *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO: 12), *Mus musculus* (SEQ ID NO: 13), *Cricetulus griseus* (SEQ ID NO: 14), *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 15), *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 16), *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 17) y *Bos taurus* (SEQ ID NO: 18). El ADNc de FAM60A predicho de *Cricetulus griseus* se muestra en la SEQ ID NO: 19 (secuencia codificante de 14-679; véase también la secuencia de referencia de NCBI: XM_003505482.1). Pueden asignarse diferentes nombres para la proteína FAM60A o el gen FAM60A en diferentes especies y también se enumeran nombres alternativos no limitantes (sobrenombres) anteriormente en la tabla 1. El término "FAM60A", como se usa en este documento, también engloba cualquier homólogo u ortólogo de FAM60A que tenga la misma función que FAM60A. De acuerdo con una realización el término "FAM60A", como se usa en este documento, se refiere en particular a una proteína que comparte al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 11 a 18. De acuerdo con una realización, los valores porcentuales anteriores se refieren a la identidad polipeptídica en lugar de la homología. La homología, respectivamente la identidad se puede calcular sobre la longitud completa de la proteína de referencia. Una proteína respectiva preferiblemente tiene la misma función que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una o más de las SEQ ID NO: 12 a 18, preferiblemente la SEQ ID NO: 14. La proteína FAM60A no se ha descrito en detalle en la bibliografía. Por tanto, fue muy sorprendente que la estabilidad de la expresión de una célula hospedadora recombinante pueda mejorarse, si el genoma de la célula hospedadora se altera de modo que se dañe el efecto de la proteína endógena FAM60A en la célula, como puede conseguirse, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A en dicha célula. Fue inesperado que FAM60A influyera en la estabilidad de la expresión de un producto recombinante de interés. De acuerdo con una realización, el gen FAM60A que codifica la proteína FAM60A se altera para dañar el efecto de FAM60A en la célula. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por tecnologías de modificación genética tales como tecnologías de supresión génica como se describe, por ejemplo, en este documento. La secuencia genómica del gen de diferentes especies de mamífero es

conocida y se describe, por ejemplo, en *Homo sapiens* (ID del gen según NCBI: 58516); *Rattus norvegicus* (ID del gen según NCBI: 686611); *Mus musculus* (ID del gen según NCBI: 56306); *Bos taurus* (ID del gen según NCBI: 538649) y otras. Pueden existir variantes de transcrito de una manera dependiente de la especie y en diferente número. Por ejemplo, el gen FAM60A humano expresa 3 isoformas de transcrito putativas que difieren en las UTR, pero codifican la misma proteína.

De acuerdo con una realización, la expresión del gen FAM60A se reduce en al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 75 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces o al menos 125 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 750 veces, al menos 1000 veces, al menos 1250 veces, al menos 1500 veces, al menos 1750 veces, al menos 2000 veces, al menos 2500 veces, al menos 3000 veces o al menos 3500 veces. La expresión puede determinarse, por ejemplo, usando RT-PCR en tiempo real u otros métodos de detección de ARN sensibles. Dicha reducción puede conseguirse, por ejemplo, en comparación con la célula de referencia sin modificar en la que no está reducida la expresión del gen endógeno FAM60A. De acuerdo con una realización, la expresión del gen FAM60A es de un 0,05 % o menos, un 0,04 % o menos, un 0,03 % o menos, un 0,02 % o menos, un 0,01 % o menos, un 0,005 % o menos o un 0,0025 % o menos en comparación con la expresión del ARN 18S (establecida al 100 %) en la misma célula. De acuerdo con una realización, la expresión del gen FAM60A es incluso menor tal como de un 0,001 % o menos, un 0,0005% o menos o incluso un 0,0002 % o menos en comparación con la expresión del ARN 18S (establecida al 100 %) en la misma célula.

De acuerdo con una realización, la célula eucariota aislada se origina de una población de células eucariotas que se alteran de modo que además el efecto de la proteína FAM60A se altere en dichas células y en la que dichas células comprenden integrado de forma estable en su genoma un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés, en la que, de promedio, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o al menos un 90 % de las células originarias de dicha población no pierden más de un 30 %, preferiblemente no más de un 25 %, de su valor cuantitativo de expresión del producto de interés a lo largo de un periodo de tiempo de al menos 8 semanas, preferiblemente 10 semanas, más preferiblemente a lo largo de un periodo de tiempo de 12 semanas. Como se muestra en los ejemplos, después de la transfección e identificación de las células transfectadas de forma estable, la cantidad de células que no muestran una pérdida gradual en la productividad durante cultivo prolongado se aumenta cuando se usan las células alteradas descritas en este documento, es decir, se obtienen clones celulares más estables de una población de células seleccionada. La propiedad de estabilidad puede ensayarse, cultivando células individuales de dicha población como clones celulares y determinando el valor cuantitativo a lo largo del periodo de tiempo indicado. La estabilidad puede ensayarse usando, por ejemplo, los ensayos descritos en los ejemplos. Los índices de estabilidad pueden variar de un proyecto a otro dependiendo de la proteína expresada y de si tiene, por ejemplo, los codones optimizados. Sin embargo, con las células eucariotas alteradas de acuerdo con la presente divulgación, en todos los proyectos analizados, se observó un aumento significativo en los clones de expresión estable en comparación con las células de tipo silvestre en las que no está alterado el efecto de FAM60A. La abundancia de células con características de expresión estable se aumentó significativamente en la población de células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente. Por lo tanto, se reduce significativamente el riesgo de que se seleccione un clon inestable que pierde gradualmente la productividad durante cultivo prolongado para producción a gran escala con esta realización en la que están alterados los efectos de FAM60A y C12orf35 en la célula. Esta importante ventaja permite reducir significativamente o incluso omitir completamente los análisis de estabilidad a largo plazo que se realizan habitualmente para eliminar los clones inestables.

La célula eucariota se obtiene de una especie que expresa de forma endógena el gen C12orf35. Además, la célula eucariota se obtiene de un tipo celular que habitualmente expresa dicho gen. A continuación se describen ejemplos. El término "aislado" se usa para dejar claro que la célula eucariota no está contenida en un organismo vivo tal como un animal o ser humano. Como se describe en este documento, la célula puede proporcionarse como cultivo celular, línea celular, clon celular y similares. A continuación también se describen ejemplos. Como se describe anteriormente, dicha célula eucariota se modifica para alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula en comparación con una célula eucariota no modificada correspondiente que expresa de forma endógena C12orf35. La alteración se consigue preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35. Anteriormente se han descrito realizaciones. Para proporcionar líneas celulares de producción con características uniformes y, por tanto, predecibles, se prefiere alterar el genoma de la célula eucariota para conseguir la alteración. Anteriormente se han descrito realizaciones adecuadas. La célula eucariota respectivamente alterada entonces puede transfectarse con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un producto de interés. La célula eucariota puede ser una célula metazoica tal como una célula de vertebrado, preferiblemente una célula de mamífero. Por tanto, todas las realizaciones descritas en este documento para células eucariotas se aplican en general a la realización preferida en la que se usan células de mamífero. La célula eucariota puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en células de roedor, células humanas y células de mono. Las células eucariotas preferidas son células de roedor tales como, por ejemplo, células derivadas de hámster o ratón. Pueden seleccionarse del grupo que consiste en una célula de hámster chino tal como una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula C127, una célula fibroblástica 3T3 de ratón y una célula SP2/0. Se prefiere particularmente una célula CHO. Ejemplos de células CHO son CHO-K1, CHO-S, CHO-K1SV, CHO-SSF3, CHO-DG44, CHO-DUXB11 o una línea celular

derivada de las mismas. Como se muestra en los ejemplos, reducir o eliminar la expresión del gen C12orf35 en una célula CHO proporciona células CHO que pueden producir un producto recombinante con rendimiento aumentado significativo. El gen C12orf35 también se expresa en células humanas. Por tanto, de acuerdo con una realización, la célula eucariota deriva de una célula humana, que puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en una célula HEK293, una célula MCF-7, una célula PerC6, una célula CAP, células hematopoyéticas y una célula HeLa. Otra alternativa son células de mono que, por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en células COS, COS-1, una célula COS-7 y una célula Vero. De acuerdo con una realización, la célula eucariota, que preferiblemente es una célula de mamífero, se proporciona como clon celular o línea celular.

De acuerdo con una realización, la célula eucariota no comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés, un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección y/o un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido indicador que se expresa, en particular se secreta de dicha célula. Puede usarse una célula eucariota "vacía" respectiva, por ejemplo, como línea celular de clonación para tecnologías de producción recombinante. Una célula respectiva puede transfectarse con un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés, por ejemplo, usando un vector de expresión apropiado. Dichas células eucariotas "vacías" en las que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado y que aún no expresan y en particular no secretan un producto recombinante pueden transfectarse, por tanto, con diferentes vectores de expresión, dependiendo del producto deseado de interés que se supone que se produce de forma recombinante. Por tanto, dicha línea celular eucariota puede usarse para diferentes proyectos, es decir, para la producción de diferentes productos de interés, en particular, polipéptidos de interés secretados. La transfección puede ser transitoria o estable y como se demuestra por los ejemplos, se observan rendimientos de expresión mejorados en ambas realizaciones.

De acuerdo con una realización, la célula eucariota comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés. El producto de interés es el producto recombinante que se supone que se expresa por la célula eucariota en gran cantidad. Preferiblemente, el producto de interés es un polipéptido. Además, la célula eucariota puede comprender adicionalmente un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección y/o un polinucleótido heterólogo que codifica un indicador. Esto simplifica la selección de células hospedadoras que se transfectan satisfactoriamente y, por tanto, expresan el producto de interés. Además, la célula eucariota puede comprender varios polinucleótidos que codifican diferentes marcadores de selección y/o polipéptidos indicadores. De acuerdo con una realización, el polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés se integra de forma estable en el genoma de la célula eucariota de acuerdo con el primer aspecto.

Un "polinucleótido heterólogo" o "ácido nucleico heterólogo" y expresiones similares usadas en este documento, en particular se refieren a una secuencia polinucleotídica que se ha introducido en la célula eucariota, por ejemplo, por el uso de técnicas recombinantes tales como transfección. Un "polinucleótido" se refiere en particular a un polímero de nucleótidos que están unidos normalmente desde una desoxirribosa o ribosa hasta otra y se refiere a ADN, así como a ARN, dependiendo del contexto. El término "polinucleótido" no comprende ninguna restricción de tamaño.

Puede usarse un vector de expresión para introducir polinucleótidos heterólogos. Los polinucleótidos pueden estar comprendidos en un casete de expresión. El uno o más polinucleótidos que codifican el producto de interés y el uno o más polinucleótidos que codifican un marcador de selección o polipéptido indicador pueden estar ubicados en el mismo vector de expresión o en diferentes. La introducción en la célula eucariota puede conseguirse, por ejemplo, transfectando un vector de expresión adecuado que comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés en las células hospedadoras. El vector de expresión se integra preferiblemente en el genoma de la célula hospedadora (transfección estable). En el caso de que el ácido nucleico heterólogo no se inserte en el genoma, el ácido nucleico heterólogo se puede perder en un estadio posterior, por ejemplo, cuando las células experimenten mitosis (transfección transitoria). Como se muestra por los ejemplos, las células eucariotas novedosas descritas en este documento son ventajosas para ambas realizaciones, es decir, en transfección transitoria, así como en la estable. Se prefiere transfección estable para generar clones celulares de alta expresión para producir un producto de interés tal como un polipéptido de interés a escala industrial. Esto es particularmente importante para polipéptidos de interés terapéuticos o de diagnóstico. Se conocen varios métodos apropiados en la técnica anterior para introducir un ácido nucleico heterólogo tal como un vector de expresión en células hospedadoras eucariotas, tales como de mamífero y, por tanto, no tienen que describirse detalladamente en este documento. Los métodos respectivos incluyen, pero sin limitación, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transferencia de genes mediada por polímeros y biolística, y similares. Además de los métodos tradicionales basados en una integración aleatoria, también se pueden usar estrategias mediadas por recombinación para transferir el polinucleótido heterólogo al genoma de la célula hospedadora. Como los métodos respectivos son muy conocidos en la técnica anterior, no tienen que describirse detalladamente en este documento. Posteriormente también se describen realizaciones no limitantes de diseños de vectores adecuados y se hace referencia a la divulgación respectiva.

Los vectores de expresión usados para conseguir la expresión de un producto recombinante de interés habitualmente contiene elementos de control de la transcripción adecuados para dirigir la transcripción tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, señales de pausa o terminación de la transcripción habitualmente como elemento de un casete de expresión. Si el producto deseado es un polipéptido, preferiblemente se incluyen elementos de control de la traducción adecuados en el vector, tales como, por ejemplo, regiones no

traducidas 5' que dan lugar a estructuras de capuchón 5' adecuadas para reclutar ribosomas y codones de parada para terminar el proceso de traducción. Los transcritos resultantes contienen elementos funcionales de traducción que facilitan la expresión (es decir, traducción) de las proteínas y la terminación adecuada de la traducción. Una unidad de expresión funcional, que pueda dirigir adecuadamente la expresión de un polinucleótido incorporado también se denomina "casete de expresión". Los expertos en la materia conocen bien la manera en que debe diseñarse un casete de expresión para permitir la expresión en una célula eucariota, tal como preferiblemente en una célula de mamífero.

El uno o más polinucleótidos que codifican el producto de interés y los polinucleótidos que codifican el uno o más marcadores de selección y/o el uno o más polipéptidos indicadores como se describe en este documento están comprendidos preferiblemente en casetes de expresión. Varias realizaciones son adecuadas. Por ejemplo, cada uno de dicho uno o más polinucleótidos puede estar comprendido en un casete de expresión por separado. También se hace referencia a esto como una configuración monocistrónica. También está dentro del alcance de la presente invención que al menos dos de los polinucleótidos respectivos estén comprendidos en un casete de expresión. De acuerdo con una realización, al menos un elemento de sitio de entrada interno de ribosomas (IRES) está funcionalmente ubicado entre los polinucleótidos que se expresan a partir del mismo casete de expresión. De este modo, se asegura que se obtengan productos de traducción separados a partir de dicho transcrito. Las tecnologías de expresión respectivas basadas en IRES y otros sistemas bi- y policistrónicos son muy conocidos y, por tanto, no tienen que describirse adicionalmente en este documento.

Como se describe, el vector de expresión puede comprender al menos un promotor y/o elemento promotor/potenciador como elemento de un casete de expresión. Los promotores pueden dividirse en dos clases, los que funcionan de forma constitutiva y los que están regulados por inducción o desrepresión. Ambos son adecuados. Los promotores constitutivos fuertes que dirigen la expresión en muchos tipos celulares incluyen, pero sin limitación, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, el promotor de SV40 y del virus del sarcoma de Rous, y el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa murina, EF1a. De acuerdo con una realización, el promotor y/o potenciador se obtiene de CMV y/o SV40. Los promotores de transcripción pueden seleccionarse del grupo que consiste en un promotor de SV40, un promotor de CMV, un promotor EF1alfa, un promotor de RSV, un promotor de BROAD3, un promotor de rosa 26 murino, un promotor pCEFL y un promotor de β -actina. También pueden usarse otros promotores si provocan la expresión del producto de interés en la célula eucariota que preferiblemente es una célula de mamífero.

Además, un casete de expresión puede comprender al menos un intrón. Habitualmente, los intrones se colocan en el extremo 5' del marco abierto de lectura, pero también pueden colocarse en el extremo 3'. Dicho intrón puede estar ubicado entre el promotor y/o uno o más elementos promotores/potenciadores y el extremo 5' del marco abierto de lectura del polinucleótido que codifica el producto de interés a expresar. Se conocen varios intrones adecuados en el estado de la técnica que pueden usarse en relación con la presente divulgación.

El producto de interés puede ser cualquier producto biológico que pueda producirse por transcripción, traducción o cualquier otro evento de expresión de la información genética codificada por el polinucleótido que codifica el producto de interés. El producto de interés puede seleccionarse del grupo que consiste en polipéptidos y ácidos nucleicos, en particular ARN. El producto puede ser un compuesto farmacéutica o terapéuticamente activo, o una herramienta de investigación a utilizar en ensayos y similares. Preferiblemente, el producto de interés es un polipéptido. Cualquier polipéptido de interés puede expresarse con el método de la presente divulgación. El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos conjuntamente por uno o más enlaces peptídicos. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas (por ejemplo, que tienen más de 50 aminoácidos) y péptidos (por ejemplo, de 2-49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad, función o tamaño, y pueden incluir, por ejemplo, enzimas (por ejemplo, proteasas, cinasas, fosfatasa), receptores, transportadores, proteínas bactericidas y/o de unión a endotoxinas, polipéptidos estructurales, polipéptidos unidos a membrana, glucoproteínas, proteínas globulares, polipéptidos inmunitarios, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, factores sanguíneos, vacunas o similares. El polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en hormonas peptídicas, interleucinas, activadores de plasminógeno tisular, citocinas, inmunoglobulinas, en particular anticuerpos o fragmentos funcionales de anticuerpo o variantes de los mismos y proteínas de fusión con Fc. El polipéptido de interés que se expresa de acuerdo con los contenidos descritos en este documento también puede ser una subunidad o dominio de un polipéptido tal como, por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo. Las expresiones "producto de interés" o "polipéptido de interés" pueden referirse a dicha subunidad o dominio individual o a la proteína final que está compuesta de las subunidades o dominios respectivos, dependiendo del contexto. En una realización preferida, el polipéptido de interés es una molécula de inmunoglobulina, más preferiblemente un anticuerpo o una subunidad o dominio del mismo, tal como, por ejemplo, la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. El término "anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere en particular a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas mediante enlaces de disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural, así como todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada está constituida normalmente por una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está constituida normalmente por una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera

(CL). Sin embargo, el término "anticuerpo" también incluye otros tipos de anticuerpos tales como anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos constituidos únicamente por una o más, en particular dos, cadenas pesadas, y nanocuerpos, es decir, anticuerpos constituidos únicamente por un solo dominio monomérico variable. Como se analiza anteriormente, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés también puede codificar una o más subunidades o dominios de un anticuerpo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera o un fragmento funcional o derivado de la misma, como polipéptido de interés. Dichas subunidades o dominios se pueden expresar tanto a partir del mismo casete de expresión como de casetes de expresión diferentes. Un "fragmento o derivado funcional" de un anticuerpo en particular se refiere a un polipéptido que se obtiene de un anticuerpo y puede unirse al mismo antígeno, en particular al mismo epítipo que el anticuerpo. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ejecutarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o derivados del mismo. Los ejemplos de fragmentos o derivados de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas ligera y pesada; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que consisten en la región variable de la cadena ligera y cadena pesada de un único brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena polipeptídica; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos entre sí covalentemente; (vii) un dominio variable de la cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera unidas entre sí covalentemente de manera que la asociación de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueda producir únicamente de forma intermolecular y no intramolecular. De acuerdo con una realización, la célula eucariota secreta el polipéptido recombinante de interés al medio de cultivo celular. De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés no es o no comprende una proteína C12orf35.

La célula eucariota puede comprender o no un polinucleótido endógeno correspondiente a, siendo respectivamente idéntico a, el polinucleótido que codifica el producto de interés. De acuerdo con una realización, la célula eucariota no comprende un gen endógeno correspondiente al producto de interés.

Como se describe, en realizaciones preferidas, la célula eucariota comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección y/o un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido indicador además del polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés.

Un "marcador de selección" permite, en condiciones de cultivo selectivo apropiadas, la selección de células hospedadoras que expresan dicho marcador de selección. Un marcador de selección proporciona al portador de dicho marcador, en condiciones selectivas, una ventaja de supervivencia y/o crecimiento. De este modo, las células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente con el vector de expresión pueden seleccionarse en condiciones de selección apropiadas. Habitualmente, un gen marcador de selección conferirá resistencia a un agente de selección tal como un fármaco, por ejemplo, un antibiótico u otro agente tóxico, o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula hospedadora. Puede ser un marcador de selección positivo o negativo. Para seleccionar células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente puede usarse un medio de cultivo para cultivar las células hospedadoras, que comprende un agente de selección que permite la selección por el marcador de selección usado. En otras realizaciones, el marcador de selección posibilita que la célula hospedadora sobreviva y prolifere en ausencia o reducción de un compuesto que es esencial para la supervivencia y/o proliferación de las células hospedadoras que carecen del marcador de selección. Cultivando las células hospedadoras en un medio que no comprende el compuesto esencial en una concentración suficientemente alta para la supervivencia y/o proliferación de la célula hospedadora o comprende una cantidad reducida de dicho compuesto esencial, únicamente las células hospedadoras que expresan el marcador de selección pueden sobrevivir y/o proliferar. De acuerdo con una realización, el marcador de selección es un marcador de resistencia a un fármaco que codifica una proteína que confiere resistencia a unas condiciones de selección que implican dicho fármaco. Se ha descrito una diversidad de genes marcadores de selección (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/08796, WO 94/28143, WO 2004/081167, WO 2009/080759, WO 2010/097240). Por ejemplo, se puede usar al menos un marcador de selección, que confiere resistencia frente a uno o más agentes antibióticos. El marcador de selección puede ser, de acuerdo con una realización, un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable permite la selección de células hospedadoras que contienen vector y puede propiciar la amplificación génica de dicho vector en las células hospedadoras. Los genes marcadores de selección habitualmente usados con células eucariotas tales como, en particular, células de mamífero, incluyen los genes de la aminoglucosido fosfotransferasa (APH), higromicina fosfotransferasa (hyg), dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa (tk), glutamina sintetasa, asparagina sintetasa, y genes que codifican resistencia a neomicina (G418), puromicina, higromicina, zeocina, ouabaina, blasticidina, histidinol D, bleomicina, fleomicina y ácido micofenólico. De acuerdo con una realización, se usa un receptor de folato como marcador de selección junto con las células eucariotas novedosas descritas en este documento (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/080759), que preferiblemente son células de mamífero. De acuerdo con una realización, la célula eucariota comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un receptor de folato como marcador de selección y/o comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador de selección. Esta realización también se describirá en detalle a continuación en relación con el método de selección de acuerdo con el segundo aspecto. La célula eucariota puede expresar de forma endógena DHFR y un receptor de folato.

Un "polipéptido indicador" permite la identificación de una célula que expresa dicho polipéptido indicador basándose en las características indicadoras (por ejemplo, fluorescencia). Los genes indicadores normalmente no proporcionan a las células hospedadoras una ventaja de supervivencia. Sin embargo, la expresión del polipéptido indicador se puede usar para diferenciar las células que expresan el polipéptido indicador y aquellas células que no lo expresan. Por lo tanto, un gen indicador también posibilita la selección de las células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente. Los polipéptidos indicadores adecuados incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, la proteína de fluorescencia verde (GFP), YFP, CFP y luciferasa. De acuerdo con una realización, el polipéptido indicador tiene características que posibilitan la selección mediante citometría de flujo.

Como se describe, el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés también puede comprender más de un marcador de selección y/o gen indicador. Además, el uno o más polinucleótidos que codifican el uno o más marcadores de selección y/o el uno o más polinucleótidos que codifican el uno o más polipéptidos indicadores también pueden proporcionarse en uno o más vectores de expresión diferentes que se cotransfectan con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés. Asimismo, dichas estrategias de cotransfección posibilitan la selección como se conoce bien en la técnica anterior.

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión comprendido en la célula eucariota puede comprender adicionalmente elementos adicionales de vector. Por ejemplo, pueden comprender al menos un polinucleótido adicional que codifica un producto de interés adicional. Como se explica anteriormente y como llega a ser evidente a partir de los ejemplos descritos anteriormente de polipéptidos que pueden expresarse de acuerdo con los presentes contenidos, el polipéptido final que tiene que producirse y preferiblemente secretarse por la célula hospedadora, también puede ser una proteína que está compuesta de varias subunidades o dominios individuales. Un ejemplo preferido de una proteína respectiva es una molécula de inmunoglobulina, en particular un anticuerpo que comprende, por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras. Existen varias opciones para producir una proteína respectiva que esté compuesta por diferentes subunidades o dominios individuales y en la técnica se conocen diseños de vectores adecuados. De acuerdo con una realización, se expresan dos o más subunidades o dominios de dicha proteína a partir de un casete de expresión. En esta realización, se obtiene un transcrito largo a partir del casete de expresión respectivo que comprende las regiones codificantes de las subunidades o dominios individuales de la proteína. De acuerdo con una realización, al menos un elemento IRES (sitio de entrada interna de ribosomas) está ubicado funcionalmente entre las regiones codificantes de las subunidades o dominios individuales y cada región codificante va precedida por una secuencia líder secretora. De este modo, se garantiza que se obtengan productos de traducción por separado a partir de dicho transcrito y que la proteína final se pueda agrupar y secretar correctamente. En la técnica anterior existe constancia de las tecnologías respectivas y, por tanto, no requieren ninguna descripción detallada en este documento.

Para algunas realizaciones tales como la expresión de anticuerpos, se prefiere incluso expresar las subunidades o dominios individuales a partir de diferentes casetes de expresión. De acuerdo con una realización, el casete de expresión usado para expresar el producto de interés es un casete de expresión monocistrónico. Todos los casetes de expresión comprendidos en el vector de expresión o combinación de vectores de expresión pueden ser monocistrónicos. Por consiguiente, de acuerdo con una realización, cada casete de expresión diseñado para expresar un producto de interés comprende un polinucleótido que codifica una subunidad o dominio de la proteína a expresar como polipéptido de interés. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos, un casete de expresión puede codificar la cadena ligera de un anticuerpo y otro casete de expresión puede codificar la cadena pesada del anticuerpo. Tras la expresión de las subunidades o dominios individuales a partir de los casetes de expresión individuales, la proteína final tal como un anticuerpo se agrupa a partir de dichas subunidades o dominios y se secreta por la célula hospedadora. Esta realización es particularmente adecuada para expresar moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos. En este caso, un primer polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés codifica, por ejemplo, la cadena pesada o la ligera de una molécula de inmunoglobulina y un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés codifica la otra cadena de la molécula de inmunoglobulina. De acuerdo con una realización, el vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión usado para transfectar la célula hospedadora de mamífero comprende al menos un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma y al menos un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. Dichos polinucleótidos pueden estar ubicados en el mismo vector de expresión o en diferentes en el caso de que se use una combinación de al menos dos vectores de expresión. Tras la expresión de dichos polinucleótidos en la célula hospedadora transfectada, se obtiene una molécula de inmunoglobulina funcional y preferiblemente se secreta de la célula hospedadora. Como se muestra por los ejemplos, el uso de las células y líneas celulares novedosas descritas en este documento, en las que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional de dicho gen, es particularmente adecuado para expresar proteínas, en particular proteínas que estén compuestas de varias subunidades o dominios tales como los anticuerpos. Como se muestra por los ejemplos, la cantidad global de anticuerpo que se expresa por dichas células eucariotas está aumentada. Además, en realizaciones, en particular en las que el efecto de FAM60A está adicionalmente alterado en la célula, también se mejoraba la estabilidad de la expresión. Por lo tanto, las líneas celulares eucariotas novedosas descritas en este documento tienen ventajas particulares cuando se usan para la

expresión recombinante de polipéptidos, incluyendo proteínas que están compuestas de varias subunidades o dominios, tales como, por ejemplo, los anticuerpos. También se describen ventajas adicionales en relación con los ejemplos.

5 **B. Método de selección**

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

- 10 (a) proporcionar células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto como células hospedadoras, en el que dichas células hospedadoras comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés;
y
15 (b) seleccionar una o más células hospedadoras que expresan el producto de interés.

15 Las células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto, incluyendo realizaciones adecuadas y preferidas, así como sus ventajas se describen en detalle anteriormente y se refieren a la divulgación respectiva que también se aplica aquí. Como se describe, se usan preferiblemente células de vertebrado, en particular células de mamífero, como células hospedadoras. Las propiedades ventajosas de dichas células eucariotas simplifican, por ejemplo, la selección y, por tanto, la identificación de clones de producción adecuados. Además, como la proporción de células de alta producción en la población de células transfectadas se aumenta significativamente cuando se usan las células eucariotas descritas en este documento, tienen que analizarse y cribarse menos clones para sus características de producción para identificar clones de producción adecuados. Esto ahorra tiempo y, además, permite manipular más proyectos en paralelo. Además, como se demuestra por los ejemplos, el número, respectivamente la proporción de células de alta expresión se aumenta después de etapas de transfección y selección cuando se usan dichas células eucariotas novedosas. Dichas células de expresión, también llamadas combinaciones de células producen cantidades significativas del producto de interés. Por tanto, dichas combinaciones de células que comprenden células de alta expresión pueden usarse, por ejemplo, para producir un polipéptido de interés en un tramo de tiempo corto. Por lo tanto, el producto de interés puede producirse rápidamente en células respectivas.

20 De acuerdo con una realización, la fase (a) del método de selección de acuerdo con el segundo aspecto comprende transfectar células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto, que preferiblemente no comprenden aún un polinucleótido heterólogo que codifique el producto de interés, con un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés, proporcionando de este modo células eucariotas que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés. Como se describe, se usan preferiblemente células de mamífero como células hospedadoras eucariotas. El polinucleótido que codifica el producto de interés puede estar comprendido en un vector de expresión que después se transfecta en la célula eucariota.

25 La fase de selección (b) puede ser un proceso de selección de múltiples etapas que comprende varias etapas de selección para seleccionar y, por tanto, identificar células hospedadoras que expresan un producto de interés con alto rendimiento. Por ejemplo, la fase (b) puede incluir una o más etapas de selección para identificar células que se transfectaron satisfactoriamente, así como una o más etapas de selección posteriores para seleccionar células de altas expresiones de la combinación de células transfectadas satisfactoriamente. La estrategia de selección apropiada depende del diseño del vector de expresión que se usa para introducir el polinucleótido que codifica el producto de interés y, en particular, depende del uso de uno o más marcadores de selección y/o uno o más indicadores. En lo sucesivo se describirán realizaciones no limitantes.

30 Como se describe anteriormente, las células hospedadoras eucariotas pueden comprender al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección. El polinucleótido que codifica el marcador de selección puede introducirse en la célula hospedadora junto con el polinucleótido que codifica el producto de interés usando el mismo vector de expresión cotransfectado o uno diferente. La fase (b) entonces comprende cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en condiciones que proporcionan una presión de selección a las células hospedadoras para identificar las células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente, por ejemplo, usando un medio de selección apropiado. Como se usa en este documento, un "medio de selección", en particular se refiere a un medio de cultivo celular útil para la selección de células hospedadoras que expresan el marcador de selección. Puede incluir, por ejemplo, un agente de selección tal como un fármaco tóxico que permite identificar células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente. Como alternativa, un compuesto esencial puede estar ausente o su concentración puede estar reducida en el medio de selección. De acuerdo con una realización, las células hospedadoras que no se transfectaron satisfactoriamente y, por tanto, no expresan el uno o más marcadores de selección o en las que la expresión es baja, no pueden proliferar o mueren en las condiciones de cultivo selectivas. Por el contrario, las células hospedadoras que se transfectaron satisfactoriamente con el uno o más vectores de expresión y que expresan el uno o más marcadores de selección (y, por consiguiente, el producto de interés cointroducido) con suficiente rendimiento son resistentes a o se ven menos afectadas por la presión de selección y, por lo tanto, pueden proliferar, superando de ese modo las células hospedadoras que no se transfectaron satisfactoriamente o en las que no es favorable el sitio de integración en el genoma de la célula. De acuerdo con una realización, el marcador de selección se selecciona del grupo que consiste en marcadores de resistencia a antibióticos, marcadores de resistencia a fármacos y marcadores metabólicos. Ejemplos adecuados de marcadores de selección y principios de selección se describen anteriormente

conjuntamente con el primer aspecto y las condiciones de selección apropiadas para los marcadores de selección individuales también son bien conocidas por los expertos en la materia. Posteriormente se describirán resumidamente realizaciones no limitantes, pero ventajosas.

5 Como se muestra por los ejemplos, una ventaja de las células eucariotas novedosas descritas en ese documento, tales como en particular una línea celular CHO que comprende una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8 que incluye el gen C12orf35, es que ya después de una etapa de selección convencional, tal como, por ejemplo, selección con G418/neo, el porcentaje de células de alta producción se aumenta significativamente. Por ejemplo, cuando se transfectan líneas celulares CHO normales, en las que la expresión del gen C12orf35 no está reducida o
10 eliminada, a menudo un 60 % o incluso hasta un 80 % de las células que sobreviven a la selección de G418/neo no son productoras. El número de no productoras o de baja producción se reduce significativamente cuando se usan las líneas celulares eucariotas novedosas de acuerdo con la presente divulgación. Esto permite realizar de forma eficaz la selección en la fase (b) usando únicamente un marcador de selección y, por tanto, únicamente una etapa de selección, tal como, por ejemplo, selección con G418/neo, si se desea. Esto aumenta la velocidad de selección y, por
15 consiguiente, reduce el tiempo necesario para obtener células transfectadas que expresen el producto de interés. Además, como se aumenta el número de altos productores, se descubrió que incluso en ausencia de una selección específica para células de alta producción se pueden generar poblaciones celulares con un comportamiento de tipo clonal y, por tanto, en un tiempo muy corto. Por lo tanto, el producto de interés incluso puede fabricarse a partir de dichas combinaciones. Por tanto, para aplicaciones en las que, por ejemplo, únicamente se necesitan rápidamente
20 determinadas cantidades de proteína, por ejemplo, con fines de investigación o ensayo, dicho sistema de selección rápida que consigue rápidamente células de buena producción o combinaciones de células productoras es muy ventajoso.

25 Sin embargo, si se desea aumentar adicionalmente la productividad, se prefiere una selección de múltiples etapas en la fase (b). Este es particularmente el caso cuando se pretende establecer una línea celular clonal para producir el producto de interés a gran escala, en particular escala industrial.

Como se describe anteriormente, el vector de expresión o los vectores de expresión introducidos en las células eucariotas pueden comprender dos o más genes marcadores de selección y la selección de los diferentes marcadores
30 de selección puede hacerse simultánea o secuencialmente para seleccionar células hospedadoras que se transfectaron satisfactoriamente con el uno o más vectores de expresión y expresan el producto de interés con alto rendimiento. El medio de selección usado para el cultivo puede comprender agentes de selección para todos los marcadores de selección usados. En otra realización, el cultivo puede realizarse en primer lugar con un medio de selección que comprende únicamente el uno o más agentes de selección de uno o un subconjunto de los genes
35 marcadores de selección usados, seguido de la adición de uno o más de los agentes de selección para los genes marcadores de selección restantes. En otra realización, las células hospedadoras se cultivan con un primer medio de selección que comprende únicamente el uno o más agentes de selección de uno o un subconjunto de los genes marcadores de selección del uno o más vectores, seguido de cultivo con un segundo medio de selección que comprende el uno o más agentes de selección de uno o más de los agentes de selección de los genes marcadores
40 de selección restantes. De acuerdo con una realización, el segundo medio de selección no comprende el uno o más agentes de selección usados en el primer medio de selección.

De acuerdo con una realización, las células eucariotas proporcionadas en la fase (a) comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica una dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador de selección y la fase b comprende
45 realizar una etapa de selección para DHFR. Una etapa de selección respectiva habitualmente implica un medio de selección que comprende un inhibidor de DHFR. Se conocen varias enzimas DHFR adecuadas y por consiguiente genes DHFR en la técnica anterior que pueden usarse como marcador de selección. El término DHFR se refiere a DHFR de tipo silvestre, así como enzimas DHFR que tienen uno o más intercambios de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, eliminaciones, sustituciones o adiciones) con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima
50 DHFR de tipo silvestre correspondiente, proteínas de fusión que comprenden una enzima DHFR y enzimas DHFR que se han modificado para proporcionar una estructura y/o función adicional, así como fragmentos funcionales de lo anterior, que aún tienen al menos una función de una enzima DHFR. Dichas realizaciones son bien conocidas en la técnica anterior y, por tanto, no tienen que describirse en detalle. Por ejemplo, una enzima DHFR puede usarse como marcador de selección que sea más o menos sensible a antifolatos tal como MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre
55 y/o la enzima de DHFR expresada de forma endógena por la célula hospedadora, si se expresa. Las enzimas DHFR respectivas son bien conocidas en la técnica anterior y, por ejemplo, se describen en el documento EP 0246049 y otros documentos. La enzima DHFR puede obtenerse de cualquier especie siempre que sea funcional dentro de la presente invención, es decir, compatible con la célula hospedadora de mamífero utilizada. Por ejemplo, se ha usado ampliamente una DHFR de ratón mutante con una resistencia principal a MTX como marcador de selección dominante
60 en células eucariotas. Una enzima DHFR puede usarse como marcador de selección que es menos susceptible a un inhibidor de DHFR tal como MTX que la enzima DHFR expresada de forma endógena en una célula hospedadora DHFR⁺ (más) y, por tanto, una célula hospedadora que comprende un gen DHFR endógeno funcional. De acuerdo con una realización, se coloca un intrón o un fragmento del mismo en el extremo 3' del marco abierto de lectura del gen DHFR. El intrón usado en el casete de expresión de DHFR está conduciendo a una variante no funcional más pequeña del gen DHFR (Grillari *et al.*, 2001, J. Biotechnol. 87, 59-65). De ese modo, el nivel de expresión del gen
65

DHFR se disminuye, lo que aumenta adicionalmente la rigurosidad de la selección. Se describen métodos alternativos que hacen uso de un intrón para reducir el nivel de expresión del gen DHFR en el documento EP 0724639 y también podrían usarse.

5 Un "inhibidor de DHFR" en particular se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Un inhibidor respectivo puede competir, por ejemplo, con el sustrato de DHFR por la unión a DHFR. Los inhibidores de DHFR adecuados son, por ejemplo, antifolatos, tales como metotrexato (MTX). Por tanto, de acuerdo con una realización, la fase (b) comprende realizar una etapa de selección para DHFR cultivando dicha pluralidad de células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende al menos un inhibidor de DHFR, tal como
10 preferiblemente un antifolato. Las condiciones de selección respectivas son conocidas para los expertos en la materia. De acuerdo con una realización, se usa un medio de cultivo selectivo en la fase (b), que comprende un antifolato en una concentración de 1500 nM o menos, 1250 nM o menos, 1000 nM o menos, 750 nM o menos, 500 nM o menos, 250 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 125 nM o menos, 100 nM o menos o 75 nM o menos. La concentración usada de dicho inhibidor en el medio de cultivo selectivo (que también puede aumentarse gradualmente), determina la rigurosidad de las condiciones de selección. Los intervalos de concentración preferidos para el antifolato pueden seleccionarse de 500 nM - 0,1 nM, 350 nM - 1 nM, 200 nM - 2,5 nM, 150 nM - 5 nM, 100 nM - 7,5 nM y 75 nM - 10 nM. De acuerdo con una realización, el medio de cultivo selectivo comprende MTX como antifolato. Como se muestra por los ejemplos, pueden usarse bajas concentraciones de MTX junto con las células eucariotas novedosas descritas en este documento para realizar una selección por DHFR, en particular si la selección
20 se realiza en combinación con una concentración limitante de folato.

De acuerdo con una realización, las células hospedadoras de acuerdo con la presente divulgación proporcionadas en la fase (a) comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica un transportador de folato como marcador de selección. Un sistema de selección basado en transportador de folato tiene varias ventajas cuando se usa junto con
25 células eucariotas que dependen de la captación de folato tales como las células de mamífero. Un transportador de folato permite importar al menos un folato del medio de cultivo a la célula hospedadora que es preferiblemente una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, el transportador de folato es o comprende el transportador de folato reducido (RFC). El RFC es una glucoproteína de membrana expresada de forma ubicua que sirve como transportador principal para la captación de folatos reducidos tales como 5-metil-THF y 5-formil-THF en la célula. Sin embargo, el RFC presenta una afinidad muy baja por el folato oxidado, ácido fólico. Por tanto, las células que carecen de la expresión de RFC o se ha eliminado del locus de RFC genómico pueden servir como destinatarios para la transfección del gen marcador de selección RFC en condiciones en que los folatos reducidos tales como 5-formil-THF se reducen gradualmente del medio de cultivo, permitiendo de ese modo identificar las células que expresan niveles aumentados de este transportador de folato y, por consiguiente, el producto de interés. Las condiciones de selección
35 adecuadas cuando se usa RFC como marcador de selección son conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2006/059323.

De acuerdo con una realización que también se describe en detalle a continuación y en la sección de ejemplos, el transportador de folato usado como marcador de selección es un receptor de folato. Un sistema de selección basado
40 en receptor de folato tiene varias ventajas. Por ejemplo, para la selección, no se necesitan sustancias tóxicas (aunque pueden usarse) y, además, el receptor de folato endógeno de la célula hospedadora no tiene que suprimirse. Además, este sistema de expresión funciona particularmente bien junto con la línea celular eucariota novedosa descrita en este documento, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está reducido o eliminado, preferiblemente por reducción o eliminación de la expresión del gen C12orf35. Una explicación es que los genes introducidos, tales como el polipéptido de interés, pero también los genes marcadores de selección, se expresan a una tasa mayor, lo que simplifica la selección.

Un "receptor de folato", como se usa en este documento, se refiere a un receptor de folato que es funcional y, por tanto, puede importar o captar un folato o derivado del mismo a la célula eucariota. Preferiblemente, el receptor tiene capacidad de importación o captación unidireccional de folato o un derivado de folato en la célula eucariota. Además, un receptor de folato como se usa en este documento está unido a membrana. Por tanto, los receptores de folato descritos en este documento son receptores de folato unidos a membrana funcionales. El anclaje a la membrana puede conseguirse, por ejemplo, mediante un anclaje transmembranario o mediante un anclaje de GPI. Se prefiere un anclaje de GPI ya que corresponde al entorno natural del receptor de folato unido a membrana. Los receptores de folato (FR) son glucoproteínas de unión a folato de alta afinidad. Están codificadas por tres genes distintos FR alfa, FR beta y FR gamma. FR alfa y FR beta son glucoproteínas de superficie celular ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que FR gamma está desprovista de un anclaje de GPI y es una proteína secretada. Sin embargo, puede alterarse genéticamente para incluir un anclaje transmembranario o un anclaje de GPI. Dicha forma alterada de un FR gamma que incluye un anclaje a membrana también se considera un receptor de folato unido a membrana
55 si puede importar o captar un folato o derivado del mismo en una célula eucariota. La expresión "receptor de folato" también incluye mutantes unidos a membrana de receptores de folato de tipo silvestre que tienen capacidad de captación de folato y proteínas de fusión que comprenden un receptor de folato respectivo.

El receptor de folato utilizado puede obtenerse de un receptor de folato de cualquier especie siempre que sea funcional dentro de la presente invención, es decir, sea compatible con la célula hospedadora que se utiliza y, cuando se expresa
65

en la célula hospedadora transfectada, incorpora folato, en particular ácido fólico, del medio de cultivo en la célula hospedadora que depende de la captación de folato. En general, el receptor de folato que se introduce en la célula hospedadora como marcador de selección puede ser homólogo o heterólogo a un receptor de folato endógeno de la célula hospedadora (si hay un receptor de folato endógeno presente que es preferido). Si es homólogo, se obtendrá de la misma especie que la célula hospedadora. Si es heterólogo, se obtendrá de otra especie distinta de la célula hospedadora. Por ejemplo, puede usarse un receptor de folato humano como marcador de selección para una célula hospedadora de roedor, por ejemplo, una célula de hámster tal como una célula CHO. Preferiblemente, se usa un receptor de folato derivado de una especie de mamífero, por ejemplo, derivado de un roedor, tal como ratón, rata o hámster o, más preferido, derivado de un ser humano. El receptor de folato unido a membrana usado como marcador de selección puede seleccionarse del grupo que consiste en un receptor de folato alfa, un receptor de folato beta y un receptor de folato gamma. De acuerdo con una realización, se usa un receptor de folato alfa humano como marcador de selección.

El uso de un receptor de folato unido a membrana como transportador de folato es ventajoso porque pueden usarse células que expresan de forma endógena sus propios receptores de folato y el ácido fólico puede procesarse por el receptor de folato. Los receptores de folato unidos a membrana adecuados que pueden usarse como marcadores de selección para células eucariotas que dependen de la captación de folato tales como células de mamífero y las condiciones de selección adecuadas también se describen en el documento WO 2009/080759. De acuerdo con una realización, se usa el receptor de folato alfa humano de tipo silvestre maduro que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20 (código de 1 letra, mostrado en dirección desde el extremo N hasta el extremo C).

El receptor de folato alfa se ancla de forma natural a la membrana celular mediante un anclaje de GPI. La secuencia señal para un anclaje de GPI no se muestra en la SEQ ID NO: 20. De acuerdo con una realización, el receptor de folato alfa que se obtiene de o comprende la SEQ ID NO: 20 comprende una señal de anclaje de GPI en el extremo C. Puede usarse cualquier señal de anclaje de GPI adecuada. La secuencia señal de anclaje de GPI natural del receptor de folato alfa humano se muestra en la SEQ ID NO: 21 (código de 1 letra, mostrado en dirección desde el extremo N hasta el extremo C).

El anclaje a membrana puede conseguirse, de forma alternativa, usando un anclaje de membrana, por ejemplo, un anclaje transmembranario. En esta realización, el receptor de folato comprende un anclaje de membrana en su extremo C. Los anclajes adecuados son conocidos en la técnica anterior. El receptor de folato alfa que se obtiene de o comprende la SEQ ID NO: 20 puede comprender una secuencia líder en el extremo N. Puede usarse cualquier secuencia líder adecuada que asegure la expresión funcional del receptor de folato.

La secuencia de aminoácidos completa que incluye la secuencia líder natural (en el extremo N) y la secuencia señal de anclaje de GPI natural (en el extremo C) del receptor de folato alfa humano de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 22 (código de 1 letra, mostrado en dirección desde el extremo N hasta el extremo C).

De acuerdo con una realización, el receptor de folato unido a membrana tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 o 22, o es una variante funcional de las anteriores que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología o identidad con la SEQ ID NO: 20 o 22, está unido a membrana y tiene capacidad de captación de ácido fólico en la célula.

Cuando se usa una célula eucariota que depende de la captación de folato tal como una célula hospedadora de mamífero, que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un transportador de folato, preferiblemente un receptor de folato, la fase (b) comprende una etapa de selección en la que dicha pluralidad de células hospedadoras se cultiva en un medio de cultivo selectivo que comprende folato en una concentración limitante. Una "concentración limitante de folato", como se usa en este documento, se refiere en particular a una concentración de uno o más folatos en el medio de cultivo selectivo que proporciona una presión selectiva en la célula hospedadora. En dichas condiciones de selección, únicamente crecen y proliferan las células hospedadoras que han incorporado el vector de expresión y, por tanto, expresan el transportador de folato como marcador de selección. Por consiguiente, los folatos no están comprendidos en el medio de cultivo selectivo en abundancia, y esta limitación de uno o más folatos en el medio de cultivo proporciona una presión de selección en las células hospedadoras. El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante puede captarse en y procesarse por la célula hospedadora, en particular por células hospedadoras que han incorporado el transportador de folato que se usa como marcador de selección. Los folatos y, en particular, derivados de folato que no se procesarían o no pueden procesarse por la célula hospedadora no contribuyen a la presión de selección que se ejerce para seleccionar células hospedadoras que hayan incorporado el transportador de folato como marcador de selección y, por consiguiente, no contribuyen a la concentración limitante de folato. Sin embargo, los folatos respectivos, tales como, por ejemplo, antifolatos, pueden estar presentes e incluso preferiblemente están presentes, si se realiza una selección combinada con DHFR como se describirá posteriormente. El folato presente en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante puede ser, por ejemplo, un folato oxidado o un folato reducido o un derivado del mismo. Los folatos oxidados, tales como ácido fólico, así como derivados reducidos de ácido fólico, conocidos como folatos reducidos o tetrahidrofolatos (THF) son un grupo de vitaminas B-9 que son cofactores esenciales y/o coenzimas para la biosíntesis de purinas, timidilato y determinados

aminoácidos en células eucariotas que dependen de la captación de folato tales como las células de mamífero. Los cofactores de THF son particularmente cruciales para la replicación del ADN y, por tanto, la proliferación celular. Preferiblemente, el folato que está comprendido en una concentración limitante en un medio de cultivo selectivo es ácido fólico. Los intervalos de concentración adecuados para proporcionar una concentración limitante de folato se describen a continuación.

El sistema de selección basado en transportador de folato se basa en la disponibilidad limitada de folato, preferiblemente ácido fólico, en el medio de cultivo celular. Las células hospedadoras que no han incorporado satisfactoriamente el uno o más vectores de expresión y, por tanto, no expresan suficientes cantidades del transportador de folato, que es preferiblemente un receptor de folato, mueren o alteran su crecimiento en las condiciones de cultivo selectivas en comparación con las células hospedadoras que han incorporado satisfactoriamente el uno o más vectores de expresión. Como se muestra por los ejemplos, usar una selección basada en receptor de folato en combinación con las células eucariotas novedosas descritas en este documento permite una selección, cribado y establecimiento acelerados de clones celulares eucariotas que sobreexpresan altos niveles de productos recombinantes de interés tales como polipéptidos.

El medio de cultivo selectivo que se usa en la fase (b), respectivamente usado en una subetapa de la fase (b), para la selección frente a un receptor de folato como marcador de selección puede comprender folato y, en particular ácido fólico en una concentración seleccionada de:

- (a) aproximadamente 5000 nM - 0,1 nM;
- (b) aproximadamente 2500 nM - 0,1 nM;
- (c) aproximadamente 1500 nM - 0,1 nM;
- (d) aproximadamente 1000 nM - 0,1 nM;
- (e) aproximadamente 750 nM - 0,1 nM;
- (f) aproximadamente 500 nM - 0,1 nM;
- (g) aproximadamente 250 nM - 0,2 nM; preferiblemente aproximadamente 250 nM - 1 nM o aproximadamente 250 nM - 2,5 nM;
- (h) aproximadamente 150 nM - 0,3 nM; preferiblemente aproximadamente 150 nM - 1 nM o aproximadamente 150 nM - 2,5 nM;
- (i) aproximadamente 100 nM - 0,5 nM; preferiblemente aproximadamente 100 nM - 1 nM o aproximadamente 100 nM - 2,5 nM;
- (j) aproximadamente 75 nM - 0,6 nM, preferiblemente aproximadamente 75 nM - 1 nM o aproximadamente 75 nM - 2,5 nM;
- (k) aproximadamente 50 nM - 1 nM; preferiblemente aproximadamente 50 nM - 2,5 nM o aproximadamente 50 nM - 5 nM;
- (l) aproximadamente 35 nM - 0,75 nM; y
- (m) aproximadamente 25 nM - 1 nM o aproximadamente 25 nM - 2,5 nM, aproximadamente 20 nM - 3 nM o aproximadamente 15 nM - 4 nM o 10 nM - 5 nM.

Las concentraciones e intervalos de concentración como se describen anteriormente son particularmente adecuados para el cultivo rápido de células de mamífero en suspensión, tales como células CHO, que es una realización preferida para líneas celulares de producción comercial. Sin embargo, diferentes líneas celulares pueden tener diferentes propiedades de consumo de ácido fólico. Las concentraciones adecuadas, sin embargo, pueden determinarse fácilmente de forma experimental por un experto en la materia. El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo es preferiblemente ácido fólico y, de acuerdo con una realización, el ácido fólico es el único folato comprendido en el medio de cultivo selectivo que contribuye a la concentración limitante de folato.

De acuerdo con una realización, las células hospedadoras proporcionadas en la fase (a) comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica un transportador de folato como primer marcador de selección y un polinucleótido heterólogo que codifica un segundo marcador de selección que procesa un sustrato que es folato, un derivado de un folato y/o un producto que puede obtenerse por el procesamiento de folato. Por ejemplo, el segundo marcador de selección puede ser una dihidrofolato reductasa (DHFR) o una enzima que funciona después de o junto con la DHFR tal como timidilato sintasa (TS) y serina hidroximetiltransferasa (SHMT). Preferiblemente, se usa un receptor de folato unido a membrana como primer marcador de selección y el segundo marcador de selección es una dihidrofolato reductasa (DHFR). De acuerdo con esta realización, la fase (b) comprende cultivar las células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende folato, preferiblemente ácido fólico, en una concentración limitante y comprende al menos un inhibidor de DHFR tal como, por ejemplo, MTX. Como se muestra por los ejemplos, cuando se usan las líneas celulares eucariotas novedosas descritas en este documento como células hospedadoras para la expresión recombinante en combinación con dicha selección basada en receptor de folato/DHFR, se obtienen resultados de expresión alta y homogénea ya a nivel de combinación celular. Como se muestra en la sección de ejemplos, podría obtenerse una expresión de 7 a 8 veces mayor a nivel de combinación ya con bajas concentraciones de inhibidor de DHFR. Este aumento significativo en el valor cuantitativo de la combinación es ventajoso, por ejemplo, cuando se pretenden producir cantidades menores de un polipéptido de interés rápidamente, ya que se pueden usar las combinaciones de células seleccionadas para la producción, lo que ahorra el tiempo de establecer una línea celular

clonal. Además, como el número de células de alta expresión en la combinación se aumenta significativamente, se simplifica la obtención de clones celulares de alta producción a partir de dicha combinación de células. Tienen que prepararse menos clones celulares, lo que reduce el esfuerzo de cribado. Realizaciones adecuadas del receptor de folato y DHFR, así como condiciones de selección y concentraciones adecuadas se describen anteriormente y se refieren a la divulgación anterior que también se aplica aquí. Las concentraciones e intervalos de concentración descritos para folato y antifolato descritos anteriormente puede combinarse entre sí. En una realización, se usa una concentración de folato de aproximadamente 0,1 nM - 150 nM, 1 nM - 125 nM, 5 nM - 100 nM o 7,5 nM a 75 nM en combinación con una concentración de antifolato de 0,1 nM - 150 nM, 1 nM a 125 nM, 2,5 nM a 100 nM, 5 nM a 75 nM o 7,5 nM a 50 nM en el medio de cultivo selectivo. Como se describe, el ácido fólico se usa preferiblemente como folato y MTX como antifolato.

Usando una combinación respectiva de un receptor de folato y DHFR como marcador de selección y aplicando en la fase (b) las condiciones de selección para ambos marcadores simultáneamente usando un medio de cultivo selectivo apropiado, se produce un sistema de selección muy riguroso que permite el enriquecimiento eficaz de células de alta producción a partir de la población de células hospedadoras transfectadas. La viabilidad de las células hospedadoras se aumenta considerablemente en condiciones selectivas, si ambos marcadores de selección se expresan fuertemente. De este modo, pueden seleccionarse células eucariotas dependientes de la captación de folato tales como las células de mamífero, que muestran una tasa de expresión aumentada del producto de interés. Este concepto de uso de un receptor de folato como marcador de selección en combinación con un marcador de selección adicional implicado en el metabolismo de folato tal como preferiblemente una DHFR, se divulga en el documento WO 2010/097240. Como se muestra por los ejemplos, la alta rigurosidad del sistema de selección de acuerdo con esta realización puede combinarse ventajosamente con las células eucariotas novedosas descrita en este documento, en las que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado, preferiblemente por reducción o eliminación de la expresión de dicho gen. Esta combinación reduce además el número de productores bajos y puede obtenerse una población más homogénea de células de alta producción después de la selección. Esto simplifica, entre otras cosas, la clonación celular individual de células de alta producción. Además, esta combinación permite reducir significativamente la concentración de MTX necesaria para la selección por DHFR.

De acuerdo con una realización, se realizan dos o más etapas de selección en la fase (b), en la que las dos o más etapas de selección se basan en el mismo principio de selección o uno diferente. Por ejemplo, si se usa un marcador de selección adicional además del receptor de folato y/o DHFR, las condiciones de selección para dicho marcador de selección adicional pueden aplicarse antes de (por ejemplo, en una etapa antes de la selección) o simultáneamente con la aplicación de las condiciones selectivas para el receptor de folato y/o DHFR. Por ejemplo, en el caso de que se use el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo) como marcador de selección adicional, la fase (b) puede comprender cultivar en primer lugar las células en un medio, por ejemplo, que contenga G418 para seleccionar las células que hayan incorporado el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión y, después, realizar una etapa de selección usando un medio de cultivo selectivo que comprenda una concentración limitante de folato y un inhibidor del segundo marcador de selección, tal como, por ejemplo, MTX cuando se use DHFR como segundo marcador de selección.

De acuerdo con una realización, se realiza una selección basada en citometría de flujo en la fase (b). Una etapa de selección que emplee citometría de flujo, en particular clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), tiene la ventaja de que pueden cribarse grandes números de células rápidamente para el rendimiento de expresión característico deseado.

De acuerdo con una realización, dicha selección basada en citometría de flujo se realiza además de, preferiblemente después de, realizar una o más etapas de selección frente a uno o más genes marcadores de selección. De este modo, pueden identificarse clones celulares de alta expresión en la población de células transfectadas satisfactoriamente y separarse.

De acuerdo con una realización, las células de alta expresión se identifican por detección de la expresión de un polipéptido indicador coexpresado tal como, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), CFP, YFP, luciferasa u otro polipéptido indicador común que pueda detectarse por citometría de flujo. De acuerdo con esta realización, la fase (a) comprende proporcionar una pluralidad de células hospedadoras que comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un indicador y la fase (b) comprende identificar las células hospedadoras que comprenden el indicador basándose en al menos una característica de dicho polipéptido indicador usando citometría de flujo. En dicha selección basada en indicador, la expresión del gen indicador se correlaciona con la expresión del producto de interés. El polipéptido indicador puede estar ubicado de forma intracelular, marcando de este modo la célula de expresión. De acuerdo con una realización, la expresión del polipéptido indicador está muy ligada a la expresión del producto de interés que es un polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido indicador y el polipéptido de interés pueden expresarse como polipéptidos diferentes, pero a partir del mismo casete de expresión, sin embargo, separados por un elemento IRES (sitio de entrada interno al ribosoma). Además, el polipéptido indicador y el polipéptido de interés pueden expresarse como proteína de fusión. De acuerdo con una realización, en el casete de expresión para expresar el polipéptido de interés, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés está separado por al menos un codón de parada del polinucleótido que codifica el indicador. Una proteína de fusión que comprenda el polipéptido indicador se expresa

únicamente si la traducción pasa sobre el codón de parada. Como la ultralectura del codón de parada se produce únicamente a un determinado grado, que puede verse influido por el número y diseño del codón de parada y las condiciones de cultivo, se produce una determinada proporción del polipéptido de interés como proteína de fusión que comprende el polipéptido indicador que puede detectarse por citometría de flujo. Usar una estrategia respectiva permite ligar estrechamente la expresión del polipéptido indicador a la expresión del polipéptido de interés. El principio de obtención de proteínas de fusión por ultralectura del codón de parada también se explicará posteriormente junto con una realización en la que se presenta una proteína de fusión (que no comprende necesariamente un indicador) en la superficie celular y, por ejemplo, se tñe usando un compuesto de detección. Para expresar un polipéptido secretado de interés, se puede incluir adicionalmente un polinucleótido que codifique un anclaje de membrana entre el codón de parada y el polinucleótido que codifica el indicador o en dirección 3' del polinucleótido que codifica el indicador. El anclaje de membrana asegura que el polipéptido indicador permanece asociado con la célula de expresión. De este modo, el polipéptido indicador comprendido en la proteína de fusión proporciona a las células de expresión un rasgo que se puede seleccionar por citometría de flujo. El polipéptido de interés se expresa en el medio de cultivo. Cuanto mayor sea, por ejemplo, la fluorescencia del polipéptido indicador, más proteína de fusión se producirá y, por consiguiente, mayor será la tasa de expresión del polipéptido de interés. Se divulga un método respectivo, por ejemplo, en el documento WO 03/014361 al que se refiere.

De acuerdo con una realización, la fase (b) comprende:

- (i) realizar al menos una selección en condiciones selectivas para uno o más marcadores de selección expresados por las células hospedadoras transfectadas; y
- (ii) realizar una selección basada en citometría de flujo.

Opcionalmente, pueden realizarse una o más etapas de selección adicionales antes o después de la etapa (i) y/o etapa (ii).

De acuerdo con una realización, la selección basada en citometría de flujo comprende seleccionar una pluralidad de células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés con un rendimiento deseado basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de interés. Preferiblemente, el polipéptido de interés es un polipéptido secretado. De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés se detecta en la superficie celular usando un compuesto de detección que se une al polipéptido de interés. De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés secretado se detecta mientras pasa la membrana celular y, por consiguiente, se asocia de forma transitoria con la membrana plasmática durante la secreción del polipéptido. Se divulga un sistema de selección basado en citometría de flujo respectivo, por ejemplo, en el documento WO 03/099996 al que se refiere.

De acuerdo con una realización, una parte del polipéptido de interés se expresa fusionado a un anclaje de membrana y, por tanto, se expresa como polipéptido de fusión unido a membrana. De este modo, una parte del polipéptido se presenta como polipéptido de fusión en la superficie celular y puede teñirse usando un compuesto de detección. No se requiere polipéptido indicador para este tipo de selección aunque puede usarse adicionalmente. Debido a la presencia del anclaje de membrana, el polipéptido de interés se ancla estrechamente a la célula de expresión. Como la cantidad de polipéptido de fusión producido se correlaciona con la tasa de expresión global de la célula de expresión, las células hospedadoras pueden seleccionarse mediante citometría de flujo basada en la cantidad de polipéptido de fusión presentado mediante el anclaje de membrana en la superficie celular. Esto permite una rápida selección de células hospedadoras de alta producción. Para permitir una selección eficaz usando citometría de flujo, preferiblemente usando FACS, es ventajoso usar diseños especiales de casetes de expresión para expresar el polipéptido de interés. Por tanto, de acuerdo con una realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés está comprendido en un casete de expresión que está diseñado de modo que una parte del polipéptido de interés expresado comprende un anclaje de membrana. El polipéptido de interés que se fusiona a un anclaje de membrana también se denomina polipéptido de fusión o proteína de fusión. Existen varias opciones para conseguir ese resultado.

De acuerdo con una realización, las células hospedadoras proporcionadas en la fase (a) comprenden

- (i) un casete de expresión heterólogo que comprende
 - aa) el polinucleótido que codifica un polipéptido de interés,
 - bb) al menos un codón de parada en dirección 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés, y
 - cc) un polinucleótido adicional en dirección 3' del codón de parada que codifica un anclaje de membrana y/o una señal para un anclaje de membrana;

y

- (ii) al menos un casete de expresión heterólogo que comprende un polinucleótido que codifica un marcador de selección;

y la selección en la fase (b) comprende

- (i) cultivar dichas células hospedadoras en condiciones selectivas para el al menos un marcador de selección y que permite la expresión del polipéptido de interés en el que al menos una parte del polipéptido de interés se expresa como polipéptido de fusión que comprende un anclaje de membrana, en el que dicho polipéptido de fusión se presenta en la superficie de dicha célula hospedadora;

(ii) realizar una selección basada en citometría de flujo, que comprende seleccionar una pluralidad de células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés con un rendimiento deseado basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado en la superficie celular usando citometría de flujo.

- 5 La transcripción del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés comprendido en el casete de expresión descrito anteriormente produce un transcrito que comprende, en orden consecutivo, al menos
 aa) un polinucleótido, en el que la traducción de dicho polinucleótido produce el polipéptido de interés;
 bb) al menos un codón de parada en dirección 3' de dicho polinucleótido;
 10 cc) un polinucleótido en dirección 3' de dicho codón de parada, que codifica un anclaje de membrana y/o una señal para un anclaje de membrana.

Al menos una parte del transcrito se traduce en un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés y el anclaje de membrana mediante ultralectura de traducción del al menos un codón de parada. Este diseño del casete de expresión que se usa en esta realización tiene el efecto de que, a través de procesos de ultralectura de traducción (el codón de parada es "permeable"), se produce una parte definida del polipéptido de interés como polipéptido de fusión que comprende un anclaje de membrana. Por tanto, al menos una parte del transcrito se traduce en un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés y el anclaje de membrana mediante ultralectura de traducción del al menos un codón de parada. La ultralectura de traducción puede producirse de forma natural debido a la elección del codón de parada/diseño de la señal de terminación de la traducción o puede inducirse adaptando las condiciones de cultivo, por ejemplo, usando un agente de supresión de la terminación. Este nivel de ultralectura produce una determinada proporción de polipéptidos de fusión. Estos polipéptidos de fusión comprenden un anclaje de membrana, que anclan estrechamente los polipéptidos de fusión a la superficie celular. Como resultado, el polipéptido de fusión se está presentando en la superficie celular y las células que presentan altos niveles de polipéptido de fusión anclado a membrana pueden seleccionarse por citometría de flujo, preferiblemente por FACS. De este modo, se seleccionan células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés con alto rendimiento. Se describen detalles y realizaciones preferidas de esta tecnología basada en ultralectura del codón de parada en los documentos WO 2005/073375 y WO 2010/022961 y se refiere a esta divulgación para los detalles.

De acuerdo con una realización, el casete de expresión comprende adicionalmente iv) un polinucleótido que codifica un polipéptido indicador, tal como, por ejemplo, GFP. Dicho polinucleótido que codifica el polipéptido indicador está ubicado en dirección 3' del codón de parada. Tras la ultralectura del codón de parada se obtiene un polipéptido de fusión que comprende el indicador, permitiendo de ese modo la selección por citometría de flujo basándose en las características del polipéptido indicador tales como, por ejemplo, su fluorescencia. Los detalles de dicha realización ya se describen anteriormente y se refieren a la divulgación anterior. Preferiblemente, el polinucleótido que codifica el polipéptido indicador está ubicado en dirección 3' del polinucleótido que codifica un anclaje de membrana.

De acuerdo con una realización alternativa, se expresa una parte del polipéptido de interés como polipéptido de fusión presentado en superficie celular usando la tecnología descrita en el documento WO 2007/131774. Aquí, a través de la transcripción y el procesamiento del transcrito se obtienen al menos dos ARNm maduros diferentes (ARNm-polipéptido de interés) y (ARNm-polipéptido de interés-anclaje) a partir del casete de expresión que codifica el polipéptido de interés. La traducción del ARNm-polipéptido de interés produce el polipéptido de interés. La traducción del ARNm-polipéptido de interés-anclaje produce un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés y un anclaje de membrana. Como resultado, este polipéptido de fusión se presenta de nuevo en la superficie celular y las células que presentan altos niveles de polipéptido de fusión anclado a membrana pueden seleccionarse por citometría de flujo, preferiblemente FACS. De este modo, de nuevo pueden seleccionarse células hospedadoras que tienen una alta tasa de expresión. De acuerdo con una realización, el casete de expresión comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica un polipéptido indicador, tal como, por ejemplo, GFP. Dicho polinucleótido que codifica el polipéptido indicador está ubicado en dirección 3' del intrón. De este modo, se obtiene un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido indicador, permitiendo de ese modo la selección por citometría de flujo basándose en las características del polipéptido indicador tales como, por ejemplo, su fluorescencia. Preferiblemente, el polinucleótido que codifica el polipéptido indicador está ubicado en dirección 3' del polinucleótido que codifica un anclaje de membrana. De este modo, el indicador está ubicado dentro de la célula hospedadora.

Ambas realizaciones ejemplares descritas anteriormente provocan que una parte del polipéptido de interés se exprese como polipéptido de fusión que se presenta en la superficie de las células hospedadoras, y las células que presentan altos niveles de polipéptidos de fusión anclados a membrana (lo que indica un alto nivel de polipéptido secretado) pueden seleccionarse, por ejemplo, por citometría de flujo, en particular por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Aquí, están disponibles diferentes realizaciones. Por ejemplo, si un polipéptido indicador está comprendido en el polipéptido de fusión, pueden seleccionarse células hospedadoras de alta expresión basándose en una característica del polipéptido indicador, por ejemplo, su fluorescencia. Además, pueden usarse compuestos de detección marcados apropiadamente como se describirá resumidamente a continuación.

De acuerdo con una realización, la fase b) comprende seleccionar una pluralidad de células hospedadoras eucariotas que expresan el polipéptido de interés con un rendimiento deseado basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado en la superficie celular usando citometría de flujo, poniendo en contacto las células

hospedadoras con un compuesto de detección que se une al polipéptido de fusión presentado en la superficie celular y seleccionando una pluralidad de células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés con un rendimiento deseado basándose en la presencia o cantidad del compuesto de detección unido usando citometría de flujo. Por tanto, las células pueden ponerse en contacto con un compuesto de detección marcado apropiadamente que se une a la proteína de fusión, por ejemplo, la parte correspondiente al polipéptido de interés. El compuesto de detección usado para la unión al polipéptido de fusión puede tener al menos una de las siguientes características: dicho compuesto puede marcarse, en particular marcarse de forma fluorescente, puede ser un antígeno, puede ser una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión de la misma o puede ser una proteína-A, G o L. El compuesto de detección usado para la unión del polipéptido de fusión en la superficie celular puede ser, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que reconoce el polipéptido de fusión. Básicamente todas las partes accesibles del polipéptido de fusión pueden detectarse, y por tanto también la parte correspondiente al polipéptido de interés que se secreta en paralelo con el polipéptido de fusión en forma soluble. Para permitir la detección y selección, dicho compuesto de detección usado para unirse al polipéptido de fusión puede marcarse. El compuesto de detección marcado que se une al polipéptido de fusión presentado en la superficie celular de esta marca, respectivamente tiñe la superficie celular. Cuando mayor es la cantidad de polipéptido de fusión que se expresa por la célula hospedadora, más compuesto de detección marcado está unido y más intensa es la tinción. Esto tiene la ventaja de que la selección basada en citometría de flujo de las células hospedadoras puede realizarse fácilmente ya que puede determinarse no solamente la presencia, sino también la cantidad del compuesto de detección unido. Para seleccionar células hospedadoras de alta producción, esas células hospedadoras pueden seleccionarse de la población de células hospedadoras que se marcan de la manera más eficaz, respectivamente de la manera más intensa por el compuesto de detección. El marcador es adecuado para selección basada en citometría de flujo, en particular selección por FACS. Se prefiere un marcador fluorescente ya que esto permite una fácil detección por citometría de flujo.

De acuerdo con una realización, el casete de expresión se construye de modo que se obtenga aproximadamente $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ o menos de $\leq 0,5\%$ polipéptido de fusión. La parte restante se produce como la forma polipeptídica secretada que no comprende el anclaje de membrana.

El anclaje de membrana puede ser de cualquier tipo siempre que posibilite el anclaje del polipéptido de interés a la membrana celular y, por tanto, permite la presentación del polipéptido de fusión sobre la superficie celular. Las realizaciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, un anclaje de GPI o un anclaje transmembranario. Se prefiere un anclaje transmembranario para asegurar una unión fuerte del polipéptido de fusión a la superficie celular y para evitar el desprendimiento de la proteína de fusión. Es particularmente preferido, en particular cuando se expresan anticuerpos como polipéptido de interés, el uso de un anclaje transmembranario de inmunoglobulina. Se describen otros anclajes de membrana y realizaciones preferidas de un anclaje transmembranario de inmunoglobulina en los documentos WO 2007/131774, WO 2005/073375 y WO 2010/022961.

De acuerdo con una realización, las células hospedadoras expresan una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo como polipéptido de interés. El polinucleótido que codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina y el polinucleótido que codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión o, preferiblemente, están comprendidos en casetes de expresión diferentes como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto. Cuando se usa un diseño de casete de expresión como se describe anteriormente, en el que una parte del polipéptido de interés se produce como un polipéptido de fusión anclado a membrana por ultralectura de traducción o ayuste alternativo, dicho diseño se usa para expresar la cadena pesada del anticuerpo.

De acuerdo con una realización, pueden realizarse dos o más ciclos de selección basada en citometría de flujo en la fase (b) para seleccionar y enriquecer las células hospedadoras de alta expresión.

En una realización, las células hospedadoras que expresan una alta cantidad de polipéptido de interés que, por consiguiente, presentan una alta señal, se clasifican usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). La clasificación por FACS es ventajosa, ya que permite el rápido cribado de grandes cantidades de células hospedadoras para identificar y enriquecer aquellas células que expresen el polipéptido de interés con un alto rendimiento. Esta realización es particularmente adecuada si las células se seleccionan basándose en la expresión de una proteína de fusión como se describe anteriormente. Esas células, que muestran el índice de fluorescencia más alto pueden identificarse y aislarse por FACS. Se encuentra una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la fluorescencia, determinada por FACS, y la cantidad de polipéptido producido. Por lo tanto, puede usarse clasificación por FACS no solamente para un análisis cualitativo para identificar células que expresen un polipéptido de interés en general, sino que puede usarse realmente de manera cuantitativa para identificar aquellas células hospedadoras que expresan altos niveles del polipéptido de interés. De este modo, pueden seleccionarse/enriquecerse las mejores células productoras en la fase (b).

De acuerdo con una realización, las células que expresan el polipéptido de interés con el rendimiento deseado, por ejemplo, por encima de un determinado umbral y/o el mejor 15 %, mejor 10 %, mejor 5 % o el mejor 2 % de las células hospedadoras, se seleccionan como combinación. Por ejemplo, pueden seleccionarse varias células de alta

expresión, por ejemplo, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 500, al menos 1000 o al menos 5000 células de alta expresión en la fase (b) y clasificarse en una combinación celular. Esta combinación celular que comprende una pluralidad de diferentes células de alta expresión también se denomina combinación celular de alta expresión. Dicha combinación celular que comprende diferentes células de alta expresión individuales puede usarse entonces para obtener clones celulares individuales para producción a gran escala del polipéptido de interés. Como se muestra por los ejemplos, usa las células hospedadoras de mamífero de la invención en las que la expresión del gen C12orf35 está reducida o eliminada proporciona, después de la selección frente a uno o más marcadores de selección y clasificación por FACS, una combinación celular con características ventajosas. Por ejemplo, los perfiles de FACS determinados muestran que dichas combinaciones celulares de alta expresión a menudo tienen un perfil de FACS que se parece mucho al de células que se obtuvieron de un clon celular. La reducción o eliminación de la expresión del gen C12orf35 proporciona, después de la transfección y selección, como se describe, células hospedadoras que expresan de forma bastante uniforme el producto de interés con alto rendimiento. Esto da lugar a una reducción significativa de clones de baja producción o no productores en la población celular seleccionada. Además, estas combinaciones celulares también pueden usarse directamente para producir el polipéptido de interés, por ejemplo, con fines analíticos o si se necesitan cantidades más pequeñas, ya que se consiguen valores cuantitativos de combinación significativamente mayores cuando se usan las células eucariotas novedosas de acuerdo con la invención. Sin embargo, se descubrió que incluso sin selección por FACS para enriquecer combinaciones celulares de alta expresión, podrían generarse poblaciones celulares con comportamiento de tipo clonal en un tiempo muy corto cuando se usan las líneas celulares de la presente divulgación. Esta es una ventaja importante, por ejemplo, si tiene que producirse rápidamente un polipéptido de interés. Las combinaciones obtenidas fueron adecuadas con fines de producción. Otra ventaja es que también se reducen los tiempos de selección.

De acuerdo con una realización, las células eucariotas proporcionadas en la fase (a) son células de mamífero, preferiblemente células de roedor, más preferiblemente células de hámster tales como células CHO. Anteriormente se describen realizaciones preferidas y adecuadas en relación con el primer aspecto y se refiere a la divulgación anterior. Como se describe anteriormente, de acuerdo con una realización, dichas células CHO han perdido parte de la región telomérica del cromosoma 8, en las que dicha parte perdida comprende el gen C12orf35. También se describen anteriormente realizaciones alternativas. Es particularmente ventajosa la realización en la que dicha parte perdida comprende adicionalmente el gen FAM60A. Estas células tienen características particularmente favorables con respecto al rendimiento y la estabilidad. De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el segundo aspecto comprende como etapa analizar si la expresión del gen C12orf35 se reduce o elimina. Dicho análisis puede realizarse después de la selección, en particular selección por DHFR. Ya se han descrito anteriormente los detalles de dicho método analítico en relación con el primer aspecto de la presente divulgación y también se describen a continuación en relación con el método de acuerdo con el quinto aspecto y se refiere a la divulgación respectiva.

Anteriormente se describen en detalle realizaciones preferidas adicionales en particular con respecto a las células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto, que son preferiblemente células de mamífero, el vector de expresión o combinación de vectores de expresión. Se hace referencia a la divulgación anterior.

Las células obtenidas como resultado del método de selección de acuerdo con el segundo aspecto pueden aislarse y cultivarse como células individuales. Sin embargo, también es posible usar una población enriquecida de diferentes células hospedadoras, es decir una combinación celular, en el proceso posterior. Las células hospedadoras obtenidas también se pueden someter a análisis cuantitativo o cualitativo adicional, o se pueden usar, por ejemplo, en el desarrollo de una línea celular clonal para la producción de proteínas. Una línea celular clonal puede establecerse a partir de una célula hospedadora seleccionada que expresa de forma estable el producto de interés con alto rendimiento.

Por tanto, de acuerdo con una realización, las células seleccionadas se cultivan para proporcionar clones celulares, en particular en forma de cultivos celulares clonales. Un cultivo celular clonal es un cultivo celular derivado de una única célula ancestral. En un cultivo celular clonal, todas las células son clones unas de las otras. Preferiblemente, todas las células en un cultivo celular contienen la misma o sustancialmente la misma información genética. En determinadas realizaciones, se determina la cantidad o concentración del polipéptido de interés en el cultivo celular para determinar la productividad. Por ejemplo, se puede cuantificar el valor cuantitativo analizando el sobrenadante del cultivo. De acuerdo con una realización, después de determinar el comportamiento de productividad de cada clon individual, se hace una clasificación del valor cuantitativo para seleccionar los mejores clones productores como clones de producción. Además, se puede llevar a cabo un estudio de estabilidad con los clones celulares obtenidos. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos, usar las células eucariotas novedosas descritas en este documento como células hospedadoras y en particular células CHO que han perdido una parte de la región telomérica del cromosoma 8 que comprende el gen C12orf35 y el gen FAM60A proporciona, después de la selección, clones celulares recombinantes que muestran una estabilidad significativamente mejorada. Por tanto, las pérdidas de estabilidad de la expresión son infrecuentes con las células hospedadoras respectivas y, además, si sucede, a menudo únicamente provoca una disminución menos drástica en la productividad en comparación con cuando se usan células en las que la expresión funcional del gen C12orf35 y FAM60A no está reducida o eliminada. Por lo tanto, en realizaciones, en particular aquellas en las que el efecto de C12orf35 y FAM60A está alterado, por ejemplo, porque se ha perdido al

menos una parte de la región telomérica que comprende el gen C12orf35 y el gen FAM60A, los análisis de estabilidad pueden acortarse o incluso omitirse, lo que es una ventaja importante ya que de nuevo acorta el tiempo que se necesita para obtener clones celulares de expresión estable que puedan usarse para producción a gran escala del producto de interés.

5 **C. Método para producir un producto de interés**

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un método para producir un producto recombinante de interés, que comprende usar una célula eucariota de acuerdo con el primer aspecto como célula hospedadora para la expresión recombinante de un producto de interés.

10 Como se describe anteriormente, las células eucariotas novedosas proporcionadas en este documento son particularmente adecuadas como células hospedadoras de producción para producir de forma recombinante un producto de interés tal como un polipéptido de interés. Se describen en detalle anteriormente ejemplos adecuados y preferidos de dicha célula eucariota, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula se altera, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35, así como ejemplos adecuados y preferidos del producto de interés y se refiere a la divulgación anterior que también se aplica aquí. Como se describe anteriormente, la célula eucariota preferiblemente es una célula de vertebrado, más preferiblemente una célula de mamífero. Es particularmente ventajosa la realización en la que, además de C12orf35, se altera el efecto de FAM60A en dicha célula, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A ya que se descubrió que, de ese modo, la estabilidad de la expresión puede mejorarse significativamente. La abundancia de los clones de expresión estable aumenta. Alterando el efecto de la proteína FAM60A, así como de la proteína C12orf35, pueden proporcionarse células hospedadoras eucariotas, preferiblemente células hospedadoras de mamífero, que muestran características mejoradas con respecto a ambos rasgos, estabilidad a largo plazo, así como rendimiento de producción y, por tanto, rasgos clave importantes para la producción a gran escala de un producto de interés, en particular un polipéptido de interés.

20 De acuerdo con una realización, el método comprende introducir en dicha célula eucariota un polinucleótido que codifica un producto de interés y seleccionar una célula hospedadora que expresa el producto de interés. La introducción puede conseguirse por transfección como se describe anteriormente. La selección puede producirse usando el método de acuerdo con el segundo aspecto. Preferiblemente, se seleccionan células hospedadoras en las que el polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés se integra de forma estable en el genoma de la célula hospedadora.

De acuerdo con una realización, el método comprende

- 35 (a) cultivar células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto, que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con el método de acuerdo con el segundo aspecto en condiciones que permiten la expresión del producto de interés;
- (b) aislar el producto de interés de dicho medio de cultivo celular y/o de dichas células hospedadoras; y
- (c) opcionalmente procesar el producto de interés aislado.

40 De acuerdo con una realización, dichas células hospedadoras se cultivan en condiciones sin suero. El producto de interés expresado puede obtenerse alterando las células hospedadoras. Preferiblemente, el producto de interés es un polipéptido. El polipéptido preferiblemente se expresa, por ejemplo, se secreta, en el medio de cultivo y puede obtenerse del mismo. Para este fin, se proporciona un péptido líder apropiado en el polipéptido de interés. Las secuencias líder y diseños de casete de expresión para conseguir la secreción son bien conocidos en la técnica anterior. También es posible una combinación de los métodos respectivos. De este modo, pueden producirse polipéptidos tales como proteínas y obtenerse/aislarse de forma eficaz con alto rendimiento.

50 El producto de interés que es preferiblemente un polipéptido de interés que se produce puede recuperarse, purificarse adicionalmente, aislarse, procesarse y/o modificarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción o precipitación. Pueden realizarse etapas de procesamiento adicionales, tales como etapas de purificación, mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o extracción. Además, el polipéptido de interés aislado y purificado puede procesarse adicionalmente, tal como, por ejemplo, formularse, en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica.

60 **D. Método para producir una línea celular eucariota**

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un método para producir una célula eucariota adecuada para producción recombinante de un producto de interés, que comprende alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula. Se describen anteriormente realizaciones adecuadas y preferidas para conseguir el resultado en relación con las células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto y se refiere a la divulgación anterior que también se aplica aquí. En lo sucesivo se describirán resumidamente de nuevo realizaciones no limitantes.

De acuerdo con una realización, el método comprende reducir o eliminar la expresión funcional del gen C12orf35, alterando de este modo el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula. Anteriormente se describen maneras adecuadas en relación con las células eucariotas de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación y se refiere a ello. De acuerdo con una realización, el genoma de la célula eucariota se altera para reducir o eliminar la expresión funcional del gen C12orf35. Por ejemplo, puede introducirse una supresión génica en el gen C12orf35. De acuerdo con una realización, dicha supresión génica se introduce en todas las copias del gen C12orf35. De acuerdo con una realización, el gen C12orf35 se elimina. Todas las copias del gen C12orf35 pueden eliminarse en el genoma. De acuerdo con una realización, el método comprende eliminar una parte de un cromosoma, en la que la parte eliminada comprende el gen C12orf35. La parte eliminada puede corresponder a una región telomérica. Dicha eliminación puede inducirse, por ejemplo, usando un agente que induce roturas del cromosoma. Aquí, las células pueden tratarse repetidamente con dicho agente para obtener células en que la expresión funcional del gen C12orf35 está reducida o eliminada, por ejemplo, porque todas las copias de dicho gen se eliminan debido a roturas inducidas en el cromosoma.

De acuerdo con una realización, la célula eucariota es una célula metazoica, preferiblemente una célula de vertebrado, más preferida, una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, la célula de mamífero es una célula de roedor. Preferiblemente, la célula de roedor es una célula de hámster tal como una célula CHO, por ejemplo, una célula CHO derivada de CHO-K1. De acuerdo con una realización, el método comprende eliminar al menos una parte de la región telomérica del cromosoma 8 en una célula de hámster, en el que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35. Como se muestra por los ejemplos, las células CHO que comprenden una eliminación respectiva en la región telomérica del cromosoma 8, aquí el brazo q, tienen características de expresión particularmente favorables y, por tanto, son particularmente adecuadas como células hospedadoras para producción recombinante. De acuerdo con una realización, la región telomérica eliminada comprende el gen C12orf35 y uno o más o todos los genes seleccionados del grupo que consiste en Bcd1, Amn1, proteína 20 de tipo metiltransferasa, Dennd5b, FAM60A, Caprina2, lpo8 y RPS4Y2. De acuerdo con una realización, la región eliminada comprende adicionalmente al menos una parte o la totalidad del gen Tmtc1. De acuerdo con una realización, el método comprende eliminar al menos una parte respectiva de la región telomérica en ambos cromosomas del par de cromosomas 8. También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente y las proteínas codificadas en la tabla 1 anterior y están englobados, así como los homólogos y ortólogos, por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales y/o proteínas codificadas.

Como se describe anteriormente, la región telomérica del cromosoma 6 en ratón corresponde a la región telomérica del cromosoma 8 en hámster chino. Por tanto, la divulgación anterior con respecto a la región telomérica del cromosoma 8 de hámster se aplica consecuentemente a la región telomérica del cromosoma 6 en ratón.

De acuerdo con una realización, el método comprende causar una rotura del cromosoma en la región telomérica del cromosoma 8 del genoma de hámster (o cromosoma 6 del genoma de ratón), en el que el punto de rotura en el cromosoma 8 (o cromosoma 6 del genoma de ratón) está ubicado centromérico del gen de la proteína 20 de tipo metiltransferasa (denominado 4833442J19Rik en ratón), centromérico del gen Dennd5b, centromérico del gen FAM60A, centromérico del gen Caprina2, centromérico del gen lpo8 o centromérico del gen RPS4Y2. De este modo, se eliminan todos los genes que están presentes teloméricos del mismo, es decir que están lejos en la dirección del extremo telomérico. También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente en la tabla 1 anterior y los genes respectivos y proteínas codificadas están englobados por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales. De acuerdo con una realización, las células obtenidas que comprenden una rotura del cromosoma en la región telomérica tienen una o más de las siguientes características:

- a) el punto de rotura está ubicado centromérico del gen lpo8;
- b) el punto de rotura está ubicado dentro del gen Tmtc1.

Como se analiza anteriormente, todos los genes que están ubicados teloméricos del punto de rotura, es decir lejos en la dirección del extremo telomérico, están comprendidos en la región eliminada. Esta incluye el gen C12orf35. Anteriormente se describen métodos para identificar células eucariotas respectivas que tienen dicho punto de rotura y también se describen a continuación en relación con el quinto aspecto de la presente divulgación. De acuerdo con una realización, el gen Ergic2 no se elimina.

De acuerdo con una realización, una célula CHO, preferiblemente derivada de la línea celular K1, se usa para producir una línea celular eucariota en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35. De acuerdo con una realización, se elimina una región telomérica en el brazo q del cromosoma 8 que comprende el gen C12orf35. Los detalles sobre la manera de conseguir ese resultado son conocidos por los expertos en la materia y también se describen realizaciones adecuadas en este documento y se refiere a la divulgación respectiva. Es particularmente ventajosa la realización en la que, adicionalmente, se altera el efecto de FAM60A en dicha célula, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A ya que se descubrió que, de ese modo, la estabilidad de la expresión puede

mejorarse significativamente. Los detalles se explican anteriormente y se refieren a la divulgación anterior. Las células hospedadoras de mamífero que se alteran de modo que el efecto tanto de C12orf35 como de FAM60A se altere en dichas células tienen características de expresión particularmente favorables. De este modo, se proporcionan células hospedadoras de mamífero, que muestran características mejoradas con respecto a ambos rasgos, estabilidad a largo plazo, así como rendimiento de producción y, por tanto, rasgos clave importantes para la producción a gran escala de un producto de interés, en particular un polipéptido de interés.

De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el cuarto aspecto comprende introducir en la célula eucariota en que la expresión del gen C12orf35 está reducida o eliminada, al menos un polinucleótido que codifica un producto de interés y preferiblemente al menos un polinucleótido que codifica un marcador de selección. De acuerdo con una realización, el polinucleótido que codifica un producto de interés y el polinucleótido que codifica un marcador de selección están ubicados en el mismo vector de expresión o en diferentes. Los vectores de expresión pueden introducirse por transfección, siendo preferida la transfección estable. También se describen anteriormente realizaciones adecuadas y preferidas y se refiere a la divulgación respectiva que también se aplica aquí. Las células hospedadoras que se transfectoron satisfactoriamente y expresan el producto de interés pueden seleccionarse usando el método de acuerdo con el segundo aspecto. Se hace referencia a la divulgación anterior.

E. Método para analizar células eucariotas

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método para analizar células eucariotas para su idoneidad como células hospedadoras para expresión recombinante de un producto de interés, que comprende analizar directamente o indirectamente si el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dichas células. Como se describe anteriormente, la célula eucariota es preferiblemente una célula de mamífero.

Este método analítico puede usarse ventajosamente, por ejemplo, en combinación con el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente divulgación para identificar si se produjo una célula eucariota en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula. Además, dicho método puede usarse para discriminar entre clones de alta y baja producción. Además, en realizaciones, este método puede usarse adicionalmente para discriminar entre clones estable o inestables durante el proceso de selección/cribado. Usando este método analítico, pueden identificarse clones al inicio del proceso de selección, que tienen características de expresión favorables. Esto aumenta la probabilidad de seleccionar clones de producción estable y alta, produciendo una proporción mayor de clones de producción alta y estable. Por lo tanto, este método analítico tiene aplicaciones importantes y proporciona una mejora adicional de tecnologías de expresión recombinante.

De acuerdo con una realización preferida, el método comprende analizar si la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina en dichas células. El análisis de si la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina puede realizarse directa o indirectamente. En lo sucesivo se describen realizaciones no limitantes. Que el método analítico sea adecuado también depende de la manera en que se alteran las células para conseguir la reducción o eliminación de la expresión funcional del gen endógeno C12orf35.

Por ejemplo, cuando se introduce una supresión génica en el gen C12orf35 para reducir o eliminar la expresión del gen C12orf35, se puede amplificar la sección de ADN correspondiente y secuenciar el ADN amplificado para confirmar que se introdujo la supresión génica en el gen C12orf35. Si la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina por eliminación completa o parcial de dicho gen, se puede detectar la eliminación a nivel de ADN, por ejemplo, usando métodos de detección adecuados basados en amplificación para detectar la eliminación (dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia).

De acuerdo con una realización, el perfil de expresión de las células eucariotas se analiza para determinar si la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina. Por ejemplo, el análisis puede comprender la realización de una PCR con RT (transcripción inversa) cualitativa o cuantitativa para detectar la presencia, ausencia, cantidad o longitud del ARNm de C12orf35. Este sería un ejemplo de un análisis directo, ya que el análisis implica directamente el transcrito del gen C12orf35. Los análisis indirectos, en los que el estado de expresión del gen C12orf35 se determina indirectamente analizando el perfil de expresión de genes diferentes del gen C12orf35 y en los que, por consiguiente, el análisis no implica directamente el análisis del gen C12orf35 o su transcrito, también son adecuados y, por tanto, están englobados por la expresión "analizar si la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina". Dicho análisis indirecto es adecuado, por ejemplo, si se elimina una parte cromosómica que comprende el gen C12orf35 (y otros genes) por rotura del cromosoma y se describirá posteriormente. Para un análisis cuantitativo, puede realizarse una comparación con una referencia (por ejemplo, células correspondiente inalterada).

De acuerdo con una realización, adicionalmente se analiza directa o indirectamente si el efecto de la proteína FAM60A está alterado en dichas células. Esto puede analizarse determinando si la expresión funcional del gen FAM60A endógeno se reduce o elimina en dichas células. Este análisis puede realizarse *mutatis mutandis* como se describió para el gen C12orf35. Se hace referencia al análisis anterior.

De acuerdo con una realización, antes del análisis, las células se tratan con un agente que induce roturas en el cromosoma para eliminar una parte del cromosoma que comprende el gen C12orf35. Como se describe anteriormente,

5 todas las copias del gen C12orf35 podían eliminarse de este modo. El análisis puede comprender, entonces, analizar si el tratamiento con dicho agente provocaba una eliminación de una parte de un cromosoma que incluye el gen C12orf35. Las células se tratan con un agente que induce rotura del cromosoma en una concentración apropiada de modo que se produzca la rotura del cromosoma. Aquí, también pueden realizarse varias rondas de tratamiento. La rotura del cromosoma puede inducirse durante el proceso de selección si la selección implica el uso de un agente que induce roturas del cromosoma en una concentración suficientemente alta. Un ejemplo no limitante de un agente adecuado es, por ejemplo, MTX. En este caso, las células pueden comprender un polinucleótido heterólogo que codifica DHFR como marcador de selección para que pueda sobrevivir al tratamiento con MTX. Sin embargo, como se analiza anteriormente, también pueden usarse otros agentes tales como, por ejemplo, higromicina y esto se confirmó mediante ejemplos.

15 Después de tratar las células para inducir roturas del cromosoma, las células obtenidas pueden analizarse usando el método de acuerdo con el quinto aspecto para determinar si el tratamiento con dicho agente provocaba una eliminación de una parte de un cromosoma que incluye el gen C12orf35. Diferentes realizaciones son adecuadas para ese fin. De acuerdo con una realización, se analiza el perfil de expresión de las células tratadas. Por ejemplo, puede analizarse si el gen C12orf35 o uno o más genes ubicados centroméricos del gen C12orf35 (es decir, lejos del extremo telomérico en el cromosoma) se expresan. Por ejemplo, en el caso de células de ratón o hámster chino, puede analizarse si el gen C12orf35 se expresa y, por consiguiente, si puede detectarse su ARNm (ejemplo de un análisis directo) y como alternativa o además de ello, puede analizarse si uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en proteína 20 de tipo metiltransferasa (denominado 4833442J19Rik en ratón), Dennd5b, FAM60A, Caprina2, Ipo8, Tmtc1 o genes que están ubicados teloméricos de los genes mencionados anteriormente se expresan por la célula (ejemplo de análisis indirecto). También se indican nombres alternativos no limitantes de los genes individuales mencionados anteriormente en la tabla 1 anterior y los genes respectivos están englobados por el alcance de los términos usados anteriormente para los genes individuales y productos codificados. Si el punto de rotura inducido está ubicado centromérico del uno o más genes respectivos, dichos genes se eliminan, lo que elimina o reduce (si existen otras copias del gen en otra parte que se expresan) su expresión. Como es evidente de la figura 1, el gen C12orf35 está ubicado telomérico de los genes mencionados anteriormente. Por tanto, si los genes mencionados anteriormente se eliminan, la región eliminada también incluye el gen C12orf35. Por tanto, los genes anteriores pueden usarse de forma válida como marcadores para básicamente determinar indirectamente si la rotura del cromosoma inducida provocaba una eliminación del gen C12orf35 y, por tanto, provocaba una reducción o eliminación de la expresión del gen C12orf35. Por tanto, el análisis de si la expresión del gen C12orf35 se reducía o eliminaba no tiene que basarse necesariamente en un análisis directo de, por ejemplo, el ARNm de C12orf35 y dichos métodos indirectos también están englobados por el método del quinto aspecto. Además, se descubrió que aunque está ubicado telomérico del gen C12orf35 (es decir, lejos en la dirección del extremo telomérico), también el gen Bicd1 puede usarse como marcador para determinar si se indujo una rotura del cromosoma que provocaba una eliminación del gen C12orf35. Se descubrió, en relación con el análisis de células de hámster chino tales como células CHO, que si el gen Bicd1 se eliminaba a causa de una rotura del cromosoma, la región telomérica eliminada habitualmente también incluye C12orf35. Se confirmó, analizando las características de expresión de varios cientos de clones, que los genes mencionados anteriormente pueden usarse de forma válida como marcadores para discriminar clones celulares con características de expresión alta y estable de los clones celulares que tienen características de expresión baja e inestable. La expresión relativa de los genes mencionados anteriormente en células CHO se muestra en la figura 2.

45 De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el quinto aspecto es para analizar células de hámster, preferiblemente células CHO, y el método comprende analizar si la expresión del gen C12orf35 se reduce en dichas células analizando si la expresión de uno o más genes ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 y que se seleccionan del grupo que consiste en el gen Tmtc1 y genes ubicados teloméricos del gen Tmtc1 se reduce o elimina en dichas células. Como se describe anteriormente, las células respectivas que, después del tratamiento con el agente que introduce rotura en el cromosoma, ya no expresan el gen Tmtc1 y/o genes ubicados teloméricos del gen Tmtc1 habitualmente comprenden una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8 que comprende dichos genes y en particular comprende el gen C12orf35. Se pierde el material genético telomérico del punto de rotura.

55 De acuerdo con una realización, las células hospedadoras seleccionadas que tienen las características descritas anteriormente se transfectan con un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido que codifica un producto de interés y preferiblemente que comprende al menos un marcador de selección. Anteriormente se describen realizaciones adecuadas en relación con los otros aspectos y se refiere a la divulgación anterior.

60 De acuerdo con una realización, antes de realizar el análisis usando el método de acuerdo con el quinto aspecto, las células eucariotas se transfectan con al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés y al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección, y antes del análisis se realiza al menos una etapa de selección para identificar células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente. Anteriormente se describen en detalle realizaciones adecuadas. De acuerdo con una realización, la selección implica el uso de un agente de selección que induce roturas del cromosoma. En esta realización, el marcador de selección puede ser DHFR y el agente de selección puede ser MTX. Como alternativa, el agente de selección puede ser higromicina y el marcador de selección puede ser un gen que confiere resistencia a higromicina tal como, por ejemplo, el gen hph. En dichas aplicaciones, en las que el método se realiza durante o después del proceso de selección, el método de acuerdo

con el quinto aspecto puede usarse como herramienta analítica para identificar, dentro de la población celular seleccionada, dichas células en las que la expresión del gen C12orf35 está reducida o eliminada. Como se describe, dicha reducción o eliminación puede causarse o mantenerse por las condiciones de selección si, por ejemplo, se induce una rotura del cromosoma mediante la que se provoca una eliminación del gen C12orf35 y el método de acuerdo con el quinto aspecto permite identificar dichas células, por ejemplo, basándose en su perfil de expresión. Esto permite la identificación de dichas células o clones celulares que, a causa de su perfil de expresión, en particular debido a la expresión reducida o eliminada del gen C12orf35, son particularmente adecuados para establecer una línea celular de producción recombinante, ya que puede esperarse que la alta expresión del producto de interés permanezca estable. Como se describe, en el caso de células de hámster tales como células CHO en las que el gen FAM60A está ubicado en la región telomérica del cromosoma 8, se prefiere que las células hayan perdido la región telomérica del cromosoma 8, preferiblemente el brazo q, reduciendo o eliminando de ese modo la expresión del gen C12orf35. El método analítico puede realizarse después de generar clones celulares a partir de células comprendidas en la población de células de alta expresión. De acuerdo con una realización, se analiza una pluralidad de clones celulares para discriminar entre clones celulares estables e inestables y/o entre de alta y baja producción.

De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con el quinto aspecto comprende seleccionar al menos una célula en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado, preferiblemente por reducción o eliminación de la expresión funcional del gen C12orf35, para expresión recombinante de un producto de interés, preferiblemente un polipéptido de interés. Las células que tienen las características respectivas son particularmente adecuadas para expresión recombinante, como se muestra por los ejemplos. También se describen en detalle anteriormente realizaciones adicionales de células respectivas. Como se describe, se usan preferiblemente células de vertebrado tales como muy preferiblemente células de mamífero como células hospedadoras eucariotas.

F. Uso de células eucariotas alteradas para producción recombinante de un producto de interés

De acuerdo con un sexto aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una célula eucariota aislada para expresar de forma recombinante un producto de interés, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula. Los detalles con respecto a las células hospedadoras eucariotas respectivas y las realizaciones adecuadas para conseguir la alteración del efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dichas células, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35 se describieron en detalles anteriormente y se refiere a la divulgación anterior que también se aplica aquí. Se describen resumidamente realizaciones no limitantes a continuación.

Preferiblemente, una célula hospedadora eucariota de acuerdo con el primer aspecto se usa como células hospedadoras eucariotas. Dichas células se describen en detalle anteriormente y se refiere a la divulgación anterior. La célula eucariota puede seleccionarse de una célula metazoica, una de vertebrado o de mamífero. Preferiblemente, la célula eucariota es una célula de mamífero tal como una célula de roedor. Se prefieren células CHO. El genoma de la célula eucariota puede alterarse como se describe en detalle anteriormente para conseguir la alteración. De acuerdo con una realización, adicionalmente el efecto de la proteína FAM60A se altera en dicha célula, preferiblemente reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen endógeno FAM60A. Los detalles con respecto a esta realización y las ventajas asociadas se describieron en detalle anteriormente y se refiere a la divulgación anterior.

De acuerdo con una realización, el producto de interés es un polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido de interés se secreta tras la expresión en la célula eucariota al medio de cultivo celular. Los detalles con respecto al polipéptido de interés se describen anteriormente y se refiere a la divulgación respectiva. Para permitir la expresión del producto de interés, la célula hospedadora eucariota puede transfectarse de forma transitoria o, preferiblemente, de forma estable con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés. Los detalles se describen anteriormente y se refieren a la divulgación anterior.

Los intervalos numéricos descritos en este documento incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta divulgación, que se pueden leer haciendo referencia a la memoria descriptiva como un todo. De acuerdo con una realización, la materia en cuestión descrita en este documento que comprende determinados elementos también se refiere a la materia en cuestión que consiste en los elementos respectivos. En particular, los polinucleótidos descritos en este documento que comprenden determinadas secuencias también pueden consistir en las secuencias respectivas. Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en este documento y la materia en cuestión específica que surge de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos anterior n.º US 61/919313 presentada el 20 de diciembre de 2013.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: La reducción de la expresión génica de C12orf35 por interferencia de ARN (iARN) en células CHO aumenta el rendimiento de expresión

- 5 Para demostrar que reducir la expresión del gen C12orf35 provoca un aumento en la productividad volumétrica o específica, se diseñaron ARNip contra diferentes genes diana en la región telomérica del cromosoma 8 del genoma de hámster chino analizado (CHO-K1). Se diseñaron ARNip contra los siguientes genes diana enumerados en la tabla 2:

10 **Tabla 2:** ARNip contra diferentes genes diana

Gen diana	Con sentido	Antisentido
METTL20_1 (4833442J19Rik)	CCCUGAUGUUGUUAGAGGATT (SEQ ID NO: 23)	UCCUCUAACAACAUCAGGGTT (SEQ ID NO: 24)
C12orf35_1	CAUCCAGACAAAUCUACATT (SEQ ID NO: 25)	UGUAAGAUUUGUCUGGAUGTG (SEQ ID NO: 26)
C12orf35_2	CCAGAAAGAUAAAUCUACATT (SEQ ID NO: 27)	UGUAGAUUUUAUCUUUCUGGTA (SEQ ID NO: 28)
Caprin2_6	UGACCUGCCUGAAAGAAATT (SEQ ID NO: 29)	UUUCUUUCAGGGCAGGUCAGT (SEQ ID NO: 30)
FAM60A	GCUUCCAGCUCUACAGAATT (SEQ ID NO: 31)	UUCUGUUAGAGCUGGAAGCCA (SEQ ID NO: 32)
IPO8_1	GACCCGAACUUUGACCCUATT (SEQ ID NO: 33)	UAGGGUCAAGUUCGGGUCTG (SEQ ID NO: 34)
IPO8_2	CGGAGACUCUCAAUUGATT (SEQ ID NO: 35)	UCAAUUUGAAGAGUCUCCGGA (SEQ ID NO: 36)
IPO8_3	GCCUGAUUGAAGACGAGGATT (SEQ ID NO: 37)	UCCUCGUCUCAAUCAGGCTT (SEQ ID NO: 38)
Dennd5b_2	GGGUCUCCCUUAUUAAGATT (SEQ ID NO: 39)	UCUUGAAUAAGGGAGACCCTG (SEQ ID NO: 40)
Amn1_4	GCUGCUUAAGUAUUACUGATT (SEQ ID NO: 41)	UCAGUAAUACUUAAGCAGCCA (SEQ ID NO: 42)
TMTC1_1	GUUJACCUGUGAUAAACATT (SEQ ID NO: 43)	UGUUUUUACACAGGUUACAT (SEQ ID NO: 44)
TMTC1_2	CGGUGAAUGUCAUUCUACATT (SEQ ID NO: 45)	UGUAGAAUGACAUUCACCGCA (SEQ ID NO: 46)
ARNip de control negativo (sin efecto sobre la expresión; denominado ARNip de control)	ARNip de control negativo Silencer n.º 5 (50 µM) (Ambion, n.º cat. AM4642)	

Los ARNip usados se validaron usando RT-PCR en tiempo real para confirmar que reducen la expresión de los genes diana por silenciamiento génico. La expresión génica se normalizó al ARN 18S. La expresión génica observada cuando se transfectaba el ARNip de control negativo se estableció como el 100 %. La reducción relativa de la expresión del gen diana se muestra en la posterior tabla 3 para los dos ARNip diferentes contra el gen diana C12orf35:

Tabla 3

Concentración	Expresión génica (ARNip 1)	Expresión génica (ARNip 2)
100 pmol	Aprox. 28 %	Aprox. 37 %
125 pmol	Aprox. 25 %	Aprox. 38 %
150 pmol	Aprox. 35 %	Aprox. 30 %

Además, se confirmó que los ARNip diana usados en este experimento no inhiben el crecimiento de las células transfectadas. Además, el análisis de BLAST (herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas) basado en los datos del genoma de hámster chino disponibles no indica ningún efecto inespecífico.

Se transfectaron las siguientes líneas celulares: Se usó una línea celular CHO derivada de CHO-K1 como línea celular precursora. Dicha línea celular expresa los genes anteriores como se muestra en la figura 2. Esta línea celular precursora no se transfectó con un vector de expresión y sirvió como control. Las células CHO (clones y combinaciones) derivadas de dicha línea celular precursora que comprendían un vector de expresión que codifica un anticuerpo como proteína de interés integrado de forma estable en el genoma se usó para determinar el efecto de los

ARNip. El vector de expresión comprendido en dicho clon celular comprendía genes marcadores de selección y la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera del anticuerpo se expresaron a partir de casetes de expresión diferentes. El casete de expresión usado para la cadena pesada se diseñó de modo que una parte de la cadena pesada se expresara debido a la ultralectura del codón de parada como polipéptido de fusión que comprende un anclaje de membrana. La proteína de fusión se presentó en la superficie celular, simplificando de ese modo el análisis de FACS (véase la descripción). Dichas células CHO expresaban los ARNip de genes diana mencionados anteriormente similares a la línea celular precursora, lo que se determinó mediante micromatrices de cientos de clones y combinaciones. Se usó un clon de CHO que expresaba de forma recombinante el anticuerpo para determinar si una regulación por disminución de uno o más de los genes diana anteriores provoca un aumento de la expresión del polipéptido de interés. Si este era el caso, se observaría un aumento de la productividad volumétrica del anticuerpo de dicho clon celular que es detectable usando análisis de FACS.

El clon de CHO que comprende el vector de expresión integrado de forma estable en el genoma se transfectó con un ARNip de control (que no tiene un efecto sobre la expresión génica) o con uno de los ARNip mencionados anteriormente contra los genes diana. Después de la transfección de los ARNip se analizó si la reducción de la expresión del gen diana provoca un aumento de la expresión del anticuerpo. Entre otras cosas, las células transfectadas se tiñeron usando un compuesto de detección fluorescente y se analizaron por FACS para determinar la tasa de expresión del anticuerpo. Cuanto más anticuerpo se produce, más proteína de fusión presentada se puede teñir usando un compuesto marcado y, por consiguiente, mayor es la señal de fluorescencia detectada por FACS. Por lo tanto, cuanto mayor es la intensidad en los perfiles de FACS, más anticuerpo se expresa.

Los resultados se muestran en la figura 3A a L para los diferentes ARNip ensayados. El pico izquierdo en los perfiles corresponde a la señal obtenida para la línea celular precursora, que no expresa el anticuerpo. Las otras dos curvas representan los resultados obtenidos con el clon celular que expresa anticuerpo que se transfectó con el ARNip de control negativo (sin efecto sobre la expresión) o con el ARNip ensayado que reduce la expresión de su gen diana. Si el ARNip ensayado y, por consiguiente, la regulación por disminución del gen diana no tiene efecto sobre la expresión del anticuerpo (es decir, sin regulación por aumento de la productividad volumétrica), la curva de fluorescencia obtenida para el ARNip de control negativo y la curva fluorescente obtenida para el ARNip diana solapan y, por tanto, son básicamente idénticas. Este fue esencialmente el caso para todos los genes diana ensayados a nivel clonal, excepto para el gen C12orf35. Para FAM60A, sin embargo, se observó un ligero desplazamiento a nivel de combinación que se supone atribuible a la estabilidad de la expresión aumentada (datos no mostrados).

Como puede observarse de los resultados obtenidos con el ARNip contra C12orf35 (véase la figura 3B y C), los picos de fluorescencia obtenidos para el ARNip de control negativo y el ARNip contra el gen C12orf35 se separan claramente tras el silenciamiento génico de C12orf35 usando iARN. El pico fluorescente obtenido para el clon celular transfectado con el ARNip contra el gen C12orf35 se desplaza claramente a la derecha (marcado por flechas), lo que significa que la fluorescencia aumenta significativamente. Este aumento observado en la fluorescencia es atribuible a una mayor expresión del anticuerpo ya que hay más proteína de fusión presente y, por tanto, se tiñe en la superficie celular. Por lo tanto, este experimento muestra claramente que una regulación por disminución de la expresión funcional del gen C12orf35 provoca directamente una regulación por aumento significativa de la expresión recombinante del anticuerpo (rendimiento de anticuerpo). Se observó el mismo desplazamiento notable en los perfiles de FACS cuando se usaban dichos ARNip contra C12orf35 en las tres concentraciones. Puede conseguirse una reducción prolongada de la expresión del gen C12orf35 por interferencia de ARN si, por ejemplo, se integra de forma estable en un vector de expresión que expresa un transcrito que induce iARN, como se describe, por ejemplo, en la descripción. Además, una reducción o eliminación de la expresión del gen C12orf35 puede conseguirse por supresión génica o eliminación/mutación génica, de acuerdo con una realización eliminando una parte de la región telomérica del cromosoma 8 en caso de células de hámster tales como células CHO, como se describe en la descripción. Además, como se describe en la misma, también es factible reducir o eliminar el efecto del producto de expresión, por ejemplo, introduciendo una o más mutaciones que produzcan una proteína no funcional o menos funcional.

El aumento conseguido en la expresión del polipéptido recombinante de interés también se confirmó por análisis del nivel de expresión del ARNm de la cadena pesada y la ligera (que se expresaron a partir de casetes de expresión diferentes, véase anteriormente). Se muestran los resultados para dos polipéptidos diferentes de interés (anticuerpo 1 y 2) en la figura 4 y 5. Los datos mostrados están normalizados al ARNip de control negativo (125 pmol). Se descubrió que la reducción de la expresión del gen C12orf35 da lugar a niveles de ARNm significativamente mayores de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo expresado. En comparación, la reducción de la expresión de otros genes diana expresados no tuvo impacto sobre el nivel de expresión del ARNm de la cadena pesada y la ligera. Por tanto, la reducción de la expresión del gen C12orf35 provoca un aumento significativo en el nivel de ARNm del polipéptido recombinante de interés. Además, se observó que también otros genes introducidos tales como marcadores de selección se regulan por aumento si se silencia el gen C12orf35. Un experimento, en que se midió el efecto del silenciamiento génico a lo largo del tiempo empezando en el día 3, mostró que el ARNip1 (véase ARNip C12orf35_1 en la tabla 4) tuvo un efecto más largo en comparación con el ARNip2 (véase ARNip C12orf35_2 en la tabla 4). Además, se determinaron los números de células y el valor cuantitativo en toda la evolución temporal del experimento y reveló que la regulación por disminución de C12orf35 da lugar a productividades específicas y volumétricas significativamente mayores (véanse las figuras 6 y 7).

Además, se analizó la expresión del gen C12orf35 con respecto al ARN 18S en un clon que expresa anticuerpo tras la represión con ARNip 1 y 2 y en comparación con diferentes controles. Los resultados se muestran en la posterior tabla 4:

Tabla 4

	18S	C12orf35	Cadena pesada	Cadena ligera
ARNip C12orf35_1	97%	0,0129%	0,8517%	3,4639%
ARNip C12orf35_2	91%	0,0186%	1,0643%	2,9623%
ARNip de control	93%	0,0617%	0,3098%	0,9195%
células no tratadas	100%	0,0782%	0,2713%	0,7840%
células con Lipofectamin	114%	0,0648%	0,2633%	0,8019%

Ejemplo 2: Generación de una línea celular CHO que comprende una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8

Se generó una línea celular CHO novedosa (C8DEL), que comprende una eliminación en la región telomérica del brazo q del cromosoma 8. La eliminación se indujo por rotura del cromosoma. La parte eliminada comprendía el gen C12orf35, así como, entre otros, el gen FAM60A (véase la figura 1). Dicha línea celular novedosa se obtuvo de una línea celular precursora derivada de CHO-K1. Dicha línea celular se preparó de la siguiente manera. Las células CHO precursoras se dividieron a 2E5 células/ml en medio de cultivo que comprendía MTX 0,5 µM, 1 µM o 2 µM. Después de seis días las viabilidades celulares eran de aproximadamente un 30-40 %. Las células se centrifugaron a 180 x g durante 5 min y se cultivaron en medio de cultivo sin MTX para permitir que las células se recuperaran hasta que las viabilidades estuvieran por encima de un 95 % (después de aprox. 21 días). Este procedimiento se repitió dos veces más. Se obtuvieron clones celulares individuales de combinaciones celulares. Se cultivó un total de 561 clones celulares y se aisló el ADN usando el "Extract-N-Amp Blood PCR Kit". Se realizó cribado por PCR usando cebadores que detectaban el gen Ipo8. Tres de los 561 clones eran "IPO8 negativos", lo que indica la pérdida de la región telomérica del cromosoma 8 que incluye el gen Ipo8. El gen Ipo8 está ubicado centromérico del gen C12orf35 (véase la figura 1). Por tanto, si se elimina el gen Ipo8 debido a rotura del cromosoma, todos los genes ubicados teloméricos del gen Ipo8 (y, por consiguiente, también el gen C12orf35 y el gen FAM60A) se eliminan también. Estos tres clones se expandieron y se evaluaron adicionalmente. Uno de estos clones se denomina línea celular "C8DEL". Usando la técnica de PCR, se pudo determinar el punto de rotura de la región telomérica del cromosoma 8 de la línea celular C8DEL. El punto de rotura se determinó entre dos PCR, llamadas PCR20 y 28:

PCR20: directo 5'-ACC AGT GAA TAA TCG TGT TT-3' (SEQ ID NO: 47), inverso 5'-CTA TGA GTC AAT GTC CCA AG-3' (SEQ ID NO: 48);

PCR28: directo 5'-CAC ACA CAA CCT CCT AAC AAC CC-3' (SEQ ID NO: 49), inverso 5'-TTC CGC ACC GAC TCA GTT CT-3' (SEQ ID NO: 50)

El punto de rotura está dentro del gen Tmtc1. Además, pudo demostrarse que el punto de rotura identificado de la línea celular C8DEL es estable durante varias semanas de cultivo (determinado mediante PCR). Transfectar esta línea celular eucariota novedosa con un vector de expresión que codifica un producto de interés produce valores cuantitativos de producto volumétricos significativamente mayores en comparación con la línea celular precursora (que no comprende dicha eliminación en la región telomérica), así como una mayor probabilidad de seleccionar clones de producción estable como se muestra a continuación. La transfección y el tratamiento con MTX de la línea celular C8DEL aparentemente no tiene efecto sobre el punto de rotura (no se pierde más material genético), como se determina basándose en el análisis de los clones transfectados.

Ejemplo 3: Análisis de las características de la línea celular C8DEL

La línea celular C8DEL se analizó para su comportamiento cuando está expresando de forma recombinante un polipéptido de interés y en comparación con la línea celular precursora de la que se obtuvo la línea celular C8DEL. Como se describe anteriormente, dicha línea celular precursora no comprende una eliminación correspondiente en la región telomérica del cromosoma 8.

3.1. Análisis de la productividad

Se evaluó la productividad volumétrica de C8DEL en comparación con la línea celular precursora de la que se obtuvo. Se realizaron transfecciones estables, así como transitorias.

Transfección estable

El cultivo celular, la transfección y el cribado se realizaron en matraces de agitación usando células CHO que crecen en suspensión en un medio de cultivo definido químicamente. Las células se transfectaron por electroporación con diferentes vectores de expresión que codifican una diversidad de anticuerpos y proteínas terapéuticas. Los vectores de expresión usados comprendían un casete de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica una

neomicina fosfotransferasa como marcador de selección y un casete de expresión que codifica una DHFR como marcador de selección. Los vectores de expresión usados para expresar anticuerpos adicionalmente comprendían un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de un anticuerpo y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, de modo que se expresaba un anticuerpo completo a partir de dicho vector de expresión. Los vectores de expresión usados para expresar un polipéptido que no era un anticuerpo, comprendían un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido además de los marcadores de selección. Todos los casetes de expresión en los vectores de expresión estaban orientados en la misma dirección. El vector era adecuado para selección por FACS y los detalles de dicho vector se describen anteriormente.

Dependiendo de la viabilidad celular, la primera etapa de selección se inició 24-48 h después de la transfección añadiendo medio selectivo de G418 a las células. Tan pronto como las células se recuperaron a una viabilidad por encima de un 80 %, se aplicó una segunda etapa de selección pasando las células a MTX 500 nM o MTX 1 µM.

Se analizó la productividad volumétrica de las poblaciones celulares seleccionadas después de las etapas de selección con G418 y MTX mediante cultivos discontinuos en matraz de agitación desmedidos en medio con G418 o MTX. El lote de G418 se hizo en 30 ml (matraz de 125 ml) y el lote alimentado de MTX en 100 ml (matraz 500). Los cultivos discontinuos de G418 se sembraron a 1E5 vc/ml en matraz de agitación y se cultivaron en un mueble de agitación (no humidificado) a 150 rpm y 10 % de CO₂. Los lotes alimentados se sembraron a 4E5 vc/ml. La viabilidad de las células tenía que ser > 90 % cuando empezaba el ensayo. La determinación del valor cuantitativo tuvo lugar el día 14. Los valores cuantitativos de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular se determinaron por HPLC de proteína-A 14 días después de iniciar el cultivo.

Después de la primera etapa de selección (selección con G418) pudo detectarse un aumento masivo del valor cuantitativo volumétrico (12-35 veces) para las combinaciones de C8DEL transfectadas de forma estable en comparación con las combinaciones precursoras transfectadas de forma estable. Después de la segunda etapa de selección (selección con MTX), las combinaciones del lote alimentado de C8DEL estaban expresando 4-7 veces más de polipéptido de interés en comparación con las células precursoras transfectadas, como se ejemplifica por 2 anticuerpos (anticuerpo 1 y anticuerpo 2). Los valores cuantitativos volumétricos en G418 y MTX (lote alimentado) de C8DEL en comparación con la línea celular CHO precursora que no comprendía la eliminación en la región telomérica del cromosoma 8 se presentan de forma ejemplar para dos proyectos de anticuerpo en las siguientes tablas 5.a y 5.b. Las tablas 5.a y 5.b muestran el valor cuantitativo (anticuerpo) volumétrico de la combinación de lote alimentado de G418 y MTX producido en C8DEL en comparación con las combinaciones precursoras (se muestra promedio de 4 combinaciones/condición).

Tabla 5.a: Valores cuantitativos de combinación del anticuerpo de ejemplo 1

Línea celular	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX
Línea celular precursora derivada de CHO-K1	0,02 g/L	0,62 g/L
C8DEL	0,78 g/L	4,41 g/L

Tabla 5.b: Valores cuantitativos de combinación del anticuerpo de ejemplo 2

Línea celular	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX
Línea celular precursora derivada de CHO-K1	0,02 g/L	0,32 g/L
C8DEL	0,2 g/L	1,21 g/L

Los resultados respaldan la conclusión de que una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8 que incluye el gen C12orf35 está correlacionada con mayor productividad volumétrica. Ya con respecto al valor cuantitativo volumétrico de la combinación, la línea celular C8DEL está superando la línea celular precursora que no comprende una eliminación respectiva en la región telomérica del cromosoma 8. Se realizó el análisis de la frecuencia y la distribución de los sitios de integración dentro del cariotipo de combinaciones de C8DEL y combinaciones precursoras. Ambas combinaciones muestran más de 100 sitios de integración diferentes en 200 células analizadas, lo que destaca que existe una inmensa variabilidad en ambas combinaciones sin diferencia entre las dos líneas celulares. Esto indica que la mayor productividad volumétrica no se debe a ningún artefacto de integración.

Transfección transitoria

Se transfectaron de forma transitoria células C8DEL y células de la línea celular precursora cultivadas en medio de cultivo por triplicado con plásmidos de expresión que codifican eGFP o una proteína de fusión de Fc como proteína modelo de interés. Se usó polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección. El valor cuantitativo de la proteína modelo en el sobrenadante del medio se midió por HPLC de proteína-A en el día 3 y el día 6 después de la transfección. La expresión de la proteína modelo fue aprox. 3 veces mayor en C8DEL. El porcentaje de células que expresan eGFP

se midió 48 h después de la transfección por citometría de flujo con células no transfectadas que actúan como control negativo. Las células que mostraban un nivel de fluorescencia mayor de un 99 % de las células de control negativo se consideraron "transfectadas". Las células que mostraban un nivel de fluorescencia de más de 1000 veces la intensidad de las células de control negativo se consideraron "altamente fluorescentes". El número de células de alta fluorescencia fue 2-3 veces mayor usando la línea celular C8DEL en comparación con la línea celular precursora de la que se obtuvo C8DEL.

Este ejemplo muestra que las ventajas de productividad volumétrica aumentada también se consiguen cuando se realiza una transfección transitoria con la línea celular C8DEL en la que se pierde una parte de la región telomérica del cromosoma 8 debido a rotura del cromosoma.

3.2. Análisis de estabilidad

Se analizaron las características de estabilidad de 46 clones derivados de C8DEL y 37 clones derivados de la línea celular precursora (que se ensayaron como IPO8 positivos y, por tanto, no perdían la región telomérica del cromosoma 8) después de transfección estable. Todos los clones expresaban de forma recombinante el mismo anticuerpo como producto de interés y se clasificaron como estables si no estaban perdiendo más de un 25 % del valor cuantitativo (volumétrico) del anticuerpo en 12 semanas. Un 76 % de los clones analizados de la línea celular precursora perdieron más de un 25 % del valor cuantitativo (volumétrico) en 12 semanas de cultivo. Únicamente un 24 % de los clones analizados se clasificaron como estables. Por tanto, las tasas de inestabilidad eran altas. En comparación, un 67 % de los clones C8DEL pudieron clasificarse como estables y únicamente 33 % eran inestables como se muestra en la tabla 6:

Tabla 6: Resultados de estudios de estabilidad

Línea celular	Clones estables	Clones inestables
Línea celular precursora (12 semanas)	24%	76%
C8DEL (eliminación del gen FAM60A y C12orf35 debido a rotura del cromosoma) (12 semanas)	67%	33%

Usando un ensayo de la χ^2 con una corrección de Yates, se pudo calcular un valor p de 0,0002 que respalda que los clones derivados de C8DEL tienen una tendencia significativamente mayor a ser productores estables. Por tanto, se encontró un número significativamente mayor de clones de producción estable para la línea celular C8DEL. Esto respalda además, en particular en relación con los experimentos de supresión del ejemplo 5, que las células de hámster, tales como las células CHO, en las que una parte de la región telomérica del cromosoma 8 que comprende también el gen FAM60A está eliminada, muestran características de estabilidad superior. Por tanto, usar dicha línea celular para expresión recombinante aumenta la posibilidad de que se identifiquen células recombinantes de producción alta y estable. Además, se analizó la productividad volumétrica de dichos clones (véase 3.3.).

3.3. Análisis adicionales de las características de C8DEL

Se analizaron las características de la línea celular CHO que comprende una eliminación en la región telomérica del cromosoma 8, en la que dicha eliminación comprende el gen C12orf35 en experimentos adicionales que demuestran ventajas adicionales de dicha línea celular.

Menos clonación de células individuales requerida para seleccionar altos productores

Una característica ventajosa de la línea celular C8DEL es la mayor proporción de clones de alta producción después de clonación de células individuales. Se descubrió que las combinaciones de C8DEL contienen una proporción ampliada de células de alta producción (que provoca un valor cuantitativo volumétrico de la combinación aumentado) en comparación con la línea celular precursora derivada de CHO-K1. Después de clonación de células individuales de combinaciones de C8DEL usando tecnología FACS, se seleccionó una proporción significativamente mayor de clones que expresaban altas cantidades de anticuerpo en comparación con combinaciones derivadas de la línea celular precursora. La tabla 7 muestra que la mayoría de clones derivados de la línea celular precursora tenían un "valor cuantitativo de 96 pocillos" volumétrico de 0-20 mg/l. Por el contrario, la mayoría de clones derivados de la línea celular C8DEL tenían un promedio del valor cuantitativo volumétrico de 80-100 mg/l, lo que es una mejora significativa. Una ventaja de usar combinaciones de C8DEL es el número reducido de clones que tienen que generarse para obtener una cantidad comparable de clones de alta producción. Esto reduce significativamente el esfuerzo de cribado.

Tabla 7

Valor cuantitativo de 96 pocillos (mg/l)	Línea celular precursora	C8DEL
0-20	80,3%	0,8%
20-40	6,1%	3,1%
40-60	5,4%	5,3%
60-80	6,1%	28,2%
80-100	1,4%	32,1%
100-120	0,0%	17,6%

120-140	0,7%	7,6%
140-160	0,0%	3,1%
160-180	0,0%	1,5%
180-200	0,0%	0,8%

Usar la línea celular C8DEL como línea celular de producción no solamente provoca una proporción ampliada de clones de alta producción, también el valor cuantitativo volumétrico de los clones C8DEL individuales es mayor. La figura 8 muestra el valor cuantitativo volumétrico de los 45 clones de producción más alta de la línea celular precursora derivada de CHO-K1 (todos Ipo8 positivos) y C8DEL de un proyector de anticuerpo (los resultados del análisis de estabilidad de dichos clones se muestra en 3.2). Como puede observarse, el promedio del valor cuantitativo volumétrico para los clones derivados de C8DEL es mayor en comparación con la línea celular precursora y, adicionalmente, también los clones de producción productores de anticuerpo más alta se originan a partir de la línea celular C8DEL.

Idoneidad de biorreactor

Se realizaron ensayos adicionales para evaluar la línea celular C8DEL en comparación con la línea celular precursora derivada de CHO-K1 entre otras cosas para determinar su idoneidad para aumento de escala. Los procesamientos en biorreactor han mostrado que la línea celular C8DEL es adecuada para aumento de escala. La línea celular C8DEL cultivada en biorreactores tuvo una densidad de células viables que es adecuada para producción a gran escala. Además, se descubrió que la viabilidad era mejor que la de la línea celular precursora. Globalmente, la línea celular C8DEL es adecuada para aumento de escala y está superando la línea celular precursora de la que deriva con respecto a la viabilidad. La viabilidad de la línea celular C8DEL permanece más tiempo a un nivel mayor.

Líneas temporales mejoradas desde la transfección hasta la producción de combinación estable

Otra ventaja de la línea celular C8DEL es la recuperación más rápida de la selección con MTX. La recuperación de las combinaciones después de la incubación con MTX se consiguió 7-8 días más rápido en comparación con la línea celular precursora en la que ninguna parte de la región telomérica del cromosoma 8 que comprende el gen C12orf35 está eliminada. Globalmente, se descubrió que la crisis celular es significativamente menor con las células en las que la expresión del gen C12orf35 se reduce o elimina. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que esto se debe muy probablemente al hecho de que los genes heterogéneos, es decir exógenos, incluyendo el marcador de selección, se expresan más.

Ejemplo 4: Selección usando un receptor de folato como marcador de selección

La línea celular C8DEL se usó en diferentes entornos en relación con el receptor de ácido fólico como marcador de selección y muestra ventajas particulares en relación con dicho sistema de selección. En particular, es beneficiosa una selección combinada frente al receptor de folato y DHFR como marcadores de selección. Aquí, las células transfectadas comprendían un receptor de folato alfa humano y DHFR como marcadores de selección y expresaban un anticuerpo. Mientras la selección de la línea celular precursora con cantidades muy bajas de ácido fólico (ácido fólico (FA) 50 nM/MTX 50 nM) encontró dificultades debidas a la rigurosidad de la selección (las células no siempre se recuperaban), la combinación de C8DEL y el receptor de folato como marcador de selección es muy potente en dichas condiciones rigurosas y provocaba un aumento significativo en el valor cuantitativo volumétrico. La tabla 8 destaca las diferencias en el valor cuantitativo volumétrico entre la línea celular precursora y C8DEL, así como el aumento adicional en el valor cuantitativo volumétrico que se consigue cuando se usa el receptor de folato como marcador de selección en combinación con bajas cantidades de ácido fólico en lugar de la etapa de selección con MTX 500 nM. Por tanto, el uso de las células eucariotas descritas en este documento, en las que la expresión del gen C12orf35 y el gen FAM60A se reduce o elimina, permite, en combinación con el sistema de selección de receptor de folato/DHFR, usar condiciones de selección muy rigurosas que no requieren el uso de altas cantidades de agentes tóxicos.

Tabla 8

Línea celular	Condiciones de selección	Valor cuantitativo de combinación (g de mAb/l) - cultivo discontinuo en matraz de agitación
Línea celular precursora derivada de CHO-K1	0,8 g/l de G418/MTX 500 nM	Aprox. 0,07
C8DEL	0,8 g/l de G418/MTX 500 nM	Aprox. 0,83
C8DEL	FA 50 nM/MTX 50 nM	Aprox. 1,61

Además, se transfectaron (nucleofección) células C8DEL con un vector de expresión que comprendía un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un receptor de folato alfa humano y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica DHFR. Por tanto, ambos marcadores de selección FRalfa y DHFR estaban en el mismo vector de expresión. Además, el vector de expresión comprendía un casete de expresión que

comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de un anticuerpo y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de un anticuerpo. El casete de expresión para la cadena pesada del anticuerpo se diseñó de modo que una parte de la cadena pesada se produjera debido a ultralectura del codón de parada como fusión anclada a membrana, facilitando de ese modo la selección por FACS (véase anteriormente). Se ensayaron cinco condiciones de selección diferentes usando ácido fólico (FA) 100 nM y diferentes concentraciones de MTX. Los medios de selección se resumen en la posterior tabla 9. Después de la selección, las combinaciones celulares seleccionadas se transfirieron a medio completo y se cultivaron en cultivos discontinuos en matraz de agitación. En el día 13 del cultivo, se tomaron muestras del medio de cultivo y se analizaron para el contenido de anticuerpo por HPLC de proteína-A. Los resultados también se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

Condición de selección	Concentración de anticuerpo aprox. [g/l]
FA 100 nM/sin MTX	0,13
FA 100 nM/MTX 1 nM	0,12
FA 100 nM/MTX 5 nM	0,46
FA 100 nM/MTX 10 nM	1,44
FA 100 nM/MTX 50 nM	1,57

Como puede observarse, una concentración de MTX ya tan baja como 5 nM proporcionó una ventaja de selección. Aumentar la rigurosidad de selección también aumenta el valor cuantitativo volumétrico de la combinación. Por tanto, las productividades volumétricas de anticuerpo se aumentan significativamente. Además, en comparación con selecciones con MTX convencionales, pueden usarse concentraciones significativamente menores de MTX durante la selección. Esta es una ventaja importante, considerando que MTX es un agente tóxico. Además, se analizó la manera en que la rigurosidad de la selección influye en los valores cuantitativos volumétricos de la combinación y el tiempo para la selección. Se descubrió que aumentar la rigurosidad de la selección aumentando la concentración de MTX prolonga el tiempo de recuperación. Por tanto, la rigurosidad de la selección puede ajustarse de acuerdo con las necesidades de diferentes aplicaciones (tiempo frente al valor cuantitativo volumétrico). Para determinadas aplicaciones, en las que son suficientes cantidades globales más pequeñas de proteína de interés, pueden usarse condiciones de selección menos rigurosas, obteniendo aún de ese modo combinaciones con una tasa de producción suficientemente alta para permitir la purificación de la proteína respectiva en cantidades suficientes. Para establecer una línea celular clonal que pueda usarse para la producción de la proteína de interés a escala industrial, se prefiere aplicar una mayor rigurosidad de selección, para obtener clones de una sola célula que tengan una tasa de expresión muy alta combinada con una buena tasa de estabilidad.

Además, el análisis de las combinaciones obtenidas después de selección con ácido fólico/MTX para la expresión superficial del anticuerpo por FACS, muestra que usar el sistema de selección en combinación con la línea celular novedosa aumenta significativamente la abundancia de altos productores en la combinación celular como es evidente de los perfiles de fluorescencia obtenidos mostrados como figura 9A a E. La concentración de MTX se aumentó de A a E (A: sin MTX; B: MTX 1 nM; C: MTX 5 nM; D: MTX 10 nM; E: MTX 50 nM). Cuando se aumentaba la concentración de MTX, se aumentaba el número de clones celulares de alta expresión en la combinación celular como puede derivarse del aumento del tamaño del pico en lado a mano derecha (una mayor fluorescencia que se correlaciona con una mayor tasa de expresión de anticuerpo). Usar ácido fólico 50 nM en combinación con MTX 10 nM (véase la figura 9D) ya produjo una combinación celular que comprende predominantemente clones celulares de alta producción (un pico dominante en el lado de mano derecha). Además, cuando se aumenta la concentración de MTX hasta 50 nM (véase la figura 9E), la combinación obtenida comprendía prácticamente de forma exclusiva células de alta producción. Estos resultados son notables, porque cuando se usa la línea celular C8DEL en combinación con el sistema de selección de receptor de folato/DHFR, se obtiene un perfil de la combinación después del análisis por FACS, que se parece mucho más al de un clon celular (que comprende células genéticamente idénticas) que al de una combinación celular (que comprende células genéticamente diferentes). Parece que la eliminación del gen C12orf35 comprendido en la región telomérica perdida de la línea celular C8DEL provoca un aumento significativo de la productividad volumétrica, de modo que la mayoría de las células en las combinaciones celulares obtenidas después de selección con ácido fólico/MTX en condiciones apropiadas eran altos productores de acuerdo con los perfiles de FACS.

Además, se descubrió que cuando se cultivaban clones transfectados de forma estable obtenidos de la línea celular C8DEL (el gen FAM60A se pierde, véase anteriormente) en medio selectivo (ácido fólico 50 nM, MTX 10 nM), se podían obtener tasas de estabilidad de hasta un 80 % y hasta casi el 100 % en los proyectos. También se consiguieron resultados de alta estabilidad significativa en un medio semiselectivo, que solamente comprendía una concentración limitada de ácido fólico (50 nM), sin embargo, nada de MTX. Aquí, se consiguieron tasas de estabilidad de hasta un 87 % con esta línea celular. En determinados proyectos, se obtuvieron tasas de estabilidad de hasta casi el 100 %.

Ejemplo 5: Supresión de FAM60A en células CHO usando tecnología de TALEN

Se prepararon dos clones celulares basados en células CHO derivados de la línea celular CHO-K1 que comprenden una mutación de supresión en el gen FAM60A. Para crear las células mutantes de FAM60A, se usó tecnología de TALEN (nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción). Para la supresión de FAM60A, se abordó una región codificante (supuestamente el exón 1) del gen FAM60A. Las células CHO-K1 usadas como célula precursora solamente contienen una copia de FAM60A. Por tanto, una sola supresión por célula es suficiente para alterar el efecto de FAM60A en dicha célula.

5.1. Diseño/producción y uso de TALEN que son específicas de FAM60A

Se abordó la siguiente secuencia exónica de ADN genómico del gen FAM60A de la línea celular precursora CHO:

atgtttggtttcacaagccaaagat**gtaccgaagtatagagggtctgt**tatctgcagagccaagtcctccagctctcggttc
acggacagtaaacgttatgaaaaggacttcagagctgtttgg (SEQ ID NO: 51)

Los nucleótidos de los sitios de unión de TALEN están marcados en negrita. Dos TAL Fok I dirigidas a la secuencia codificante de FAM60 mostrada anteriormente (SEQ ID NO: 51) se diseñaron. TALEN TAL-L se dirige y une a los 25 nucleótidos marcados en la hebra de ADN 5' (directa) y TALEN TAL-R se dirige y une a los 25 nucleótidos marcados en la hebra de ADN 3' (inversa) del gen FAM60A como se muestra anteriormente para la SEQ ID NO: 51 (véase también la tabla 10, que muestra adicionalmente las secuencias cebadoras que se usaron posteriormente para identificar las supresiones). Los dos sitios de unión están separados por los dieciséis nucleótidos del sitio de corte. Se obtuvieron plásmidos que codifican las dos TALEN TAL-L y TAL-R.

Tabla 10: Secuencias diana de TALEN para supresión génica de FAM60A y secuencias cebadoras

TAL-L	TGTACCGAAGTATAGAGGGCTGCTG (SEQ ID NO:52)
TAL-R	TGTCCGTGAACCGAGAGCTGGAGGA (SEQ ID NO: 53)
Cebador 1:	GTCCCAGCACTCATGAGGAT (SEQ ID NO: 54)
Cebador 2:	CCTCCTAGCTCCAGGTATTT (SEQ ID NO:55)
Cebador 3:	GAGGACTTGGCTCTGCAGAT (SEQ ID NO: 56)
Cebador 4:	TTCCACAGAGCACAGCCGAT (SEQ ID NO: 57)

Una parte de la secuencia de ADN genómico del gen FAM60A que engloba la secuencia codificante mostrada en la SEQ ID NO: 51 y que también se prolonga sobre los sitios de unión del cebador para los cebadores 1, 2 y 4 que están ubicados en secciones intrónicas se muestra como la SEQ ID NO: 58.

5.2. Transfección del plásmido de TALEN

La transfección se realizó usando un protocolo de transfección convencional que implica electroporación usando las células CHO precursoras en fase de crecimiento exponencial con viabilidad de más de un 95 % y 5 µg de cada uno de los plásmidos de TALEN.

5.3. Ensayo de Cel-I y clasificación celular

El ensayo de Cel-I se realizó de acuerdo con el manual de SAFB Biosciences. El ensayo de Cel-I es un ensayo convencional para determinar la eficacia de corte. En resumen, después de varios días de cultivo, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR usando los cebadores 1 y 2 (véase la tabla 10). El producto de amplificación se desnaturalizó y se permitió que se renaturalizara. A continuación, se añadió nucleasa S y potenciador de la nucleasa S, y se incubaron. Se analizó el producto digerido. Si se produce actividad de TALEN, hay dos bandas más pequeñas presentes, lo que indica actividad de TALEN dentro de esa región del genoma y, por lo tanto, respalda que las células en las que el gen FAM60A está suprimido están presentes en la combinación celular analizada. A partir de las combinaciones celulares positivas, se clasificaron células individuales en placas de 96 pocillos por dilución limitante.

5.4. Estrategia de cribado

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de cada clon en placas de 96 pocillos. El ADNg se analizó por procedimiento convencional para identificar clones de supresión por análisis de PCR. Para este fin, se usaron los cebadores 3 y 4 (véase la tabla 10). En caso de una mutación en la región de corte, el cebador 3 no se unirá de modo que no se genera producto de PCR. Los productos de PCR resultantes de la PCR con los cebadores 1 y 2 del ADNg (véase anteriormente) de los clones positivos se secuenciaron para analizar la mutación introducida.

Se obtuvieron dos clones celulares con una mutación de supresión: FAM60A_ko_s16 (s16), con una eliminación de 14 nucleótidos y FAM60A-ko_s23 (s23) con una eliminación de 5 nucleótidos. Las secuencias mutadas de los clones celulares se muestran en la tabla 11. Cada una de las eliminaciones provoca un desplazamiento del marco. Debido al desplazamiento del marco dentro de la secuencia diana de FAM60A, se proporcionan codones de parada dentro del marco de lectura (destacado en la tabla 11 por nucleótidos en letras cursivas y subrayado). Por tanto, se espera que se exprese un producto de expresión FAM60A anómalamente corto y menos o nada funcional por los clones de supresión de FAM60A obtenidos.

Tabla 11: Secuencia de ADN del supuesto exón 1 de FAM60A en CHO de tipo silvestre (WT - derivada de CHO-K1) y dos clones celulares de supresión (s16 y s23) derivados de dicha WT. Los nucleótidos de los sitios de unión de TALEN están destacados en negrita y los nucleótidos de codones de parada prematuros en letras cursivas y subrayado.

WT	atgtttggtttcacaagccaaagat gtaccgaagtagagggtgctg tatctgcagagccaag tcctcca gctctcggttcacggacag taaacggtatgaaaaggacttcagagctggtttgg (SEQ ID NO: 51)
s16 (elim.14)	atgtttggtttcacaagccaaagat gtaccgaagtagagggtgctg tat ctctccagctctcggttcacg gacagtaa acggtatgaaaaggacttcagagctggtttgg (SEQ ID NO: 59)
s23: (elim.5)	atgtttggtttcacaagccaaaga gtaccgaagtagagggtgctg tatctgccaag tcctccagctctc ggttcacggacag taaacggtatgaaaaggacttcagagctggtttgg (SEQ ID NO: 60)

5.5. Análisis de estabilidad

La línea celular WT precursora de la que se obtuvieron los clones de supresión de FAM60A y las células de supresión de FAM60A obtenidas se transfectaron de forma estable con un vector de expresión que codificaba un anticuerpo como polipéptido de interés. El vector de expresión transfectado comprendía un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica neomicina fosfotransferasa como marcador de selección, un casete de expresión que codifica DHFR como marcador de selección, un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de un anticuerpo y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, de modo que se expresaba un anticuerpo completo a partir de dicho vector de expresión. Todos los casetes de expresión en los vectores de expresión estaban orientados en la misma dirección. El casete de expresión usado para la cadena pesada se diseñó de modo que una parte de la cadena pesada se expresara debido a la ultralectura del codón de parada como polipéptido de fusión que comprende un anclaje de membrana. La proteína de fusión se presentó en la superficie celular, simplificando de ese modo el análisis de FACS (véase la descripción). Las células transfectadas se seleccionaron para la expresión recombinante usando selección con G418 y MTX (1 µM). De las combinaciones seleccionadas de cada línea celular transfectada de forma estable (CHO WT, s16 y s23), se obtuvieron clones celulares que expresaban el producto de interés con buenos rendimientos y se cultivaron durante varias semanas (7 semanas para la línea celular precursora WT CHO (45 clones) y 8 semanas para las células de supresión de FAM60A (13 clones para s16 y 18 clones para s23)) para analizar su estabilidad de la expresión durante cultivo prolongado. Para asegurar que las líneas celulares de producción pueden aumentarse de escala a biorreactores de alto volumen, también se realizaron estudios de estabilidad de 12 semanas, en particular análisis adicional de la estabilidad de la expresión durante 12 semanas de cultivo. Los clones se clasificaron como inestables si perdían más de un 25 % de su valor cuantitativo de expresión volumétrica inicial sobre el periodo de estabilidad analizado. Dentro del nivel habitual de variación, algunos clones estaban un poco por encima o por debajo de la línea delimitadora de un 25 %. La mayor proporción de clones inestables en la semana 7/8 en comparación con la semana 12 para la línea celular precursora puede explicarse con la variación en el ensayo de productividad para clones que están cerca del umbral de un 25 %.

La tabla 12 compara los resultados de estabilidad que se obtuvieron con las líneas celulares. Como puede observarse, el porcentaje de clones con valor cuantitativo volumétrico estable es considerablemente mayor en los clones derivados de la línea celular de supresión de FAM60A en comparación con los clones que se obtienen de la línea celular de tipo silvestre. Esto demuestra que alterar el efecto de FAM60A endógeno en la célula, aquí introduciendo una supresión génica, mejora significativamente los resultados de estabilidad durante cultivo prolongado. La relación de clones estables frente a inestables se aumenta significativamente cuando se usan las células de la invención de modo que se obtienen más clones estables que mantienen sus características favorables de alta expresión durante cultivo prolongado. El anticuerpo que se expresaba de forma recombinante en este ejemplo no tenía los codones optimizados y mostraba en la línea celular precursora un grado muy alto de inestabilidad. A causa de esta inestabilidad significativa,

este proyecto se eligió como ejemplo de comparación, porque demuestra los beneficios significativos que se consiguen con la presente invención incluso cuando se confronta con proyectos difíciles en los que las tasas de inestabilidad son altas con la línea celular sin modificar de tipo silvestre. Sin embargo, como se analiza anteriormente, con otros proyectos las tasas de inestabilidad son menos altas con la línea celular de tipo silvestre CHO precursora. Sin embargo, en todos los casos analizados, las células hospedadoras de acuerdo con la presente divulgación, en las que el efecto de FAM60A está alterado en dichas células, se consigue un aumento significativo en la cantidad de células estables en comparación con el tipo silvestre sin modificar. Las tasas de estabilidad pueden alcanzar hasta un 60 % o más, un 70 % o más, un 80 % o más, un 85 % o más, o incluso un 90 % o más, dependiendo del proyecto. Con las células de acuerdo con la presente divulgación, que comprenden, por ejemplo, una supresión génica en el gen FAM60A o en las que una parte de la región telomérica que comprende el gen FAM60A se pierde debido a rotura del cromosoma, aparecían clones inestables independientemente del proyecto analizado de forma significativamente menos frecuente e incluso, si aparecían, la pérdida en la productividad volumétrica era menos pronunciada en comparación con las células correspondientes en las que el efecto de FAM60A no está alterado en la célula. Por lo tanto, debido al porcentaje aumentado de clones estables que se obtienen después de la transfección y la selección, las células de acuerdo con la presente divulgación permiten acortar significativamente o incluso omitir los estudios de estabilidad a largo plazo. Los estudios de estabilidad de los clones de supresión de FAM60A confirman los resultados beneficiosos que se consiguen con la tecnología de la presente divulgación.

Tabla 12: Resultados de estudios de estabilidad

Línea celular	Clones estables		Clones inestables	
	7/8 semanas	12 semanas	7/8 semanas	12 semanas
Línea celular precursora (7 y 12 semanas)	13,3%	86,7%	24,3%	75,7%
Línea celular de supresión de FAM60A s16 (8 y 12 semanas)	61,5%	38,5%	61,5%	38,5%
Línea celular de supresión de FAM60A s23 (8 y 12 semanas)	44,4%	55,6%	47,1%	52,9%

Los resultados también se muestran en la figura 10 y demuestran las ventajas importantes que se consiguen cuando se altera el efecto de FAM60A en las células, aquí por supresión génica. Por lo tanto, es ventajoso alterar adicionalmente el efecto de la proteína FAM60A en la célula eucariota, por ejemplo, reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen FAM60A alterando el genoma de la célula eucariota, ya que de este modo puede mejorarse la estabilidad de la expresión.

Ejemplo 6: Herramienta de validación para identificar productores altos y estables basada en el perfil de expresión

Se desarrolló una herramienta analítica de RT-PCR en tiempo real para predecir la productividad y estabilidad de los clones en una fase inicial del proceso en trámite de desarrollo. La RT-PCR en tiempo real se implementó para cuatro genes: C12orf35, Dennd5b, FAM60A e Ipo8 (todos ubicados en la región telomérica en el brazo q del cromosoma 8). Después de la selección y generación de clones, se analizaron varios cientos de clones que expresan de forma estable un anticuerpo como polipéptido de interés con respecto a la presencia y niveles de expresión de estos cuatro genes en la región telomérica del cromosoma 8 y el rendimiento de expresión. Se encontró una clara correlación entre la productividad volumétrica del anticuerpo y una pérdida en la región telomérica del cromosoma 8. Además, se descubrió que estas células muestran mayores niveles de ARNm de cadena pesada y cadena ligera. Por tanto, pueden identificarse clones celulares de alta expresión usando dicho método analítico.

Además, se realizó un estudio para determinar si hay una correlación entre la estabilidad y la presencia de la región telomérica del cromosoma 8. Los clones se clasificaron como estables si no estaban perdiendo más de un 25 % del valor cuantitativo volumétrico en 12 semanas. Existe una correlación significativa entre la pérdida de la región telomérica del cromosoma 8 y la estabilidad del clon (valor p: 4,67E-06 basado en el ensayo de la χ^2). Por consiguiente, la pérdida de la región telomérica en el cromosoma 8 puede usarse como herramienta de predicción para la estabilidad. Analizar la presencia de la región telomérica del cromosoma 8 mediante RT-PCR en tiempo real aumenta la probabilidad de seleccionar una mayor proporción de clones estables en proyectos en desarrollo.

Además, se descubrió que, analizando varios cientos de clones que han perdido una parte de la región telomérica del cromosoma 8, parece haber varios puntos de rotura en la región telomérica del cromosoma 8 existentes que pueden inducirse. En la mayoría de casos analizados, el punto de rotura está ubicado centromérico del gen Ipo8. También se detectaron puntos de rotura entre los genes de la proteína 20 de tipo metiltransferasa (denominada 4833442J19Rik en ratón) y Dennd5b, entre Dennd5b y FAM60A, entre FAM60A e Ipo8. La región eliminada comprendía, en todos los casos, el gen C12orf35 (que está ubicado telomérico del gen que codifica la proteína 20 de tipo metiltransferasa). Todos los puntos de rotura estaban asociados con una alta productividad volumétrica, confirmando de ese modo la relevancia del gen C12orf35 para la productividad volumétrica.

Ejemplo 7: Reducir la expresión génica de C12orf35 en células mediante interferencia de ARN (iARN) en una línea celular derivada de HEK293 aumenta el rendimiento de expresión

5 Para demostrar que reducir la expresión del gen C12orf35 produce también otras líneas celulares de mamífero un aumento en la productividad volumétrica, se diseñaron dos ARNip contra C12orf35 de *Homo sapiens*. Las secuencias de los ARNip se enumeran en la tabla 13. Como iARN de control negativo (ARNip de control negativo), se usó el ARNip de control negativo Silencer® n.º 1 (AM4611).

10 **Tabla 13:** ARNip contra C12orf35 y gen de control

Gen diana	Con sentido	Antisentido
C12orf35_3	CAGTGTATCCCGTTATTA (SEQ ID NO: 61)	TTAATAACGGGATACACTG (SEQ ID NO: 62)
C12orf35_5	GCAACTGTATCTCATCAA (SEQ ID NO: 63)	TTTGATGAGATACAGTTGC (SEQ ID NO: 64)

15 Los ARNip usados se validaron usando RT-PCR en tiempo real para confirmar que reducen la expresión de los genes diana por silenciamiento génico. La expresión génica se normalizó al ARN 18S. La expresión génica observada cuando se transflectaba el ARNip de control negativo se estableció como el 100 %. La reducción relativa de la expresión del gen diana se muestra en la posterior tabla 14 para los dos ARNip diferentes contra el gen diana C12orf35:

Tabla 14

Concentración	Expresión génica (ARNip 1)	Expresión génica (ARNip 2)
150 pmol	Aprox. 30 %	Aprox. 26%

20 Además, el análisis de BLAST (herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas) basado en los datos del genoma de *Homo sapiens* no indica ningún efecto inespecífico.

25 Se transflectaron las siguientes líneas celulares: Se usó una línea celular derivada de HEK293 como línea celular precursora. Dicha línea celular expresa de forma estable C12orf35 endógeno. Se usó una combinación derivada de la transfección estable de una línea celular derivada de HEK293 con un vector de expresión que codifica una proteína terapéutica recombinante de interés integrado de forma estable en el genoma para determinar el efecto de los ARNip. El vector de expresión en dicha combinación celular comprendía genes marcadores de selección y la proteína terapéutica recombinante. La combinación que expresaba de forma recombinante la proteína recombinante se usó para determinar si una regulación por disminución de C12orf35 provoca un aumento de la expresión del polipéptido de interés. Si este era el caso, se observaría un aumento de la productividad volumétrica de la proteína diana de dicho clon celular.

30 La combinación derivada de HEK que comprende el vector de expresión integrado de forma estable en el genoma se transflectó con un ARNip de control (que no tiene un efecto sobre la expresión génica) o con uno de los ARNip mencionados anteriormente contra C12orf35. Después de la transfección de los ARNip se analizó si la reducción de la expresión de C12orf35 provoca un aumento de la expresión de la proteína recombinante.

35 Los resultados se muestran en la tabla 15 para los diferentes ARNip ensayados. Las células derivadas de HEK293 se transflectaron a una escala de 6 pocillos con los ARNip respectivos usando Lipofectamin2000 como reactivo de transfección. Cinco días después de la transfección, se midió la concentración de la proteína diana recombinante en el sobrenadante de cultivo celular usando HPLC de afinidad. Para esto, se usó una marca corta patentada sobre la proteína recombinante de interés. Se pudo detectar un aumento de la proteína de interés independientemente del ARNip de los dos evaluados que se usó. Puede conseguirse una reducción prolongada de la expresión del gen C12orf35 por interferencia de ARN si, por ejemplo, se integra de forma estable en un vector de expresión que expresa un transcrito que induce iARN. Además, puede conseguirse una reducción o eliminación de la expresión del gen C12orf35 por supresión génica o eliminación/mutación génica. Además, como se describe en la misma, también es factible reducir o eliminar el efecto del producto de expresión, por ejemplo, introduciendo una o más mutaciones que produzcan una proteína no funcional o menos funcional.

Tabla 15: Aumento del valor cuantitativo volumétrico después de transfección de ARNip contra C12orf35

	Valor cuantitativo de la proteína recombinante
ARNip C12orf35_3	37,3 mg/L
ARNip C12orf35_5	28,9 mg/L

ARNip de control	16,1 mg/L
células no tratadas	18,5 mg/L

Además, se analizó la expresión del gen C12orf35 tras la represión con ARNip 3 y 5 en el día 3 y día 5. Los resultados se muestran en la posterior tabla 16:

5 **Tabla 16**

	Día 3	Día 5
	C12orf35	
ARNip C12orf35_3	35 %	42 %
ARNip C12orf35_5	27 %	52 %
ARNip de control	100 %	100 %
células no tratadas	72 %	122 %

Ejemplo 8: Generación de líneas celulares CHO que comprenden supresión del gen C12orf35 por mutaciones de desplazamiento del marco dentro del gen C12orf35

10 Se generaron tres clones celulares de supresión ("KO") de C12orf35 basados en las células derivadas de CHO-K1 usando tecnología de TALEN (nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción). Para la supresión, C12orf35 se abordó en la región 5-prima. Añadir mutaciones de desplazamiento del marco en la región 5 prima tiene la ventaja de que la proteína troncada será corta.

15 **8.1 Diseño/producción y uso de TALEN**
 Se diseñaron dos nucleasas TAL FokI truncadas dirigidas a la región 5 prima. Cada TALEN está dirigida y se une a 19 nucleótidos en la hebra de ADN 5' (en la directa) o la 3' (en la inversa), respectivamente. Los dos sitios de unión están separados por los dieciséis nucleótidos del sitio de corte. Cada TAL diseñada se sintetizó y clonó en un vector de entrada adecuado y se subclonó en un vector de destino pcDNA3.3_DEST_A343. Los métodos y la descripción del producto están disponibles en Life Technology/GeneArt.

20 **8.2 Transfección de plásmidos de TALEN**
 Se usaron células CHO precursoras en fase de crecimiento exponencial con viabilidad de más de un 95 % para la transfección. Se realizó electroporación (nucleofección) usando la tecnología Amaxa™, Nucleofector™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lonza). Las células transfectadas se expandieron el día 5 después de la transfección y las células individuales se separaron el día 8 en 20 placas de 96 pocillos. Se controló la monoclonalidad y la confluencia con el aparato CloneSelect™ (Genetix).

30 **8.3 Ensayo de Cel-I y estrategia de cribado**
 El ensayo de Cel-I se realizó de acuerdo con el manual de SAFC Biosciences. El ensayo de Cel-I es un ensayo convencional para determinar la eficacia de corte. En resumen, después de 6 días de cultivo, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR usando los siguientes cebadores:

35 **Directo:** GCATCCAGTGAACCTACTTATCCAGAT (SEQ ID NO: 65)

Inverso: GCTCTGCCACTGCTGTTGAAAG (SEQ ID NO: 66)

40 El producto de amplificación se desnaturalizó y se permitió que se renaturalizara. A continuación, se añadió nucleasa S y potenciador de la nucleasa S, y se incubaron. Se analizó el producto digerido. Había dos bandas más pequeñas presentes, lo que indica actividad de TALEN dentro de esa región del genoma y, por lo tanto, respalda que las células en las que el gen C12orf35 está alterado por mutación estaban presentes en las combinaciones celulares analizadas. A partir de las combinaciones celulares más positivas (intensidad más fuerte de las dos bandas más pequeñas), se clasificaron células individuales en placas de 96 pocillos.

45 Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de cada clon en placas de 96 pocillos usando los Extract-N-Amp™ Blood PCR Kits (cat. XNAB2R, Sigma). Los extractos de ADNg se usaron para cribar clones mutados, en un ensayo de PCR usando el cebador directo (Directo) (SEQ ID NO: 67: TGCTGGGATTAAGGGGAAAGCTTT) en combinación con un cebador ("cebador de corte") que se una en el sitio de corte que tenía la siguiente secuencia:

50 **Cebador de corte:** TCTAGAAACAGACTGAGAATTTTGCAC (SEQ ID NO: 68)

Los clones con mutaciones se transfirieron a frascos de agitación de 125 ml y se secuenciaron. En dichos ensayos de cribado, se identificaron 10 clones y se seleccionaron tres clones para análisis adicional. Los genotipos de los tres clones se muestran en la tabla 17 que destaca las secuencias 5-prima de C12orf35 que se refieren al tipo silvestre y las mutaciones respectivas. Se muestran las secuencias de aminoácidos respectivas en la tabla 18.

5 **Tabla 17:** Secuencias génicas de C12orf35 que codifican el extremo 5-prima de WT derivado de CHO-K1 y los diferentes clones KO. Δ indica una eliminación. El número detrás de Δ indica cuántos nucleótidos se han eliminado. En paréntesis, se muestran los nucleótidos eliminados y aportados con una SEQ ID NO diferente como se indica. El sitio de unión de TALEN y el sitio de corte están marcados en negrita. Las secuencias alrededor del sitio de unión y corte por TALEN se han confirmado por secuenciación de Sanger en clones KO y el resto de la secuencia se basa en la suposición de que es igual en la secuencia de tipo silvestre.

WT	<p>atgaattggaatgcaaaaccagagaatgctgccccaaaccaccatattctaaagccagctgctctt ttgcagcagttttaatgcctccacaacttctcaaagttcttcagctgtctccacataaccaagaagcat gcataatcccactaattcaaattcagttcacagccacttctgaacgtcaggagttcataaatcctccga tctctgtttctaattgcatataggacagttgtggcctcacagacctcagtagaaagagtcacataata aatgtaaaggagcccaacaaccaaaccaatttgcaaacagtgcttctggagttgtgcaaaatgc ctggatgaattcaacaatgaggaatttatgccttcttccagaggaaccataatctataaacctgatg gtgggcctagatgcatatataatgcatgaccacagagtcacttctgtcacatcagacacctactctgtgca actacagatgactcctcaaactctgtaagaggccctgtaactaccaaggaaatattcaaggaaatcc gggactaaccactcagatggcaggtgagcttgctgggtacaatgtgcatccagtgaaactactatcca gattacagaccctccaagaataatcctatttaccacaagaagcttctgtgcaagacacttctgttcagaa acaaaactttgtgcatctacatcattacaagttaaaaataatcagctccaccttctacacagacctacc atcaaaagcgcctgtacctgtgctcatatcagatgctgcaaaaccagcaaaagactcctcctccc ccttacagctgtagatatggaagccaacatgtgcaaaattctcagctgtttctagacacttgcc gtggaagttcctcagagttcagaaatgcactcgtctgaaaaaagaaagatgcttcaaaagctttca cagcagtgagcagagcactagtaaaaatgtcagtagcaatagggaaattctgtgagttgaaaattaatac aaaacagcttacaatgactctgctggctcttctgggatggtgtcactctgttcaaaataatcaaga agaaagaaagtattctataatccaagtacaatcaatactagacacaaatgtcacaagaaagaaag (SEQ ID NO: 69)</p>
Δ8	<p>atgaattggaatgcaaaaccagagaatgctgccccaaaccaccatattctaaagccagctgctctt ttgcagcagttttaatgcctccacaacttctcaaagttcttcagctgtctccacataaccaagaagcat gcataatcccactaattcaaattcagttcacagccacttctgaacgtcaggagttcataaatcctccga tctctgtttctaattgcatataggacagttgtggcctcacagacctcagtagaaagagtcacataata aatgtaaaggagcccaacaaccaaaccaatttgcaaacagtgcttctggagttgtgcaaaatgc ctggatgaattcaacaatgaggaatttatgccttcttccagaggaaccataatctataaacctgatg gtgggcctagatgcatatataatgcatgaccacagagtcacttctgtcacatcagacacctactctgtgca actacagatgactcctcaaactctgtaagaggccctgtaactaccaaggaaatattcaaggaaatcc gggactaaccactcagatggcaggtgagcttgctgggtacaatgtgcatccagtgaaactactatcca gattacagaccctccaagaataatcctatttaccacaagaagcttctgtgcaagacacttctgttcagaa acaaaactttgtgcatctacatcattacaagttaaaaataatcagctccaccttctacacagacctacc atcaaaagcgcctgtacctgtgctcatatcagatgctgcaaaaccagcaaaagactcctcctccc ccttacagctgtagatatggaagccaacatgtgcaa(Δaattctca)gtctgtttctagacacttgcc ctgtggaagttcctcagagttcagaaatgcactcgtctgaaaaaagaaagatgcttcaaaagctttc aacagcagtgagcagagcactagtaaaaatgtcagtagcaatagggaaattctgtgagttgaaaattaat acaaaacagcttacaatgactctgctggctcttctgggatggtgtcactctgttcaaaataatcaa gaagaaagaaagtattctataatccaagtacaatcaatactagacacaaatgtcacaagaaagaa ag (SEQ ID NO: 70)</p>

<p>Δ20</p>	<p>atgaattggaatgcaaaaccagagaatgctgccccaaaccaccatattctaaagccagctgctctt ttgcagcagttttaaagcctccacaacttctcaaagttcttcagctgctccccacataaccaagaagcat gcataatcccactaattcaaatcagtttcacagccacttctgaacgctcaggagttcataaatctccga tctctgtttctaattgcatataataggacagttgtggcctcacagacctcagtagaaagagtcacataata aatgtaaaggagcccaacaaccaaccacaatttgcaaacagtgcttctggagttgtgcaaatgc ctggatgaattcaacaatgaggaattttatgccttctcttacagaggcaaccataatctcataaacctgatg gtgggcttagtatgcatatataatgcatgaccacagagtcattctgtcacatcagacacctactctgtgca actacagatgactcctcaaactctgtaagaggccctgtaacttaccaggaaattcaaggaaatcc gggacttaaccactcagatggcaggtgagcttggctgggtacaatgtgcatccagtgaaacttactatcca gattacagaccactccaaagcaatattctattaccacaagccttggcaagacacttctgttcagaa acaaaacttgtgtcatctacatcattacaagttaaaaataatcagcttccaccttctacacagacctacc atcaaagcgccctgtacctgtgctcatatcagatgctgcagaaaccagcaaaagactccctcccc cccttacagctgtagatatggaagccaacatgt(Δgcaaaattctcagctctg =SEQ IDNO:71)ctagacacttgccctgtggaagttcctcagagttcagaaatgcactcgtctgaaaaaag aaagatgcttacaagcttccaacagcagtgccagagcactagtaaaaatgtcagtacaataggaa aattctgtgagttgaaaattaatacaaaacagcttacaatgactctgctggctctctggggatggtgtca tactctgttcaaaataatcaagaagaagaagaaagtattctataatccaagtacaatcaatactagac acaaatgtcacaagaaaag (SEQ ID NO: 72)</p>
<p>Δ59 más inserciones de nucleótidos "C" y "A"</p>	<p>atgaattggaatgcaaaaccagagaatgctgccccaaaccaccatattctaaagccagctgctctt ttgcagcagttttaaagcctccacaacttctcaaagttcttcagctgctccccacataaccaagaagcat gcataatcccactaattcaaatcagtttcacagccacttctgaacgctcaggagttcataaatctccga tctctgtttctaattgcatataataggacagttgtggcctcacagacctcagtagaaagagtcacataata aatgtaaaggagcccaacaaccaaccacaatttgcaaacagtgcttctggagttgtgcaaatgc ctggatgaattcaacaatgaggaattttatgccttctcttacagaggcaaccataatctcataaacctgatg gtgggcttagtatgcatatataatgcatgaccacagagtcattctgtcacatcagacacctactctgtgca actacagatgactcctcaaactctgtaagaggccctgtaacttaccaggaaattcaaggaaatcc gggacttaaccactcagatggcaggtgagcttggctgggtacaatgtgcatccagtgaaacttactatcca gattacagaccactccaaagcaatattctattaccacaagccttggcaagacacttctgttcagaa acaaaacttgtgtcatctacatcattacaagttaaaaataatcagcttccaccttctacacagacctacc atcaaagcgccctgtacctgtgctcatatcagatgctgcagaaaccagcaaaagactccctcccc cccCttacagctgtagatatggaagc(Δcaacatgtgcaaaattctcagctctgttctagacacttg cctgtggaagttcctcagag=SEQIDNO:73)Attcagaaatgcactcgtctgaaaaaagaaa gatgcttacaagcttccaacagcagtgccagagcactagtaaaaatgtcagtacaataggaaaattc tgtgagttgaaaattaatacaaaacagcttacaatgactctgctggctctctggggatggtgtcactc ttgtcaaaataatcaagaagaagaagaaagtattctataatccaagtacaatcaatactagacacaa atgtcacaagaaaag (SEQ ID NO: 74)</p>

Tabla 18: Secuencias de aminoácidos parciales de C12orf35 de CHO WT y clones KO. Un asterisco * representa el primer codón de parada que se produce debido a las respectivas mutaciones de desplazamiento del marco. Debido a la eliminación de 8 pb con respecto a 20 pb para los clones "Δ8" con respecto a "Δ20", aún están presentes únicamente partes de las traducciones que están en el marco de los sitios de unión de TALEN y se marcan en negrita. El clon "Δ59 más inserciones de nucleótidos "C" y "A" ya no muestra sitio de unión de TALEN debido a la inserción del nucleótido C antes del sitio de unión de TALEN y el desplazamiento del marco resultante.

5

WT	MNWNAPENAAPNPPYSKSSLLQQFLMPSTTSQSSFSCLPHNQ EACIYPTNSNSVSQPLLNVRSFINPPISVSNVHNRTVVASQTSVERV TYTNVKGAAQPNHNLQTVSSGVVQNAWMNSTMRNFMPSLTEATIS HKPDGGPSMPYMHAPQSHLVTSDTYSVQLQMTSPNSVSRGPVTYQ GNYQGNPGLNHSMAGELGWVQCASSELTPDYRPPPKQYPYLPQ SFVQDTSVQKQNFVSSTSLQVKNNQLPPSTQTLPSKRPVPVSSYQ YAAETSKRLPPPPYSCRY GSQHVQNSQSVSRHLPVEVPQSSEMHS SEKKKDAYKVFQQWQSTSKNVSTIGKFCELKINTKQSYNDSAGSS GDGVHTLVQNNQEERKYSYNPSTNQILDNTVTKKEK (SEQ ID NO: 75)
Δ8	MNWNAPENAAPNPPYSKSSLLQQFLMPSTTSQSSFSCLPHNQ EACIYPTNSNSVSQPLLNVRSFINPPISVSNVHNRTVVASQTSVERV TYTNVKGAAQPNHNLQTVSSGVVQNAWMNSTMRNFMPSLTEATIS HKPDGGPSMPYMHAPQSHLVTSDTYSVQLQMTSPNSVSRGPVTYQ GNYQGNPGLNHSMAGELGWVQCASSELTPDYRPPPKQYPYLPQ SFVQDTSVQKQNFVSSTSLQVKNNQLPPSTQTLPSKRPVPVSSYQ YAAETSKRLPPPPYSCRY GSQHVQVCF* (SEQ ID NO: 76)
Δ20	MNWNAPENAAPNPPYSKSSLLQQFLMPSTTSQSSFSCLPHNQ EACIYPTNSNSVSQPLLNVRSFINPPISVSNVHNRTVVASQTSVERV TYTNVKGAAQPNHNLQTVSSGVVQNAWMNSTMRNFMPSLTEATIS HKPDGGPSMPYMHAPQSHLVTSDTYSVQLQMTSPNSVSRGPVTYQ GNYQGNPGLNHSMAGELGWVQCASSELTPDYRPPPKQYPYLPQ SFVQDTSVQKQNFVSSTSLQVKNNQLPPSTQTLPSKRPVPVSSYQ YAAETSKRLPPPPYSCRY GSQHV* (SEQ ID NO: 77)
Δ59 más inserciones de nucleótidos "C" y "A"	MNWNAPENAAPNPPYSKSSLLQQFLMPSTTSQSSFSCLPHNQ EACIYPTNSNSVSQPLLNVRSFINPPISVSNVHNRTVVASQTSVERV TYTNVKGAAQPNHNLQTVSSGVVQNAWMNSTMRNFMPSLTEATIS HKPDGGPSMPYMHAPQSHLVTSDTYSVQLQMTSPNSVSRGPVTYQ GNYQGNPGLNHSMAGELGWVQCASSELTPDYRPPPKQYPYLPQ SFVQDTSVQKQNFVSSTSLQVKNNQLPPSTQTLPSKRPVPVSSYQ YAAETSKRLPPPLQL* (SEQ ID NO: 78)

5 Para confirmar los resultados de los experimentos de ARNip, se expresó un anticuerpo candidato en tres clones celulares de supresión de C12orf35 en un cultivo discontinuo y de lote alimentado y se analizaron los valores cuantitativos de anticuerpo volumétricos y se compararon con los resultados obtenidos con una línea celular de tipo silvestre CHO correspondiente que expresa de forma endógena C12orf35 intacto.

8.4 Transfección del vector codificante de mAb

10 La línea celular de tipo silvestre CHO, C8DEL y los clones celulares CHO de supresión de C12orf35 descritos anteriormente (véanse las tablas 17 y 18) se transfectaron con vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos monoclonales (mAb) y dos genes marcadores de selección, concretamente neo y DHFR. Se evaluaron dos vectores que codificaban dos anticuerpos ejemplares diferentes (anticuerpo 1 y anticuerpo 2). Para la transfección, las células se cultivaron hasta la fase exponencial y se transfectaron 5×10^6 células con $3 \mu\text{g}$ de vector de ADN. Se realizaron tres réplicas de transfección. Se realizó selección de células transfectadas de forma estable con los vectores que codifican la proteína de interés con G418 (concentración de G418 de 0,8 mg/ml) seguida de selección con MTX (500 nM). Las condiciones de selección fueron idénticas para todas las combinaciones. Durante el proceso de selección, se determinaron los valores cuantitativos volumétricos del mAb expresado en el medio. El valor cuantitativo volumétrico en el sobrenadante de los clones de supresión de C12orf35 se comparó con el valor cuantitativo volumétrico de CHO de tipo silvestre. Las células se cultivaron en agitadores que contenían un medio químico definido. El cultivo discontinuo se realizó a temperatura de 37°C y en condiciones de agitación. Durante el cultivo de lote alimentado las células se cultivaron en agitadores que contenían un medio químico definido enriquecido de aminoácidos. El cultivo de lote alimentado se realizó a temperatura de 37°C y en agitación, y se realizó un cambio de temperatura en el día 5 hasta 33°C . Además, se añadió regularmente un suministro que contenía glucosa y aminoácidos a lo largo del proceso. Durante el proceso de cultivo de lote alimentado, se recogieron regularmente muestras del material de cultivo de lote alimentado para determinar la densidad de células viables (vcd) usando un analizador de viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter) y para determinar los valores cuantitativos de proteína en el medio de cultivo celular. Al final del lote y el lote alimentado (día 14), se detuvo el proceso de cultivo. El análisis de los cultivos discontinuos y de lote alimentado reveló que durante el periodo de cultivo de 14 días, el valor cuantitativo volumétrico de mAb expresado en el medio de cultivo de las combinaciones C12orf35 KO era similar al valor cuantitativo volumétrico de C8DEL y significativamente mayor que en el medio de cultivo de combinaciones celulares de tipo silvestre CHO.

15

20

25

30

5 Después de la primera etapa de selección (selección con G418) pudo detectarse un aumento masivo del valor cuantitativo volumétrico (4-10 veces) para las combinaciones de C12orf35 KO transfectadas de forma estable en comparación con las combinaciones precursoras transfectadas de forma estable. Después de la segunda etapa de selección (selección con MTX) las combinaciones de C12orf35 KO estaban expresando 4-7 veces más polipéptido de interés en comparación con las células precursoras transfectadas (lote) y 2-6 veces más polipéptido (lote alimentado). Se presentan los valores cuantitativos volumétricos con G418 y MTX (lote alimentado) de combinaciones de C12orf35 KO en comparación con la línea celular CHO precursora para los proyectos de anticuerpo ejemplares 1 y 2 en las siguientes tablas 19 y 20. Las tablas 19 y 20 muestran el valor cuantitativo (anticuerpo) volumétrico de la combinación de lote y lote alimentado de G418 y MTX producido en combinaciones de C12orf35 KO en comparación con las combinaciones precursoras (se muestra promedio de 3 combinaciones/condición).

Tabla 19: Valores cuantitativos de combinación como se ejemplifica por el anticuerpo 1

Línea celular	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX (lote)	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX (lote alimentado)
Línea celular precursora derivada de CHO-K1	0,04 g/L	0,28 g/L	1,49 g/L
C8DEL	0,72 g/L	1,12 g/L	4,18 g/L
C12orf35 KO 1	0,41 g/L	1,16 g/L	4,38 g/L
C12orf35 KO 2	0,41 g/L	1,19 g/L	3,65 g/L
C12orf35 KO 3	0,45 g/L	1,16 g/L	4,25 g/L

15 **Tabla 20: Valores cuantitativos de combinación como se ejemplifica por el anticuerpo 2**

Línea celular	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX (lote)	Valor cuantitativo de combinación después de selección con G418 y MTX (lote alimentado)
Línea celular precursora derivada de CHO-K1	0,03 g/L	0,06 g/L	0,27 g/L
C8DEL	0,22 g/L	0,39 g/L	1,37 g/L
C12orf35 KO 1	0,15 g/L	0,39 g/L	1,51 g/L
C12orf35 KO 2	0,14 g/L	0,40 g/L	1,63 g/L
C12orf35 KO 3	0,12 g/L	0,30 g/L	1,26 g/L

Los resultados respaldan la conclusión de que la pérdida de función de C12orf35 está correlacionada con mayor productividad volumétrica.

20 Además, pudo detectarse un tiempo de selección más corto (etapas de G418 y MTX) para las combinaciones de C12orf35 KO transfectadas de forma estable en comparación con las combinaciones precursoras transfectadas de forma estable. El tiempo de selección fue, de promedio, 7 días más corto para las combinaciones de C12orf35 KO.

ES 2 758 504 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Células eucariotas novedosas y métodos para expresar de forma recombinante un producto de interés

<130> PAT056008-WO-PCT

<150> US 61/919313

<151> 2013-12-20

<160> 78

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1547

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

```

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Asn Ala Ala Pro Asn Pro Pro Tyr
1          5          10          15

Ser Lys Ser Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln Phe Leu Met Pro Ser Thr
          20          25          30

Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Cys Leu Pro His Asn Gln Glu Ala Cys
          35          40          45

Ile Tyr Pro Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn Val
          50          55          60

Arg Ser Phe Ile Asn Pro Pro Ile Ser Val Ser Asn Val His Asn Arg
65          70          75          80

Thr Val Val Ala Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Val Thr Tyr Thr Asn
          85          90          95

Val Lys Gly Ala Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
          100          105          110

Gly Val Val Gln Asn Ala Trp Met Asn Ser Thr Met Arg Asn Phe Met
          115          120          125

Pro Ser Leu Thr Glu Ala Thr Ile Ser His Lys Pro Asp Gly Gly Pro
          130          135          140

Ser Met Pro Tyr Met His Ala Pro Gln Ser His Leu Val Thr Ser Asp
145          150          155          160

```

ES 2 758 504 T3

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

ES 2 758 504 T3

Lys Ile Lys Ile Asn Lys Lys Leu Leu Met Ala Ala Gly Cys Ser Lys
 420 425 430

Thr Ala Asn Thr Ser Tyr Thr Glu Pro Thr Arg His Ser Glu Phe Ser
 435 440 445

Ala Lys Glu Met Ser Ala Lys Arg Asp Asn Gln Cys Ser Met Glu Leu
 450 455 460

Leu Ala Thr Cys Leu Ser Leu Trp Lys Asn Gln Pro Pro Lys Thr Thr
 465 470 475 480

Glu Glu Asn Val Ser Lys Pro Leu Glu Glu Lys Gln Tyr Asn Ala Ser
 485 490 495

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

His Val Lys Asn Phe Cys Ser Gly Val Arg Asn Ser Gln Lys Ile Thr
 515 520 525

Thr Ser Ser Gln Thr Val Leu Ser Val Leu Thr Pro Val Tyr Asp Ser
 530 535 540

Ser Asp Val Ala Val Gly Lys Gly Thr Glu Leu Gln Ile Ala Val Val
 545 550 555 560

Ser Pro Leu Ile Leu Ser Asp Val Ser Thr Val Pro Gly Lys Glu Leu
 565 570 575

Ala Pro Glu Val Val Ser Glu Thr Val Tyr Pro Val Val Lys Glu Gly
 580 585 590

Ser Val Cys Ser Leu Gln Asn Gln Gln Ala Glu Asn Ala Thr Val Thr
 595 600 605

Ala Gly Leu Pro Phe Asp Val Ile Arg Ala Val Ala Ser Ala Thr Val
 610 615 620

Ser Ala Glu Leu Ser Leu Pro Gly His Lys Glu Lys Gln His Lys Pro
 625 630 635 640

Thr Gln Ser Asp Leu Asp Ile Ala Asp Gly Ser Leu Gly Lys His Ser
 645 650 655

Pro Gln Gly Ala Glu Ala Leu Pro Asn Pro Arg Asp Ser Thr Ile Val
 660 665 670

ES 2 758 504 T3

Ser Gly Pro Ile Leu Gln Ile Glu Ser Ile Cys Ser Leu Ala Glu Gly
675 680 685

Asp Val Ser Tyr Asn Ser Gln Ile Ala Glu Ile Phe Asn Ser Val Gln
690 695 700

Asn Glu Pro Gln Lys Pro Ser Pro Asp Gln Gln Val Ile Asn Ser Gln
705 710 715 720

Gln Glu Glu Gln Val Asp Lys Val Ala Glu Asn Lys Asp Leu Ser Phe
725 730 735

Leu Lys Asp Lys Cys Met Gln Cys Thr Asp Val Pro His Glu Val Thr
740 745 750

Glu Gln Pro Glu Pro Leu Gln Pro Leu Glu Thr Thr Ser Asp Glu Tyr
755 760 765

Val Glu Ala Asn Gly Glu Ile Leu Glu Glu Ser Ser Lys Glu Asn Pro
770 775 780

Gly Glu Lys Glu Met Thr Lys Asp Ile Leu Cys Ser Pro Ala Ala Val
785 790 795 800

Gln Gln Asp Pro Gln Pro Gln Glu Ile Asp Thr Ala Ser Ser Lys Ser
805 810 815

Gly His Ser Phe Ser Thr Val Asn Glu Ile Asn Asp Glu Asn Glu Pro
820 825 830

Val Ser Tyr Leu His Asp Gln Leu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Phe Pro
835 840 845

Tyr Gly Ile Glu Thr Ile Ala Arg Pro Glu Val Tyr Val Gly Gln Gln
850 855 860

Lys Thr His Glu Ile Leu Glu Asn Gln Thr Gly Ser Lys Thr Gly Asn
865 870 875 880

Val Ser Gly Asp Asn Thr Asp Gln Ile Lys Ile Thr Val Leu Asn Ser
885 890 895

Glu Gln Ile Lys Glu Leu Phe Pro Glu Glu Asp Gln Pro Cys Asp Val
900 905 910

Asp Lys Leu Ala Glu Pro Glu Asn Thr Lys Ile Ile Ala Glu Val Lys

ES 2 758 504 T3

Val Gln Ser Val Ser Pro Glu Lys Lys Lys Leu Lys Phe Lys Ser
 1160 1165 1170

Gly Ser Ser Lys Leu Lys Tyr Phe Glu Lys Arg Lys Met Asp His
 1175 1180 1185

Leu Leu Ile Ser Asp Val Glu Ile Lys Lys Lys Lys Tyr Glu Lys
 1190 1195 1200

Gln Glu Gln Asn Lys Asn Ala Gly Gly Thr Leu Lys Leu Cys Ser
 1205 1210 1215

Thr Leu Thr Glu Pro Asn Glu Arg Ala Cys Ala Lys Glu Lys Ile
 1220 1225 1230

Val Thr Asn Ser Glu Pro Ser Asp Ser Lys Gly Ser Ser Ser Lys
 1235 1240 1245

Ser Thr Arg Val Ile Thr Val Gln Glu Tyr Leu Gln Arg Lys Lys
 1250 1255 1260

Asp Lys His Val Ile Gly Asn Asn Ala Ser Lys Asn Ile Cys Val
 1265 1270 1275

Glu Asn Val Pro Cys Asp Ser Glu Pro Met Lys Ser Ser Lys His
 1280 1285 1290

Ser Ala Ser Pro Ser Leu Gly Lys Leu Ile Glu Gly Gln Gly Val
 1295 1300 1305

Ser Ala Glu Thr Leu Lys Glu Val Glu His Asn Ser Thr Ser His
 1310 1315 1320

Gly Lys Asn Leu Lys Thr His Arg Ser Glu Glu Thr Arg Pro Tyr
 1325 1330 1335

Ser Val Ser Asn Ser Lys Glu Lys Phe Tyr Arg Thr His Pro Asp
 1340 1345 1350

Lys Ser Tyr Ile Asp Lys Ala Lys Leu Glu Arg Leu Thr Ser Met
 1355 1360 1365

Ser Ser Lys Ser Ser Gln Leu Gln Val Lys Glu Lys Arg Lys Gln
 1370 1375 1380

Tyr Leu Asn Arg Val Ala Phe Lys Cys Thr Glu Gln Glu Ser Ile
 1385 1390 1395

ES 2 758 504 T3

Cys Leu Thr Lys Leu Asp Ser Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Glu
 1400 1405 1410

Lys Glu Lys Ser Thr Ala Cys Ala Pro Met Thr Lys Asp Tyr Thr
 1415 1420 1425

His Lys Pro Met Leu Glu Phe Lys Leu Cys Pro Asp Val Leu Leu
 1430 1435 1440

Lys Asn Thr Ser Ser Ile Asp Lys Gly Asp Asp Pro Arg Pro Gly
 1445 1450 1455

Pro Glu Lys Glu Arg Ala Pro Val Gln Val Ser Gly Ile Lys Thr
 1460 1465 1470

Thr Lys Glu Asp Trp Leu Lys Cys Ile Pro Thr Arg Thr Lys Met
 1475 1480 1485

Pro Glu Ser Ser Glu Gln Thr Asp Arg Ala Asp Ser Arg Leu Ser
 1490 1495 1500

Lys Arg Ser Phe Ser Ala Asp Glu Phe Glu Thr Leu Gln Asn Pro
 1505 1510 1515

Val Lys Asp Ser Asn Val Met Phe Arg Thr Phe Lys Lys Met Tyr
 1520 1525 1530

Leu Glu Lys Arg Ser Arg Ser Leu Gly Ser Ser Pro Val Lys
 1535 1540 1545

<210> 2
 <211> 1515
 <212> PRT
 <213> Cricetinae gen. sp.

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (879)..(879)

<400> 2
 Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Asn Ala Ala Pro Asn Pro Pro Tyr
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln Phe Leu Met Pro Ser Thr
 20 25 30
 Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Cys Leu Pro His Asn Gln Glu Ala Cys
 35 40 45

ES 2 758 504 T3

Ile Tyr Pro Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn Val
50 55 60

Arg Ser Phe Ile Asn Pro Pro Ile Ser Val Ser Asn Val His Asn Arg
65 70 75 80

Thr Val Val Ala Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Val Thr Tyr Thr Asn
85 90 95

Val Lys Gly Ala Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
100 105 110

Gly Val Val Gln Asn Ala Trp Met Asn Ser Thr Met Arg Asn Phe Met
115 120 125

Pro Ser Leu Thr Glu Ala Thr Ile Ser His Lys Pro Asp Gly Gly Pro
130 135 140

Ser Met Pro Tyr Met His Ala Pro Gln Ser His Leu Val Thr Ser Asp
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Gln Met Thr Pro Ser Asn Ser Val Arg Gly
165 170 175

Pro Val Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gln Gly Asn Pro Gly Leu Asn His
180 185 190

Ser Met Ala Gly Glu Leu Gly Trp Val Gln Cys Ala Ser Ser Glu Leu
195 200 205

Thr Tyr Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro
210 215 220

Gln Ser Phe Val Gln Asp Thr Ser Val Gln Lys Gln Asn Phe Val Ser
225 230 235 240

Ser Thr Ser Leu Gln Val Lys Asn Asn Gln Leu Pro Pro Ser Thr Gln
245 250 255

Thr Leu Pro Ser Lys Arg Pro Val Pro Val Ser Ser Tyr Gln Tyr Ala
260 265 270

Ala Glu Thr Ser Lys Arg Leu Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Cys Arg Tyr
275 280 285

Gly Ser Gln His Val Gln Asn Ser Gln Ser Val Ser Arg His Leu Pro

ES 2 758 504 T3

Glu Leu Ala Pro Glu Val Val Ser Glu Thr Val Tyr Pro Val Val Lys
 545 550 555 560
 Glu Gly Ser Val Cys Ser Leu Gln Asn Gln Gln Ala Glu Asn Ala Thr
 565 570 575
 Val Thr Ala Gly Leu Pro Phe Asp Val Ile Arg Ala Val Ala Ser Ala
 580 585 590
 Thr Val Ser Ala Glu Leu Ser Leu Pro Gly His Lys Glu Lys Gln His
 595 600 605
 Lys Pro Thr Gln Thr Asp Leu Asp Thr Ala Asp Gly Ser Leu Gly Lys
 610 615 620
 His Ser Pro Gln Gly Ala Glu Ala Leu Pro Asn Pro Arg Asp Ser Thr
 625 630 635 640
 Ile Val Ser Gly Pro Ile Leu Gln Ile Glu Ser Ile Cys Ser Leu Ala
 645 650 655
 Glu Gly Asp Val Ser Tyr Asn Ser Gln Ile Ala Glu Ile Phe Asn Ser
 660 665 670
 Val Gln Asn Glu Pro Gln Lys Pro Ser Pro Asp Gln Gln Val Ile Asn
 675 680 685
 Ser Gln Gln Glu Glu Gln Val Asp Lys Val Ala Glu Asn Lys Asp Leu
 690 695 700
 Ser Phe Leu Lys Asp Lys Cys Met Gln Cys Thr Asp Val Pro His Glu
 705 710 715 720
 Val Thr Glu Gln Pro Glu Pro Leu Gln Pro Leu Glu Thr Thr Ser Asp
 725 730 735
 Glu Tyr Val Glu Ala Asn Gly Glu Ile Leu Glu Glu Ser Ser Lys Glu
 740 745 750
 Asn Pro Gly Glu Lys Glu Met Thr Lys Asp Ile Leu Cys Ser Pro Ala
 755 760 765
 Ala Val Gln Gln Asp Pro Gln Pro Gln Glu Ile Asp Thr Ala Ser Ser
 770 775 780
 Lys Ser Gly His Ser Phe Ser Thr Val Asn Glu Ile Asn Asp Glu Asn
 785 790 795 800

ES 2 758 504 T3

Glu Pro Val Ser Tyr Leu His Asp Gln Leu Leu Glu Leu Leu Lys Glu
 805 810 815

Phe Pro Tyr Gly Ile Glu Thr Ile Ala Arg Pro Glu Val Tyr Val Gly
 820 825 830

Gln Gln Lys Thr His Glu Ile Leu Glu Asn Gln Thr Gly Ser Lys Thr
 835 840 845

Gly Asn Val Ser Gly Asp Asn Thr Asp Gln Ile Lys Ile Thr Val Leu
 850 855 860

Asn Ser Glu Gln Ile Lys Glu Leu Phe Pro Glu Glu Asp Gln Xaa Val
 865 870 875 880

Asp Lys Leu Ala Glu Pro Glu Asn Thr Lys Ile Ile Ala Glu Val Lys
 885 890 895

Ser Leu Cys Asp Ser Gln Val Pro Arg Glu Glu Ser His Asn Pro Gly
 900 905 910

Met Leu Asp Leu Glu Lys Asp Lys Ile His Cys Cys Ala Leu Gly Trp
 915 920 925

Leu Ser Met Val Tyr Glu Gly Val Pro Gln Cys Gln Cys Ser Ser Met
 930 935 940

Glu Glu Lys Glu Lys Asp Gln Cys Ser Leu Glu Ile Ser Asn Cys Lys
 945 950 955 960

Gln Gly Glu Gln Ala Cys Asn Ser Gly Ile Thr Ile Phe Glu Ile Asn
 965 970 975

Pro Ile Ser Asn Asn Ser Lys Ser Pro Leu Ile Gln Glu Ser Glu Lys
 980 985 990

Gly His Phe Ser Asp Ile His Gly Glu Lys Ile Lys Thr Ser Glu Thr
 995 1000 1005

Lys Asn Ser Ser Ser Pro Arg Val Glu Gln Glu Leu Thr Gly His
 1010 1015 1020

Phe Ser Met Lys Cys Tyr Gln Lys Asp Lys Ser Thr Thr Lys Gln
 1025 1030 1035

Asp Ser Ser Leu Lys Thr Glu Gln Lys Ile Lys Asn Leu Ser Ser
 1040 1045 1050

ES 2 758 504 T3

Lys Cys Asp Lys Pro Asn Pro Leu Lys Ser Ser Lys Ile Pro Thr
 1055 1060 1065
 Pro Glu Thr Phe Asn Val Val Thr Ser Asn Ser Asp Lys Asn Met
 1070 1075 1080
 Pro Ala Phe Ser Lys Gln Asp Ser Gln Gly Ser Leu Gln Lys Lys
 1085 1090 1095
 His Leu Phe Gln Asp Ser Asp Pro Val Lys Gly His Val Trp Leu
 1100 1105 1110
 Leu Pro Asn Lys Asp Pro Arg Arg Arg Asn Thr Phe Leu Val Gln
 1115 1120 1125
 Ser Val Ser Pro Glu Lys Lys Lys Leu Lys Phe Lys Ser Gly Ser
 1130 1135 1140
 Ser Lys Leu Lys Tyr Phe Glu Lys Arg Lys Met Asp His Leu Leu
 1145 1150 1155
 Ile Ser Asp Val Glu Ile Lys Lys Lys Lys Tyr Glu Lys Gln Glu
 1160 1165 1170
 Gln Asn Lys Asn Ala Gly Gly Thr Leu Lys Leu Cys Ser Thr Leu
 1175 1180 1185
 Thr Glu Pro Asn Glu Arg Ala Cys Ala Lys Glu Lys Ile Val Thr
 1190 1195 1200
 Asn Ser Glu Pro Ser Asp Ser Lys Gly Ser Ser Ser Lys Ser Thr
 1205 1210 1215
 Arg Val Ile Thr Val Gln Glu Tyr Leu Gln Arg Lys Lys Asp Lys
 1220 1225 1230
 His Val Ile Gly Asn Asn Ala Ser Lys Asn Ile Cys Val Glu Asn
 1235 1240 1245
 Val Pro Cys Asp Ser Glu Pro Met Lys Ser Ser Lys His Ser Ala
 1250 1255 1260
 Ser Pro Ser Leu Gly Lys Leu Ile Glu Gly Gln Gly Val Ser Ala
 1265 1270 1275
 Glu Thr Leu Lys Glu Val Glu His Asn Ser Ser Ser His Gly Lys

ES 2 758 504 T3

Met Asn Trp Asn Glu Lys Pro Lys Ser Ala Thr Leu Pro Pro Leu Tyr
1 5 10 15

Pro Lys Ser Gln Pro Pro Phe Leu His Gln Ser Leu Ile Asn Gln Ile
20 25 30

Thr Thr Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Tyr Pro Gly Ser Asn Gln Glu
35 40 45

Ala Cys Met Tyr Pro Gly Asn Ser Asn Pro Ile Ser Gln Pro Leu Leu
50 55 60

Asn Ile Gln Asn Tyr Pro Gln Gln Ile Ser Val Ser Asp Met His Asn
65 70 75 80

Gly Thr Val Val Ala Ser His Thr Ser Val Glu Arg Ile Thr Tyr Ala
85 90 95

Asn Val Asn Gly Pro Lys Gln Leu Thr His Asn Leu Gln Met Ser Ser
100 105 110

Gly Val Thr Gln Asn Val Trp Leu Asn Ser Pro Met Arg Asn Pro Val
115 120 125

His Ser His Ile Gly Ala Thr Val Ser His Gln Thr Asp Phe Gly Ala
130 135 140

Asn Val Pro Asn Met Pro Ala Leu Gln Ser Gln Leu Ile Thr Ser Asp
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Met Gln Met Gln Met Ile Pro Ser Asn Ser Thr Arg Leu
165 170 175

Pro Val Ala Tyr Gln Gly Asn Gln Gly Leu Asn Gln Ser Phe Ser Glu
180 185 190

Gln Gln Val Asp Trp Thr Gln Gln Cys Ile Ser Lys Gly Leu Thr Tyr
195 200 205

Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Leu Tyr Arg Tyr Ser Pro Gln Ser
210 215 220

ES 2 758 504 T3

Phe Leu Pro Asp Ser Thr Ile Gln Lys Gln Asn Phe Ile Pro His Thr
 225 230 235 240
 Ser Leu Gln Val Lys Asn Ser Gln Leu Leu Asn Ser Val Leu Thr Leu
 245 250 255
 Pro Ser Arg Gln Thr Ser Ala Val Pro Ser Gln Gln Tyr Ala Thr Gln
 260 265 270
 Thr Asp Lys Arg Pro Pro Pro Pro Tyr Asn Cys Arg Tyr Gly Ser
 275 280 285
 Gln Pro Leu Gln Ser Thr Gln His Ile Thr Lys His Leu Ser Met Glu
 290 295 300
 Val Pro Gln Ser Arg Glu Met Leu Ser Ser Glu Ile Arg Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Gln Gln Gln Trp Gln Asn Pro Asn Glu Asn Val Ser Thr Ile Gly Asn
 325 330 335
 Phe Thr Asn Leu Lys Val Asn Thr Asn Ser Lys Gln Pro Phe Asn Ser
 340 345 350
 Pro Ile Arg Ser Ser Val Asp Gly Val Gln Thr Leu Ala Gln Thr Asn
 355 360 365
 Glu Glu Lys Ile Met Asp Ser Cys Asn Pro Thr Ser Asn Gln Val Leu
 370 375 380
 Asp Thr Ser Val Ala Lys Glu Lys Leu Val Arg Asp Ile Lys Thr Leu
 385 390 395 400
 Val Glu Ile Lys Gln Lys Phe Ser Glu Leu Ala Arg Lys Ile Lys Ile
 405 410 415
 Asn Lys Asp Leu Leu Met Ala Ala Gly Cys Ile Lys Met Thr Asn Thr
 420 425 430
 Ser Tyr Ser Glu Pro Ala Gln Asn Ser Lys Leu Ser Leu Lys Gln Thr
 435 440 445
 Ala Lys Ile Gln Ser Gly Pro Gln Ile Thr Pro Val Met Pro Glu Asn
 450 455 460
 Ala Glu Arg Gln Thr Pro Thr Val Val Glu Ser Ala Glu Thr Asn Lys
 465 470 475 480

ES 2 758 504 T3

Thr Gln Cys Met Leu Asn Ser Asp Ile Gln Glu Val Asn Cys Arg Arg
 485 490 495

Phe Asn Gln Val Asp Ser Val Leu Pro Asn Pro Val Tyr Ser Glu Lys
 500 505 510

Arg Pro Met Pro Asp Ser Ser His Asp Val Lys Val Leu Thr Ser Lys
 515 520 525

Thr Ser Ala Val Glu Met Thr Gln Ala Val Leu Asn Thr Gln Leu Ser
 530 535 540

Ser Glu Asn Val Thr Lys Val Glu Gln Asn Ser Pro Ala Val Cys Glu
 545 550 555 560

Thr Ile Ser Val Pro Lys Ser Met Ser Thr Glu Glu Tyr Lys Ser Lys
 565 570 575

Ile Gln Asn Glu Asn Met Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Gln Ala Arg
 580 585 590

Lys Thr Gln Lys Thr Val Leu Lys Asp Ala Asn Gln Thr Ile Gln Asp
 595 600 605

Ser Lys Pro Asp Ser Cys Glu Met Asn Pro Asn Thr Gln Met Thr Gly
 610 615 620

Asn Gln Leu Asn Leu Lys Asn Met Glu Thr Pro Ser Thr Ser Asn Val
 625 630 635 640

Ser Gly Arg Val Leu Asp Asn Ser Phe Cys Ser Gly Gln Glu Ser Ser
 645 650 655

Thr Lys Gly Met Pro Ala Lys Ser Asp Ser Ser Cys Ser Met Glu Val
 660 665 670

Leu Ala Thr Cys Leu Ser Leu Trp Lys Lys Gln Pro Ser Asp Thr Ala
 675 680 685

Lys Glu Lys Glu Cys Asp Lys Leu Arg Thr Asn Thr Thr Ala Val Gly
 690 695 700

Ile Ser Lys Pro Ala Asn Ile His Val Lys Ser Pro Cys Ser Val Val
 705 710 715 720

Gly Asn Ser Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ser Asn Pro Ser Gln Gln Thr
 725 730 735

ES 2 758 504 T3

Ala Leu Ser Met Val Met His Asn Tyr Glu Ser Ser Gly Ile Asn Ile
740 745 750

Thr Lys Gly Thr Glu Leu Gln Ile Ala Val Val Ser Pro Leu Val Leu
755 760 765

Ser Glu Val Lys Thr Leu Ser Val Lys Gly Ile Thr Pro Ala Val Leu
770 775 780

Pro Glu Thr Val Tyr Pro Val Ile Lys Glu Gly Ser Val Cys Ser Leu
785 790 795 800

Gln Asn Gln Leu Ala Glu Asn Ala Lys Ala Thr Ala Ala Leu Lys Val
805 810 815

Asp Val Ser Gly Pro Val Ala Ser Thr Ala Thr Ser Thr Lys Ile Phe
820 825 830

Pro Leu Thr Gln Lys Glu Lys Gln Asn Glu Ser Thr Asn Gly Asn Ser
835 840 845

Glu Val Thr Pro Asn Val Asn Gln Gly Lys His Asn Lys Leu Glu Ser
850 855 860

Ala Ile His Ser Pro Met Asn Asp Gln Gln Ile Ser Gln Glu Ser Arg
865 870 875 880

Asn Ser Thr Val Val Ser Ser Asp Thr Leu Gln Ile Asp Asn Ile Cys
885 890 895

Ser Leu Val Glu Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Gln Ile Ala Lys Ile
900 905 910

Phe Ser Ser Leu Pro Leu Lys Met Val Glu Pro Gln Lys Pro Ser Leu
915 920 925

Pro Asn Gln Gln Gly Ile Gly Ser Arg Glu Pro Glu Lys Gln Leu Asp
930 935 940

Asn Thr Thr Glu Asn Lys Asp Phe Gly Phe Gln Lys Asp Lys Pro Val
945 950 955 960

Gln Cys Thr Asp Val Ser His Lys Ile Cys Asp Gln Ser Lys Ser Glu
965 970 975

Pro Pro Leu Glu Ser Ser Phe Asn Asn Leu Glu Thr Asn Arg Val Ile

ES 2 758 504 T3

Glu Arg Thr Ser Asp Arg Asp Val Thr Val Val Gln Phe Lys Ser
 1220 1225 1230

 Leu Val Asn Asn Pro Lys Thr Pro Pro Asp Gly Lys Ser His Phe
 1235 1240 1245

 Pro Glu Leu Gln Asp Asp Ser Arg Lys Asp Thr Pro Lys Thr Lys
 1250 1255 1260

 His Lys Ser Leu Pro Arg Thr Glu Gln Glu Leu Val Ala Gly Gln
 1265 1270 1275

 Phe Ser Ser Lys Cys Asp Lys Leu Asn Pro Leu Gln Asn His Lys
 1280 1285 1290

 Arg Lys Lys Leu Arg Phe His Glu Val Thr Phe His Ser Ser Asn
 1295 1300 1305

 Lys Met Thr Ala Ser Tyr Glu Gln Ala Ser Gln Glu Thr Arg Gln
 1310 1315 1320

 Lys Lys His Val Thr Gln Asn Ser Arg Pro Leu Lys Thr Lys Thr
 1325 1330 1335

 Ala Phe Leu Pro Asn Lys Asp Val Tyr Lys Lys His Ser Ser Leu
 1340 1345 1350

 Gly Gln Ser Leu Ser Pro Glu Lys Ile Lys Leu Lys Leu Lys Ser
 1355 1360 1365

 Val Ser Phe Lys Gln Lys Arg Lys Leu Asp Gln Gly Asn Val Leu
 1370 1375 1380

 Asp Met Glu Val Lys Lys Lys Lys His Asp Lys Gln Glu Gln Lys
 1385 1390 1395

 Gly Ser Val Gly Ala Thr Phe Lys Leu Gly Asp Ser Leu Ser Asn
 1400 1405 1410

 Pro Asn Glu Arg Ala Ile Val Lys Glu Lys Met Val Ser Asn Thr
 1415 1420 1425

 Lys Ser Val Asp Thr Lys Ala Ser Ser Ser Lys Phe Ser Arg Ile
 1430 1435 1440

 Leu Thr Pro Lys Glu Tyr Leu Gln Arg Gln Lys His Lys Glu Ala
 1445 1450 1455

ES 2 758 504 T3

Leu Ser Asn Lys Ala Ser Lys Lys Ile Cys Val Lys Asn Val Pro
 1460 1465 1470

Cys Asp Ser Glu His Met Arg Pro Ser Lys Leu Ala Val Gln Val
 1475 1480 1485

Glu Ser Cys Gly Lys Ser Asn Glu Lys His Ser Ser Gly Val Gln
 1490 1495 1500

Thr Ser Lys Glu Ser Leu Asn Gly Leu Thr Ser His Gly Lys Asn
 1505 1510 1515

Leu Lys Ile His His Ser Gln Glu Ser Lys Thr Tyr Asn Ile Leu
 1520 1525 1530

Arg Asn Val Lys Glu Lys Val Gly Gly Lys Gln Pro Asp Lys Ile
 1535 1540 1545

Trp Ile Asp Lys Thr Lys Leu Asp Lys Leu Thr Asn Ile Ser Asn
 1550 1555 1560

Glu Ala Gln Phe Ser Gln Met Pro Pro Gln Val Lys Asp Gln Lys
 1565 1570 1575

Lys Leu Tyr Leu Asn Arg Val Gly Phe Lys Cys Thr Glu Arg Glu
 1580 1585 1590

Ser Ile Ser Leu Thr Lys Leu Glu Ser Ser Pro Arg Lys Leu His
 1595 1600 1605

Lys Asp Lys Arg Gln Glu Asn Lys His Lys Thr Phe Leu Pro Val
 1610 1615 1620

Lys Gly Asn Thr Glu Lys Ser Asn Met Leu Glu Phe Lys Leu Cys
 1625 1630 1635

Pro Asp Ile Leu Leu Lys Asn Thr Asn Ser Val Glu Glu Arg Lys
 1640 1645 1650

Asp Val Lys Pro His Pro Arg Lys Glu Gln Ala Pro Leu Gln Val
 1655 1660 1665

Ser Gly Ile Lys Ser Thr Lys Glu Asp Trp Leu Lys Phe Val Ala
 1670 1675 1680

Thr Lys Lys Arg Thr Gln Lys Asp Ser Gln Glu Arg Asp Asn Val
 1685 1690 1695

ES 2 758 504 T3

Asn Ser Arg Leu Ser Lys Arg Ser Phe Ser Ala Asp Gly Phe Glu
 1700 1705 1710

Met Leu Gln Asn Pro Val Lys Asp Ser Lys Glu Met Phe Gln Thr
 1715 1720 1725

Tyr Lys Gln Met Tyr Leu Glu Lys Arg Ser Arg Ser Leu Gly Ser
 1730 1735 1740

Ser Pro Val Lys
 1745

<210> 4
 <211> 1747
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Trp Asn Glu Lys Pro Lys Ser Ala Thr Leu Pro Pro Leu Tyr
 1 5 10 15

Pro Lys Ser Gln Pro Pro Phe Leu His Gln Ser Leu Ile Asn Gln Ile
 20 25 30

Thr Thr Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Tyr Pro Gly Ser Asn Gln Glu
 35 40 45

Ala Cys Met Tyr Pro Gly Asn Ser Asn Pro Ile Ser Gln Pro Leu Leu
 50 55 60

Asn Ile Gln Asn Tyr Pro Gln Gln Ile Ser Val Ser Asp Met His Asn
 65 70 75 80

Gly Thr Val Val Ala Ser His Thr Ser Val Glu Arg Ile Thr Tyr Ala
 85 90 95

Asn Val Asn Gly Pro Lys Gln Leu Thr His Asn Leu Gln Met Ser Ser
 100 105 110

Gly Val Thr Gln Asn Val Trp Leu Asn Ser Pro Met Arg Asn Pro Val
 115 120 125

His Ser His Ile Gly Ala Thr Val Ser His Gln Thr Asp Phe Gly Ala
 130 135 140

Asn Val Pro Asn Met Pro Ala Leu Gln Ser Gln Leu Ile Thr Ser Asp
 145 150 155 160

ES 2 758 504 T3

Thr Tyr Ser Met Gln Met Gln Met Ile Pro Ser Asn Ser Thr Arg Leu
165 170 175

Pro Val Ala Tyr Gln Gly Asn Gln Gly Leu Asn Gln Ser Phe Ser Glu
180 185 190

Gln Gln Val Asp Trp Thr Gln Gln Cys Ile Ser Lys Gly Leu Thr Tyr
195 200 205

Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Leu Tyr Arg Tyr Ser Pro Gln Ser
210 215 220

Phe Leu Pro Asp Ser Thr Ile Gln Lys Gln Asn Phe Ile Pro His Thr
225 230 235 240

Ser Leu Gln Val Lys Asn Ser Gln Leu Leu Asn Ser Val Leu Thr Leu
245 250 255

Pro Ser Arg Gln Thr Ser Ala Val Pro Ser Gln Gln Tyr Ala Thr Gln
260 265 270

Thr Asp Lys Arg Pro Pro Pro Pro Tyr Asn Cys Arg Tyr Gly Ser
275 280 285

Gln Pro Leu Gln Ser Thr Gln His Ile Thr Lys His Leu Ser Met Glu
290 295 300

Val Pro Gln Ser Arg Glu Met Leu Ser Ser Glu Ile Arg Thr Ser Phe
305 310 315 320

Gln Gln Gln Trp Gln Asn Pro Asn Glu Asn Val Ser Thr Ile Gly Asn
325 330 335

Phe Thr Asn Leu Lys Val Asn Thr Asn Ser Lys Gln Pro Phe Asn Ser
340 345 350

Pro Ile Arg Ser Ser Val Asp Gly Val Gln Thr Leu Ala Gln Thr Asn
355 360 365

Glu Glu Lys Ile Met Asp Ser Cys Asn Pro Thr Ser Asn Gln Val Leu
370 375 380

Asp Thr Ser Val Ala Lys Glu Lys Leu Val Arg Asp Ile Lys Thr Leu
385 390 395 400

Val Glu Ile Lys Gln Lys Phe Ser Glu Leu Ala Arg Lys Ile Lys Ile

ES 2 758 504 T3

Thr Lys Gly Met Pro Ala Lys Ser Asp Ser Ser Cys Ser Met Glu Val
660 665 670

Leu Ala Thr Cys Leu Ser Leu Trp Lys Lys Gln Pro Ser Asp Thr Ala
675 680 685

Lys Glu Lys Glu Cys Asp Lys Leu Arg Thr Asn Thr Thr Ala Val Gly
690 695 700

Ile Ser Lys Pro Ala Asn Ile His Val Lys Ser Pro Cys Ser Val Val
705 710 715 720

Gly Asn Ser Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ser Asn Pro Ser Gln Gln Thr
725 730 735

Ala Leu Ser Met Val Met His Asn Tyr Glu Ser Ser Gly Ile Asn Ile
740 745 750

Thr Lys Gly Thr Glu Leu Gln Ile Ala Val Val Ser Pro Leu Val Leu
755 760 765

Ser Glu Val Lys Thr Leu Ser Val Lys Gly Ile Thr Pro Ala Val Leu
770 775 780

Pro Glu Thr Val Tyr Pro Val Ile Lys Glu Gly Ser Val Cys Ser Leu
785 790 795 800

Gln Asn Gln Leu Ala Glu Asn Ala Lys Ala Thr Ala Ala Leu Lys Val
805 810 815

Asp Val Ser Gly Pro Val Ala Ser Thr Ala Thr Ser Thr Lys Ile Phe
820 825 830

Pro Leu Thr Gln Lys Glu Lys Gln Asn Glu Ser Thr Asn Gly Asn Ser
835 840 845

Glu Val Thr Pro Asn Val Asn Gln Gly Lys His Asn Lys Leu Glu Ser
850 855 860

Ala Ile His Ser Pro Met Asn Asp Gln Gln Ile Ser Gln Glu Ser Arg
865 870 875 880

Asn Ser Thr Val Val Ser Ser Asp Thr Leu Gln Ile Asp Asn Ile Cys
885 890 895

Ser Leu Val Glu Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Gln Ile Ala Lys Ile
900 905 910

ES 2 758 504 T3

Phe Ser Ser Leu Pro Leu Lys Met Val Glu Pro Gln Lys Pro Ser Leu
 915 920 925

Pro Asn Gln Gln Gly Ile Gly Ser Arg Glu Pro Glu Lys Gln Leu Asp
 930 935 940

Asn Thr Thr Glu Asn Lys Asp Phe Gly Phe Gln Lys Asp Lys Pro Val
 945 950 955 960

Gln Cys Thr Asp Val Ser His Lys Ile Cys Asp Gln Ser Lys Ser Glu
 965 970 975

Pro Pro Leu Glu Ser Ser Phe Asn Asn Leu Glu Thr Asn Arg Val Ile
 980 985 990

Leu Glu Lys Ser Ser Leu Glu His Ala Thr Glu Lys Ser Thr Ala Asn
 995 1000 1005

Asp Thr Cys Ser Ser Ala Ala Ile Gln Glu Asp Ile Tyr Pro Gln
 1010 1015 1020

Glu Ile Asp Ala Ser Ser Asn Tyr Thr Pro Gln Asp Pro Ala Arg
 1025 1030 1035

Asn Glu Ile His Ser Asp Lys Ala Pro Val Leu Tyr Leu His Asp
 1040 1045 1050

Gln Leu Ser Glu Leu Leu Lys Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Glu Ala
 1055 1060 1065

Val Asn Thr Arg Glu Gly Ser Val Gly Gln Gln Thr Thr Tyr Gln
 1070 1075 1080

Thr Ser Glu Asp Gln Thr Ala Asp Lys Thr Ser Ser Asp Ser Lys
 1085 1090 1095

Asp Pro Ala Asp Gln Ile Gln Ile Thr Ile Leu Ser Ser Glu Gln
 1100 1105 1110

Met Lys Glu Ile Phe Pro Glu Gln Asp Asp Gln Pro Tyr Val Val
 1115 1120 1125

Asp Lys Leu Ala Glu Pro Gln Lys Glu Glu Pro Ile Thr Glu Val
 1130 1135 1140

Val Ser Gln Cys Asp Leu Gln Ala Pro Ala Ala Gly Gln Ser Arg
 1145 1150 1155

ES 2 758 504 T3

Asp Ser Val Ile Leu Asp Ser Glu Lys Asp Asp Ile His Cys Cys
 1160 1165 1170
 Ala Leu Gly Trp Leu Ser Met Val Tyr Glu Gly Val Pro Gln Cys
 1175 1180 1185
 Gln Cys Asn Ser Ile Lys Asn Ser Ser Ser Glu Glu Glu Lys Gln
 1190 1195 1200
 Lys Glu Gln Cys Ser Pro Leu Asp Thr Asn Ser Cys Lys Gln Gly
 1205 1210 1215
 Glu Arg Thr Ser Asp Arg Asp Val Thr Val Val Gln Phe Lys Ser
 1220 1225 1230
 Leu Val Asn Asn Pro Lys Thr Pro Pro Asp Gly Lys Ser His Phe
 1235 1240 1245
 Pro Glu Leu Gln Asp Asp Ser Arg Lys Asp Thr Pro Lys Thr Lys
 1250 1255 1260
 His Lys Ser Leu Pro Arg Thr Glu Gln Glu Leu Val Ala Gly Gln
 1265 1270 1275
 Phe Ser Ser Lys Cys Asp Lys Leu Asn Pro Leu Gln Asn His Lys
 1280 1285 1290
 Arg Lys Lys Leu Arg Phe His Glu Val Thr Phe His Ser Ser Asn
 1295 1300 1305
 Lys Met Thr Ala Ser Tyr Glu Gln Ala Ser Gln Glu Thr Arg Gln
 1310 1315 1320
 Lys Lys His Val Thr Gln Asn Ser Arg Pro Leu Lys Thr Lys Thr
 1325 1330 1335
 Ala Phe Leu Pro Asn Lys Asp Val Tyr Lys Lys His Ser Ser Leu
 1340 1345 1350
 Gly Gln Ser Leu Ser Pro Glu Lys Ile Lys Leu Lys Leu Lys Ser
 1355 1360 1365
 Val Ser Phe Lys Gln Lys Arg Lys Leu Asp Gln Gly Asn Val Leu
 1370 1375 1380
 Asp Met Glu Val Lys Lys Lys Lys His Asp Lys Gln Glu Gln Lys

ES 2 758 504 T3

1385		1390		1395
Gly Ser Val Gly Ala Thr Phe Lys Leu Gly Asp Ser Leu Ser Asn 1400		1405		1410
Pro Asn Glu Arg Ala Ile Val Lys Glu Lys Met Val Ser Asn Thr 1415		1420		1425
Lys Ser Val Asp Thr Lys Ala Ser Ser Ser Lys Phe Ser Arg Ile 1430		1435		1440
Leu Thr Pro Lys Glu Tyr Leu Gln Arg Gln Lys His Lys Glu Ala 1445		1450		1455
Leu Ser Asn Lys Ala Ser Lys Lys Ile Cys Val Lys Asn Val Pro 1460		1465		1470
Cys Asp Ser Glu His Met Arg Pro Ser Lys Leu Ala Val Gln Val 1475		1480		1485
Glu Ser Cys Gly Lys Ser Asn Glu Lys His Ser Ser Gly Val Gln 1490		1495		1500
Thr Ser Lys Glu Ser Leu Asn Gly Leu Thr Ser His Gly Lys Asn 1505		1510		1515
Leu Lys Ile His His Ser Gln Glu Ser Lys Thr Tyr Asn Ile Leu 1520		1525		1530
Arg Asn Val Lys Glu Lys Val Gly Gly Lys Gln Pro Asp Lys Ile 1535		1540		1545
Trp Ile Asp Lys Thr Lys Leu Asp Lys Leu Thr Asn Ile Ser Asn 1550		1555		1560
Glu Ala Gln Phe Ser Gln Met Pro Pro Gln Val Lys Asp Gln Lys 1565		1570		1575
Lys Leu Tyr Leu Asn Arg Val Gly Phe Lys Cys Thr Glu Arg Glu 1580		1585		1590
Ser Ile Ser Leu Thr Lys Leu Glu Ser Ser Pro Arg Lys Leu His 1595		1600		1605
Lys Asp Lys Arg Gln Glu Asn Lys His Lys Thr Phe Leu Pro Val 1610		1615		1620

ES 2 758 504 T3

Lys Gly Asn Thr Glu Lys Ser Asn Met Leu Glu Phe Lys Leu Cys
 1625 1630 1635

Pro Asp Ile Leu Leu Lys Asn Thr Asn Ser Val Glu Glu Arg Lys
 1640 1645 1650

Asp Val Lys Pro His Pro Arg Lys Glu Gln Ala Pro Leu Gln Val
 1655 1660 1665

Ser Gly Ile Lys Ser Thr Lys Glu Asp Trp Leu Lys Phe Val Ala
 1670 1675 1680

Thr Lys Lys Arg Thr Gln Lys Asp Ser Gln Glu Arg Asp Asn Val
 1685 1690 1695

Asn Ser Arg Leu Ser Lys Arg Ser Phe Ser Ala Asp Gly Phe Glu
 1700 1705 1710

Met Leu Gln Asn Pro Val Lys Asp Ser Lys Glu Met Phe Gln Thr
 1715 1720 1725

Tyr Lys Gln Met Tyr Leu Glu Lys Arg Ser Arg Ser Leu Gly Ser
 1730 1735 1740

Ser Pro Val Lys
 1745

- <210> 5
- <211> 1521
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 5

Met Asn Trp Asn Thr Lys Gln Glu Asn Val Pro Lys Pro Pro Pro Tyr
 1 5 10 15

Ser Lys Thr Gln Ser Ser Ile Leu Gln His Phe Leu Met Thr Ser Thr
 20 25 30

Thr Ser Gln Ser Ser Phe Asn Tyr Ser Pro His Asn Gln Glu Ala Ser
 35 40 45

Gln Thr Ser Phe Asn Tyr Ser Leu His Asn Gln Glu Ala Cys Met Tyr
 50 55 60

Ser Gly Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Ser Gly Arg Asn
 65 70 75 80

ES 2 758 504 T3

Tyr Ile Thr Pro Gln Thr Gln Ile Ser Val Ser Asn Met Pro Thr Arg
 85 90 95

Thr Ile Val Ala Ser Gln Ser Ser Met Glu Arg Val Val Ser Thr Asn
 100 105 110

Gly Lys Gly Pro Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
 115 120 125

Gly Ile Met Gln Asn Val Trp Leu Pro Ser His Thr Glu Ala Thr Ile
 130 135 140

Ser His Asn Pro Asp Gly Gly Thr Asn Met Pro Tyr Met His Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Asn Gln Leu Val Thr Ser Asp Thr Tyr Ser Met Gln Leu Gln Met
 165 170 175

Ala Pro Leu His Ser Gly Lys Val Pro Met Thr His Gln Gly Ser Gln
 180 185 190

Gly Leu Asn His Phe Ile Pro Asp Gln Leu Val Asp Trp Thr Gln Tyr
 195 200 205

Thr Ser Asn Glu Leu Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Gln
 210 215 220

Tyr Ser Tyr Ile Leu Pro Ala Thr Thr Ser Leu Gln Val Lys Asn Asn
 225 230 235 240

Gln Leu Pro Thr Tyr Thr Gln Ser Leu Gln Ser Lys His Ser Val Pro
 245 250 255

Leu Ser Ser His Gln Tyr Ala Ala Glu Ala Ser Lys Arg Leu Ser Ala
 260 265 270

Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Tyr Glu Asn Gln His Val Gln Asn Ala Gln
 275 280 285

Pro Val Ser Lys His Leu Pro Met Glu Val Pro Gln Ser Ser Glu Val
 290 295 300

His Ser Ser Glu Lys Lys Lys Asp Thr Tyr Arg Gly Phe Lys Gln Gln
 305 310 315 320

Trp Gln Asn Pro Asn Glu Lys Val Ser Ile Gly Gln Phe Ser Glu Val
 325 330 335

ES 2 758 504 T3

Lys Ile Asn Ile Lys Gln Pro Tyr Ser Glu Ser Val Arg Pro Ser Gly
 340 345 350

Asp Gly Val Gln Ala Leu Val Gln Asn Asn Gln Glu Lys Arg Lys Tyr
 355 360 365

Thr Tyr Asn Pro Asn Thr Asn Gln Val Ile Asp Thr Asn Ala Thr Lys
 370 375 380

Glu Lys Leu Val Arg Asp Ile Lys Ser Leu Val Glu Ile Lys Lys Lys
 385 390 395 400

Phe Ser Glu Leu Ala Arg Lys Ile Lys Ile Asn Lys Ser Leu Leu Met
 405 410 415

Ala Ala Gly Cys Ser Lys Thr Ala Asn Thr Ser Tyr Thr Glu Pro Ile
 420 425 430

Gln His Ser Glu Phe Ser Ala Lys Glu Met Ser Ala Lys Asn Gly Asn
 435 440 445

Asp Cys Ser Met Glu Leu Leu Ala Thr Cys Leu Ser Leu Trp Lys Asn
 450 455 460

Gln Pro Ser Lys Thr Thr Glu Glu Asn Val Pro Lys Pro Leu Glu Glu
 465 470 475 480

Lys Gln Cys Asn Thr Ser Arg Ile Ser Thr Thr Val Val Gly Ser Ala
 485 490 495

Asn Pro Thr Asn Glu Val His Val Lys Ser Leu Cys Ser Gly Val Gly
 500 505 510

Asn Ser Gln Lys Met Met Ser Ser Ser Gln Thr Val Leu Pro Val Leu
 515 520 525

Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Gly Val Ala Val Gly Lys Gly Thr Glu
 530 535 540

Leu Gln Ile Ala Val Val Ser Pro Leu Val Leu Ser Asp Thr Asn Thr
 545 550 555 560

Leu Pro Gly Lys Asp Ser Val Pro Glu Val Leu Pro Glu Thr Leu Tyr
 565 570 575

Pro Val Val Lys Glu Gly Ser Val Cys Ser Leu Gln Thr Gln Pro Thr
 580 585 590

ES 2 758 504 T3

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

ES 2 758 504 T3

835	840	845																			
Thr	His	Lys	Ile	Val	Glu	Asn	Gln	Thr	Gly	Gly	Lys	Thr	Ser	Asn	Val						
850						855					860										
Ser	Gly	Asp	Ser	Thr	Asp	Gln	Ile	Lys	Ile	Thr	Val	Leu	Asn	Ser	Glu						
865					870					875					880						
Gln	Ile	Lys	Glu	Leu	Phe	Pro	Glu	Asp	Asp	Gln	Pro	Cys	Asp	Lys	Leu						
				885					890					895							
Ala	Glu	Pro	Glu	Asn	Lys	Glu	Ile	Val	Ala	Glu	Val	Lys	Ser	Pro	Cys						
			900					905					910								
Asp	Ser	Gln	Ile	Pro	Arg	Glu	Glu	Ser	His	Asp	Leu	Gly	Met	Leu	Asp						
		915					920					925									
Pro	Glu	Lys	Asp	Lys	Ile	His	Cys	Cys	Ala	Leu	Gly	Trp	Leu	Ser	Met						
	930					935					940										
Val	Tyr	Glu	Gly	Val	Pro	Gln	Cys	His	Cys	Ser	Ser	Thr	Glu	Lys	Lys						
945					950					955					960						
Glu	Lys	Asp	Gln	Cys	Leu	Asp	Ile	Asn	Ser	Ser	Lys	Gln	Gly	Glu	Gln						
				965					970					975							
Pro	Cys	Asn	Ser	Gly	Ile	Thr	Ile	Phe	Glu	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Asn						
			980					985					990								
Asn	Ser	Lys	Thr	Pro	Leu	Thr	Gln	Ala	Thr	Glu	Glu	Gly	His	Phe	Ser						
		995					1000					1005									
Ala	Val	His	Gly	Glu	Lys	Thr	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Lys	Asp	Asn							
	1010					1015					1020										
Arg	Glu	Gly	Gln	Glu	Leu	Ala	Cys	His	Phe	Ser	Ala	Lys	Cys	Tyr							
	1025					1030					1035										
Lys	Lys	Asp	Lys	Lys	Gly	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asp	Thr	Ser							
	1040					1045					1050										
Leu	Lys	Met	Glu	Gln	Lys	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Ser	Lys	Cys	Asp							
	1055					1060					1065										
Ile	Pro	Asn	Pro	Ser	Lys	Cys	Asn	Lys	Ile	Ala	Ala	Pro	Glu	Ile							
	1070					1075					1080										

ES 2 758 504 T3

Leu His Val Thr Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asn Met Pro Phe Ser
 1085 1090 1095

 Lys Gln Ala Ser Gln Glu Ser Leu Gln Lys Lys His Thr Ser Gln
 1100 1105 1110

 Asp Leu Gly Pro Val Lys Ala Pro Ile Glu Leu Ser Ser Asn Thr
 1115 1120 1125

 Asp Pro Cys Arg Ser Asn Thr Ser Ser Val Gln Ser Val Ser Pro
 1130 1135 1140

 Glu Lys Lys Lys Leu Lys Phe Lys Ala Gly Gly Ser Arg Leu Lys
 1145 1150 1155

 Tyr Phe Glu Lys Arg Lys Thr Asp His Val Ile Ile Pro Asp Val
 1160 1165 1170

 Glu Ile Lys Lys Lys Lys Tyr Glu Lys Gln Glu Gln Asn Lys Asn
 1175 1180 1185

 Ala Gly Asp Thr Leu Lys Leu Cys Ser Ile Leu Thr Glu Ser Asn
 1190 1195 1200

 Glu Arg Ala Ser Val Gln Glu Lys Thr Val Pro Ser Pro Glu Ser
 1205 1210 1215

 Ser Asp Pro Lys Gly Ser Ser Ser Lys Ser Thr Arg Val Ile Thr
 1220 1225 1230

 Val Gln Glu Tyr Leu Gln Arg Gln Lys Asp Lys Gln Ile Thr Gly
 1235 1240 1245

 Asn Asn Ala Ser Arg Asn Ile Cys Val Glu Thr Val Leu Cys Asp
 1250 1255 1260

 Ser Gly His Thr Lys Thr Ser Lys His Ser Ala Ala Val Ser Trp
 1265 1270 1275

 Gly Lys Leu Val Glu Gly Gln Ser Ile Ser Ala Glu Thr Ala Lys
 1280 1285 1290

 Glu Leu Glu His Asn Ser Ser Ser His Gly Lys Asp Phe Lys Ile
 1295 1300 1305

 His His Ser Glu Ala Ser Arg Thr His Ser Val Ser Asn Asn Asn
 1310 1315 1320

ES 2 758 504 T3

Lys Gly Lys Phe Asp Gly Lys Gln Pro Asp Lys Met Phe Lys Asn
 1325 1330 1335

Lys Thr Ser Met Asn Asn Glu Ser Asn Gln Met Pro Leu Gln Val
 1340 1345 1350

Lys Glu Gln Arg Lys Gln Tyr Leu Asn Arg Val Ala Phe Lys Cys
 1355 1360 1365

Thr Glu Arg Glu Ser Ile Cys Leu Thr Lys Leu Asp Ser Ala Ser
 1370 1375 1380

Lys Lys Leu Ser Ile Glu Lys Lys Ser Gly Glu Tyr Thr Ser Lys
 1385 1390 1395

Thr Lys Asp Thr Asp Lys Pro Ser Met Leu Glu Phe Lys Leu Cys
 1400 1405 1410

Pro Asp Val Leu Leu Lys Asn Thr Ser Thr Val Asp Lys Gln Asp
 1415 1420 1425

Cys Pro Gly Pro Gly Pro Glu Lys Glu Gln Ala Pro Val Gln Val
 1430 1435 1440

Ser Gly Ile Lys Ser Thr Lys Glu Asp Trp Leu Lys Cys Ile Pro
 1445 1450 1455

Thr Arg Thr Lys Met Pro Glu Ser Ser Gln Arg Asp Ser Ala Asp
 1460 1465 1470

Ser Arg Leu Ser Lys Arg Ser Leu Ser Ala Asp Glu Phe Glu Ile
 1475 1480 1485

Leu Gln Asn Pro Val Lys Glu Ser Asn Ile Met Phe Arg Thr Tyr
 1490 1495 1500

Lys Lys Met Tyr Leu Glu Lys Arg Ser Arg Ser Leu Gly Ser Ser
 1505 1510 1515

Pro Val Lys
 1520

<210> 6
 <211> 1741
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 6

ES 2 758 504 T3

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Ser Val Thr Leu Pro Pro Gln Tyr
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Gln Ala Ser Phe Leu Glu Gln Gly Leu Val Asn Thr Leu
 20 25 30

Ser Thr Thr Ser Gln Ser Ser Phe His Thr Gly Ser Asn Gln Glu Pro
 35 40 45

Cys Leu Phe Leu Ser Asn Ser His Pro Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn
 50 55 60

Ile Arg Asn His Lys Thr Pro Pro Gln Ile Pro Ile Ser Asp Leu His
 65 70 75 80

Ser Gly Thr Ile Val Thr Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Ile Thr Tyr
 85 90 95

Ala Asn Val Lys Gly Pro Lys Gln Leu Ser His Asp Leu Gln Ile Ser
 100 105 110

Ser Gly Val Thr Pro Asp Val Trp Leu Asn Ser Pro Met Gly Ser Ser
 115 120 125

Thr Leu Ser His Thr Gly Ala Thr Val Ser His Gln Thr Gly Phe Gly
 130 135 140

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

Asp Thr Tyr Ser Met Gln Leu His Met Ile Pro Ser Asn Ser Gly Arg
 165 170 175

Val Pro Ile Thr Tyr Gln Gly Asn Thr Arg Leu Asn Leu Pro Leu Ser
 180 185 190

Glu Gln Gln Val Asp Trp Ala Pro Gln Arg Ala Ser Ser Gly Leu Thr
 195 200 205

Tyr Gln Asp Tyr Arg Pro Leu Pro Lys Gln Tyr Asn Tyr Ser Pro Arg
 210 215 220

Ser Phe Leu Gln Glu Pro Ala Leu Gln Lys Gln Asn Ala Met Ser Ser
 225 230 235 240

Val Ser Phe Gln Val Lys Asn Asn Gln Ser Pro Asn Pro Ala Leu Thr
 245 250 255

ES 2 758 504 T3

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

ES 2 758 504 T3

Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Val Val Ser Pro Leu Ile Leu Ser Asp
 755 760 765
 Val Asn Thr Leu Ser Val Lys Asp Thr Thr Ser Glu Ala Leu Pro Glu
 770 775 780
 Met Val Tyr Pro Val Ile Lys Glu Gly Ser Val Cys Ser Leu Gln Asn
 785 790 795 800
 Lys Leu Thr Glu Asn Thr Ala Ala Leu Lys Ile Asn Val Asn Glu Pro
 805 810 815
 Val Thr Ser Thr Thr Gly Ile Met Ile Phe Pro Leu Ile Glu Asp Lys
 820 825 830
 Gln Ser Glu Ser Thr Asn Thr Asn Ser Glu Gly Ile Pro Asn Thr Asn
 835 840 845
 Gln Gly Lys His Asn Glu Ser Glu Pro Asp Ile Gln Cys Pro Val Ser
 850 855 860
 Asp Gln Gln Thr Ser Tyr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Ser Val Gly Ser
 865 870 875 880
 Asp Val Leu Gln Ile Gly Ser Ile Cys Ser Leu Val Glu Gly Asp Thr
 885 890 895
 Ser Tyr Asp Ser Gln Ile Ala Glu Ile Phe Asn Leu Leu Pro Leu Gln
 900 905 910
 Lys Val Glu Pro Gln Lys Pro Leu Pro Asn His Gln Met Met Ser Ser
 915 920 925
 Arg Gln Gln Asn Glu His Leu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Lys Asp Phe
 930 935 940
 Asp Phe Lys Lys Asp Glu Phe Val Gln Cys Thr Asp Val Ser Asn Lys
 945 950 955 960
 Ile Thr Asp Gln Ser Glu Ser Leu Gln Leu Pro Ala Leu Ser Pro Leu
 965 970 975
 Lys Cys Val Glu Ala Lys Ser Gly Ile Leu Glu Glu Gly Ser Leu Glu
 980 985 990
 His Ile Thr Glu Asn Glu Ser Met Ala Asn Asp Thr Cys Ser Ser Ala
 995 1000 1005

ES 2 758 504 T3

Ala Thr Gln Gln Asp Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Asp Thr Ser Cys
1010 1015 1020

Ser Tyr Thr Glu Gln Asp Pro Thr Thr Asp Glu Ser Leu His Asp
1025 1030 1035

Lys Thr Ser Ile Leu Tyr Leu His Asp Gln Leu Ser Glu Leu Leu
1040 1045 1050

Lys Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Glu Pro Val Asn Met His Glu Ser
1055 1060 1065

Ser Val Val Gln Gln Met Ala Asn Gln Ile Ser Glu Ala Gln Thr
1070 1075 1080

Cys Gly Lys Thr Asp Cys Asp Ser Lys Gly Ser Thr Asp Gln Ile
1085 1090 1095

Gln Ile Thr Ile Leu Asn Thr Asp Gln Met Lys Glu Leu Phe Pro
1100 1105 1110

Glu Gln Asp Asp Gln Pro Ser Glu Val Asp Lys Leu Thr Glu Pro
1115 1120 1125

Gln Lys Glu Lys Pro Val Thr Lys Glu Glu Lys Gln Cys Asp Pro
1130 1135 1140

Gln Ala Cys Arg Val Glu Glu Arg Cys Ala Ser Val Pro Leu Asp
1145 1150 1155

Ser Glu Lys Asp Asp Ile Arg Cys Cys Ala Leu Gly Trp Leu Ser
1160 1165 1170

Met Val Tyr Glu Gly Val Pro Gln Cys Gln Cys Asn Ser Ile Lys
1175 1180 1185

Lys Ser Asp Ser Lys Glu Lys Lys Gln Ile Asn Pro Cys Ser Pro
1190 1195 1200

Ser Glu Ala Lys Ser Tyr Lys Gln Gly Glu Arg Thr Ser Asp Arg
1205 1210 1215

Asp Val Pro Val Ala Leu Asn Ser Pro Pro Asn Asn Pro Pro Lys
1220 1225 1230

Ser Pro Leu Thr Ser Ser Val Glu Lys Lys His Phe Pro Glu Thr
1235 1240 1245

ES 2 758 504 T3

Lys Gln Ser Ser Asn Ile Lys Asp Lys Ser Lys Thr Glu Arg Asn
 1250 1255 1260

 Ser Ser Leu Arg Thr Glu Gln Glu Leu Ser Gly Gln Leu Leu Ser
 1265 1270 1275

 Lys Gly Asp Lys Lys Leu Asp Ser Leu Gln Ser His Lys Arg Lys
 1280 1285 1290

 Arg Asn Leu Gln Phe His Glu Val Asn Phe Asn Ser Ala Asn Lys
 1295 1300 1305

 Ile Thr Lys Phe Ser Gln Glu Ser Leu Gln Arg Lys Phe Met Ala
 1310 1315 1320

 Gln Asn Leu Gly Pro Leu Lys Pro Lys Met Ser Phe Leu Thr Ser
 1325 1330 1335

 Lys Thr Lys Asp Leu Asn Met Lys Asn Gly Ser Ser Val Gln Ser
 1340 1345 1350

 Val Ser Pro Glu Lys Arg Lys Leu Lys Ser Ala Gly Ser Lys Gln
 1355 1360 1365

 Lys Ser Leu Glu Glu Arg Lys Leu Asp Glu Gly Ile Thr Leu Asp
 1370 1375 1380

 Ser Glu Ile Lys Arg Lys Lys His Asp Lys Gln Glu Gln Asn Lys
 1385 1390 1395

 Asn Val Gly Gly Gly Ala Phe Lys Phe Cys Asn Phe Ser Thr Pro
 1400 1405 1410

 Asn Glu Arg Ala Trp Ile Lys Glu Lys Thr Val Ser Asn Val Lys
 1415 1420 1425

 Ser Ser Gly Ser Lys Asp Ser Ser Ser Lys Met Asn Arg Val Leu
 1430 1435 1440

 Ser Pro Lys Glu Tyr Leu Ser Arg Gln Lys His Lys Glu Ala Leu
 1445 1450 1455

 Lys Lys Asn Tyr Leu Lys Asn Ser Asp Ser Gln Tyr Met Arg Pro
 1460 1465 1470

 Ser Lys Leu Ser Val Gln Val Glu Ser Ser Gly Lys Ser Asn Glu

ES 2 758 504 T3

<213> Sus scrofa

<400> 7

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Ser Val Thr Leu Pro Pro Gln Tyr
1 5 10 15

Pro Arg Lys Gln Thr Ser Phe Leu Glu Gln Ala Leu Val Ser Thr Leu
20 25 30

Thr Thr Ser Gln Ser Pro Leu Asn His Pro Gly Ser Asn Gln Glu Ala
35 40 45

Cys Leu Phe Leu Ser Asn Ser Asn Pro Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn
50 55 60

Asn Arg Asn Tyr Lys Thr Pro Gln Gln Ile Pro Ile Ser Asp Met His
65 70 75 80

Ser Gly Thr Ile Val Thr Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Ile Thr Tyr
85 90 95

Thr Asn Val Lys Gly Pro Lys Gln Leu Asn Gln Asp Leu Gln Val Ser
100 105 110

Ser Gly Val Thr Gln Asp Met Trp Leu Asn Ser Pro Met Arg Asn Ser
115 120 125

Met Leu Ser His Thr Gly Ala Thr Val Ser His Gln Thr Gly Phe Gly
130 135 140

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

Asp Thr Tyr Ser Met Gln Leu Gln Met Met Pro Ser Asn Ser Gly Arg
165 170 175

Ala Pro Ile Thr Tyr Gln Asp Asn Pro Arg Leu Asn Pro Pro Leu Ser
180 185 190

ES 2 758 504 T3

Glu Gln Gln Val Asp Trp Pro Gln Gln Cys Ala Ser Ser Gly Leu Ala
 195 200 205

Tyr Pro Asn Tyr Arg Pro Leu Pro Lys Gln Tyr Gly Tyr Ser Ser Arg
 210 215 220

Ser Phe Val Gln Gly Pro Thr Leu Pro Lys Gln Asn Thr Met Ser Ala
 225 230 235 240

Gly Ser Leu Gln Val Lys Asn Ser Pro Ser Pro Asn Pro Val Leu Pro
 245 250 255

Leu Gln Ser Lys Gln Ile Ala Thr Ile Pro Ser Tyr Gln Tyr Ala Val
 260 265 270

Thr His Thr Asp Glu Arg Pro Pro Pro Pro Tyr Asp Cys Arg Tyr Ala
 275 280 285

Ser Gln Pro Leu Gln Ser Ile Gln His Val Val Lys Arg Ser Ser Met
 290 295 300

Asp Gly Pro Gln Thr Gln Glu Met Tyr Leu Pro Glu Met Gly Lys Asp
 305 310 315 320

Phe Cys Arg Gly Phe Gln Gln Gln Trp Gln Asn Ser Asn Glu Asn Phe
 325 330 335

Ser Met Met Gly Asn Thr Cys Asn Leu Lys Val Asn Thr Asn Val Gly
 340 345 350

Gln Pro Phe Asn Arg Pro Val Arg Ser Ser Leu Asp Ser Val Gln Ala
 355 360 365

Leu Gly Gln Asn Thr Gln Glu Lys Arg Val Asp Ser Gly Asn Leu Thr
 370 375 380

Ser Asn Gln Val Leu Asp Thr Arg Ala Lys Lys Lys Lys Leu Val Arg
 385 390 395 400

Asp Ile Lys Thr Leu Val Glu Ile Lys Lys Lys Phe Ser Asp Leu Ala
 405 410 415

Arg Lys Ile Lys Ile Asn Lys Ser Leu Leu Met Ala Ala Gly Cys Ile
 420 425 430

Lys Thr Thr Ser Ser Pro Tyr Ser Asn Thr Ala Gln Asn Ser Gln Phe
 435 440 445

ES 2 758 504 T3

Ser Leu Lys Gln Thr Ala Lys Val Gln Cys Gly Pro Gln Val Thr Ile
450 455 460

Val Thr Pro Glu Thr Met Glu Asn Lys Ser Pro Ile Val Met Glu Ser
465 470 475 480

Ser Glu Val Ala Asn Lys Thr His Ser Pro Ser Asn Ser Asn Leu Gln
485 490 495

Asp Arg His Phe Asn Gln Val Ser Ser Val Leu Leu Asn Ser Val Pro
500 505 510

Ser Glu Lys Leu Pro Ile Pro Glu Gln Leu Arg Asp Leu Lys Val Val
515 520 525

Thr Ser Ser Lys Met Ser Thr Val Glu Ile Pro His Ala Thr Ser Asn
530 535 540

Asn Ile Gln Phe Ser Ser Gly Asn Leu Val Asn Ser Thr Lys Asn Val
545 550 555 560

Pro Ala His Ser Glu Thr Thr Pro Leu Pro Gln Phe Met Thr Phe Glu
565 570 575

Glu Tyr Ile Ser Lys His Pro Asn Lys Asn Arg Leu Val Leu Ser Leu
580 585 590

Leu Ala Pro Gly Gly Lys Ile Glu Arg Lys Leu Leu Lys Asp Thr Ile
595 600 605

Glu Thr Val Lys Asp Ser Lys Met Arg Ser Ser Asp Val Asn Pro Asn
610 615 620

Thr Thr Asn Thr Gly Asn Leu Met Asn Leu Lys Thr Val Glu Thr Ala
625 630 635 640

Ser Ala Cys Asn Ile Asn Ala Lys Ile Ser Asp Asn Ser Ser Gly Phe
645 650 655

Glu His Lys Ser Leu Asn Gly Met Ser Ser Lys Ser Asp Ser His Phe
660 665 670

Ser Met Glu Leu Leu Ala Thr Cys Leu Ser Leu Trp Lys Lys Gln Pro
675 680 685

Ser Glu Pro Thr Val Glu Lys Gln Ser Asn Glu Ser Lys Thr Asn Arg
690 695 700

ES 2 758 504 T3

Ala Ala Ala Gly Val Ser Lys Pro Val Glu Val Cys Glu Thr Ser Pro
705 710 715 720

Phe Ser Ala Val Gly Asn Ser Gln Asn Lys Val Thr Ser Ser Ser Gln
725 730 735

Glu Thr Val Leu Ser Met Val Thr Gln Asn Phe Glu Ser Ser Gly Ser
740 745 750

Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Val Val Ser Pro Leu Ile Leu Ser Asp
755 760 765

Val Lys Thr Leu Ser Val Lys Gly Ile Thr Pro Glu Ala Leu Pro Glu
770 775 780

Thr Ala Tyr Pro Val Ile Lys Glu Gly Ser Ile Cys Ser Leu Gln Asn
785 790 795 800

Lys Leu Glu Asn Thr Ala Ala Leu Lys Val Ser Val His Glu Pro Val
805 810 815

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Ile Phe Pro Leu Ile Gln Lys Glu Lys
820 825 830

Gln Asn Glu Ser Thr Asn Ala Asn Ser Glu Gly Thr Pro Asn Thr Ser
835 840 845

Gln Gly Lys Tyr Asn Glu Thr Glu Pro Asp Val Gln Cys Pro Val Ser
850 855 860

Asp Gln Gln Thr Ser Tyr Val Ser Lys Asp Ser Asp Asp Val His Ser
865 870 875 880

Asp Val Leu Gln Ile Asp Asn Ile Cys Ser Leu Val Glu Gly Asp Thr
885 890 895

Ser Tyr Asn Ser Gln Ile Ala Lys Ile Phe Asn Leu His Pro Leu Glu
900 905 910

Lys Val Glu Gln Gln Lys Pro Leu Leu Ser His Gln Val Met Ser Ser
915 920 925

Arg Gln Gln Asn Glu Gln Val Asp Val Thr Glu Ser Lys Asp Phe Asp
930 935 940

Cys Gln Lys Asp Asn Phe Val Gln Cys Thr Asp Thr Ser His Glu Thr

ES 2 758 504 T3

Ser Ala Ser Lys Glu Glu Lys Gly Lys Asp Pro Cys Ser Leu Glu
 1190 1195 1200

Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Lys Arg Gly Glu Arg Thr Ser Asp Gly
 1205 1210 1215

Asp Asp Ser Val Thr Phe Glu Asn Pro Pro Asp Asn Gln Lys Leu
 1220 1225 1230

Pro Leu Thr Phe Pro Val Glu Glu Lys His Phe Pro Glu Thr Glu
 1235 1240 1245

Gly Gly Arg Asn Ile Asn Asp Lys Ser Glu Thr Glu Gln Asn Ser
 1250 1255 1260

Ser Leu Arg Thr Glu Gln Glu Leu Pro Gly Gln Phe Leu Cys Lys
 1265 1270 1275

Gly Gly Lys Arg Arg Asp Pro Leu Gln Arg His Lys Lys Lys Pro
 1280 1285 1290

Leu Gln Phe His Glu Val Thr Phe Gln Ser Thr Asn Lys Thr Ile
 1295 1300 1305

Lys Ile Cys Gln Glu Ser Leu Gln Arg Lys Leu Met Ala Gln Asn
 1310 1315 1320

Leu Arg Pro Leu Lys Pro Lys Met Gly Phe Leu Thr Ser Lys Asn
 1325 1330 1335

Lys Asp Leu His Val Lys Asn Ala Ser Leu Val Gln Ser Ile Thr
 1340 1345 1350

Pro Glu Lys Arg Lys Leu Lys Ala Ala Gly Ser Lys His Lys Val
 1355 1360 1365

Leu Glu Lys Arg Lys Leu Asp Asp Gly Ser Ile His Asp Ser Glu
 1370 1375 1380

Val Lys Lys Lys Lys Tyr Asp Lys Gln Glu Gln Asn Lys Asn Val
 1385 1390 1395

Gly Ser Gly Thr Phe Lys Leu Tyr Asn Phe Ser Thr Pro Ser Glu
 1400 1405 1410

Arg Ala Met Thr Lys Glu Lys Thr Val Ser Asn Val Lys Ser Ser
 1415 1420 1425

ES 2 758 504 T3

Gly Ser Lys Asp Gly Ser Ser Lys Ile Asn Arg Val Leu Thr Ala
 1430 1435 1440

Lys Glu Tyr Leu Ala Arg Gln Lys His Lys Glu Ala Val Ser Gly
 1445 1450 1455

Lys Thr Leu Lys Lys Asn Cys Leu Lys Asn Leu Pro Cys Asp Ser
 1460 1465 1470

Gln Tyr Lys Lys Ser Ser Lys Leu Pro Val Arg Val Gly Ser Cys
 1475 1480 1485

Gly Lys Ser Ser Glu Arg Gln Asn Ser Asn Val Gln Thr Thr Lys
 1490 1495 1500

Glu Ser Leu Pro Ile Ser Ser Asn His Gly Lys Ser Leu Lys Ile
 1505 1510 1515

His His Ser Arg Asp Ser Lys Thr His Ile Leu Arg Asn Ile Lys
 1520 1525 1530

Gly Thr Val Gly Gly Lys Gln Pro Asp Lys Met Trp Ile Asp Lys
 1535 1540 1545

Thr Lys Ser Asp Lys Asn Val Asn Asn Val Asn Asn Glu Ala Glu
 1550 1555 1560

Phe Ser Gln Met Ser Ser Gln Ala Lys Asp Gln Arg Lys Thr Tyr
 1565 1570 1575

Leu Asn Arg Val Gly Phe Lys Cys Thr Glu Arg Glu Arg Ile Cys
 1580 1585 1590

Leu Thr Lys Leu Asp Gly Ser Pro Arg Lys Leu Asn Lys Glu Lys
 1595 1600 1605

Arg Pro Glu Asn Lys Pro Lys Asn His Val Pro Gly Lys Asp Thr
 1610 1615 1620

Ser Glu Lys Leu Ser Met Leu Glu Phe Lys Leu Cys Pro Asp Gly
 1625 1630 1635

Leu Phe Lys Asn Pro Asn Pro Val Glu Asp Gln Lys Asp Leu Gln
 1640 1645 1650

Pro Cys Pro Met Lys Glu Gln Ala Pro Val Gln Val Ser Gly Ile
 1655 1660 1665

ES 2 758 504 T3

Lys Ser Thr Lys Glu Asp Trp Leu Lys Cys Val Thr Glu Glu Lys
 1670 1675 1680

Lys Ile Pro Glu Pro Asn Gln Glu Ile Asp Asp Val Leu Ala Asn
 1685 1690 1695

Ser Arg Leu Ser Lys Arg Ser Phe Ser Ala Asp Gly Tyr Glu Thr
 1700 1705 1710

Gln Gln Asn Gln Val Lys Asp Ser Lys Ala Met Phe Gln Thr Tyr
 1715 1720 1725

Lys Lys Met Tyr Met Glu Lys Arg Ser Arg Ser Leu Gly Ser Ser
 1730 1735 1740

Pro Leu Glu
 1745

<210> 8

<211> 4644

<212> ADN

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 8

atgaattgga atgcaaaacc agagaatgct gcccmaaacc caccatattc taaaagccag	60
tcgtctcttt tgcaagcagtt tttaatgcct tccacaactt ctcaaagttc tttcagctgt	120
ctccacata accaagaagc atgcatatat cccactaatt caaattcagt ttcacagcca	180
cttctgaacg tcaggagttt cataaatcct ccgatctctg tttctaattgt gcataatagg	240
acagttgtgg cctcacagac ctcaagtaga agagtcacat atacaaatgt taaaggagcc	300
caacaaccaa accacaattt gcaaacagtg tcttctggag ttgtgcaaaa tgcttgatg	360
aattcaacaa tgaggaattt tatgccttct cttacagagg caacatata tcataaacct	420
gatggtgggc ctagtatgcc atatatgcat gcaccacaga gtcattctgt cacatcagac	480
acctactctg tgcaactaca gatgactcct tcaaactctg taagaggccc tgtaacttac	540
caaggaaatt atcaaggaaa tccgggactt aaccactcga tggcaggtga gcttggtgg	600
gtacaatgtg catccagtga acttacttat ccagattaca gaccacctcc aaagcaatat	660
ccttatttac cacaaagctt tgtgcaagac acttctgttc agaacaacaaa ctttgtgtca	720
tctacatcat tacaagttaa aaataatcag cttccacctt ctacacagac cttaccatca	780
aagcgccttg tacctgtgtc gtcatatcag tatgctgcag aaaccagcaa aagactccct	840
ccccccctt acagctgtag atatggaagc caacatgtgc aaaattctca gtctgtttct	900
agacacttgc ctgtggaagt tcctcagagt tcagaaatgc actcgtctga aaaaagaaa	960

ES 2 758 504 T3

gatgcttaca aagtctttca acagcagtgg cagagcacta gtaaaaatgt cagtacaata 1020
ggaaaaattct gtgagttgaa aattaataca aaacagtctt acaatgactc tgctggctct 1080
tctggggatg gtgttcatac tcttgttcaa aataatcaag aagaaagaaa gtattcttat 1140
aatccaagta caaatcaaat actagacaca aatgtcacaa aagaaaagct ggtgagggat 1200
attaatcac tagtagaaat taaaagaaa ttttcagaac ttgcaagaaa aattaaaatc 1260
aacaaaaagc ttttgatggc agctggttgc agtaaacag ctaatacttc ttatactgaa 1320
ccaactcggc attctgaatt ttcagcaaaa gaaatgtctg ctaaaagga caatcagtgc 1380
tccatggaat tgctagcaac atgcctttct ctttgaaaa accaacctcc aaaaaccaca 1440
gaagaaaatg tttcaaaacc tttagaagaa aaacaatata atgcatcaag aactagtaca 1500
acagcggttg gcccttcaaa tcccatgaat gaagttcatg tgaagaatth ttgttcaggt 1560
gttagaaatt ctcagaaaat aaccacctcg tcacaaacag tcttgtcagt tctcacacca 1620
gtttacgatt cttcagatgt agctgttggg aaaggaacag agcttcagat tgctgtggtt 1680
tcacctttaa ttctttcaga tgtcagtact gtacctggga aagagttagc tcctgaagtc 1740
gtatctgaaa ctgtatatcc agttgtgaag gaaggcagtg tttgtagctt acaaaaccag 1800
caggcagaaa atgcaacagt aactgctggt ttgccctttg atgttatcag agcagtagca 1860
agtgctactg tatcagctga gctatcactg cctgggcata aagaaaagca gcacaaacca 1920
acacagagtg atctagacat cgctgatggc agcctagggg aacactctcc ccagggtgct 1980
gaagctttgc ctaaccctag ggacagcacc attgtgagtg ggcctatatt acagattgaa 2040
agtatctggt ctcttgacaga aggtgatgta tcttacaatt cccaaatagc agagatattc 2100
aactctgtac aaaatgagcc ccagaaacct tcacctgatc agcaagtaat taatagtcaa 2160
caagaagaac aagtagataa ggttgctgaa aataaagact taagtthtct gaaagacaag 2220
tgtatgcagt gtacagatgt tcctcatgaa gtcactgaac agccagagcc actgcagcct 2280
ttagagacaa catctgatga gtatgtttaa gcaaacggag aaatcctaga ggaaagcagt 2340
aaggagaatc ctggtgaaaa agagatgact aaggacatat tgtgttcacc agctgctggt 2400
cagcaagatc ctcaacctca ggaaattgac acagccagca gtaagtcagg acacagtttt 2460
tctacagtaa atgagattaa tgatgaaaat gaacctgtct catacctaca tgaccagctg 2520
ttagaacttc taaagagtt tccttatggc attgaaacta ttgccaggcc tgaagtttat 2580
gtgggccaac aaaagacaca tgaaatctta gaaaatcaaa ctggtagtaa aactggtaat 2640
gtgtctgggg ataacacaga ccaataaaaa attacagtat taaactcaga acaaatcaaa 2700
gaattatttc ctgaagagga tcagccatgt gatgtagaca aattggcaga acccgagaat 2760
acaaaaatca ttgcagaagt aaagagcctg tgtgattcac aggtccccag agaagaaagt 2820

ES 2 758 504 T3

cacaaccctg gaatgttgga tctggagaaa gataaaatcc attgctgtgc cttgggctgg 2880
ctctcaatgg tttatgaagg tgtgccacag tgtcagtgca gttccatgga agagaaagag 2940
aaagaccagt gttctttgga aatctctaata tgcaacaag gagagcaggc ctgcaatagt 3000
ggaatcacta tttttgaaat taatcctatt tctaataact caaaaagtcc tctgatccaa 3060
gaatctgaga aaggccattt ttctgacata catggtgaaa agataaaaac atctgaaaca 3120
aaaaacagca gtcaccaag ggtagaacag gaattaactg gtcatttttc aatgaaatgt 3180
taccagaaag ataaatctac acaaaaacag gatagctcac tgaaaacaga gcaaaaaata 3240
aaaaatcttt cttctaaatg tgacaaacca aatcccttaa aaagcagtaa aataccaacc 3300
cctgaaacat ttaatgtggt aacttccaac tctgataaaa atatgccagc attttctaaa 3360
caagattctc agggaagcct gcagaagaaa cacctattcc aagactcaga tccagtaaaa 3420
ggacatgtat ggcttttgcc aaataaagat ccacgcagga ggaatacctt tttagtacag 3480
tcagtatcac cagaaaagaa aaagttaaaa ttcaaatcgg gtagctcaa actgaaatat 3540
tttgaaaaaa gaaaaatgga ccatttgctt atctcagatg tggaaataaa aaagaagaaa 3600
tacgaaaaac aagagcagaa caaaaatgct ggaggcacac tcaaattatg tagtactctg 3660
actgaaccaa atgaaagagc ctgtgctaaa gaaaagatag tgacaaattc tgagccctca 3720
gactcaaagg gaagctcctc taagagtact agagttataa ctgtgcagga atatttacag 3780
cggaaaaaag acaaacatgt aataggaaat aatgcctcca aaaacatctg tgtagaaaat 3840
gtgccatgtg actctgaacc catgaagtcc agtaaacatt ctgcatcacc tagtttgga 3900
aaattaattg agggccaggg tgtcagtgca gagactttaa aagaagtaga acataattcc 3960
accagccatg gcaaaaatct caagaccac cgttctgagg agactaggcc atacagtgtg 4020
tcaaatagta aagagaaatt ttataggaca catccagaca aatcttacat tgataaagct 4080
aaattagaaa gattgaccag tatgagtagt aagtccagcc agctccaggt aaaggaaaa 4140
aggaaacagt acctgaatcg agttgcattc aaatgcacag aacaggaaag catttgtctc 4200
accaaattgg acagtgcac caagaagctt agtaaagaga aagaaaagag tacagcatgt 4260
gcacccatga caaaagacta cacacacaag cccatgttgg agtttaaatt atgtccagat 4320
gtgctattga agaatacaag ctccattgac aaaggggatg atccaaggcc tgggcctgag 4380
aaggagcgag cacctgtgca agtttcagga ataaaaacta caaaagaaga ctggttaaaa 4440
tgtatcccaa caaggacaaa gatgccogaa tcaagtgaac aacagatcg ggctgactca 4500
agactctcta agagaagctt cagtgcagat gaatttgaaa ctctacaaaa cccagtaaaa 4560
gactcaaatg tcatgttccg gactttcaaa aagatgtacc tggagaagag aagcaggagc 4620
ctggggagca gtccagtgaa gtag 4644

<210> 9

<211> 112

<212> ADN

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 9

ES 2 758 504 T3

tgctgggatt taaggggaaa gctttaataa aagatcttta tttgtatttc ttgcagattt 60
 gtgacattca aaaccacaga ctatgcaaca ctactactaa accaggtcaa at 112

<210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus

<400> 10
 cttcgggata gagtggtttt gcttttacca ccagga 36

<210> 11
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Gly Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Asn Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
195 200 205

Gln Gly Pro Glu Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
210 215 220

<210> 12

<211> 221

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Met Lys Ser Ser Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Glu Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
 165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
 180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Ser Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
 195 200 205

Gln Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
 210 215 220

<210> 13
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
 1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
 20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
 35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
 50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
 65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
 85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Met Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
 100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
 115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Glu Gly
 130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Ser Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
195 200 205

Gln Gly Pro Ala Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
210 215 220

<210> 14

<211> 221

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 14

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Ser His Ser
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Met Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Asp Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Ser Lys Lys Ala Ala Pro Glu Lys Pro Glu Glu
195 200 205

Gln Gly Pro Ala Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
210 215 220

<210> 15
<211> 222
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 15

Met Phe Gly Phe Arg Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Asn Cys Phe Gly Leu His Glu Ala Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Met Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Ser Arg Ile Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Glu Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ser Ala Gly Ser Ser Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Val Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Asn Lys Lys Ser Ala Thr Glu Lys Pro Glu Gln
195 200 205

Glu Gly Pro Gln Ser Pro Ala Ile Ser Thr Gln Glu Glu Trp
210 215 220

<210> 16
<211> 221
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 16

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Ile Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Asp Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Gly Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Asn Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
195 200 205

Gln Gly Pro Glu Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
210 215 220

<210> 17
<211> 221
<212> PRT
<213> Pongo abelii

<400> 17

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Ile Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Arg Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Asp Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Gly Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Asn Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
195 200 205

Gln Gly Pro Glu Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
210 215 220

<210> 18
<211> 221
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 18

Met Phe Gly Phe His Lys Pro Lys Met Tyr Arg Ser Ile Glu Gly Cys
1 5 10 15

Cys Ile Cys Arg Ala Lys Ser Ser Ser Ser Arg Phe Thr Asp Ser Lys
20 25 30

Arg Tyr Glu Lys Asp Phe Gln Ser Cys Phe Gly Leu His Glu Thr Arg
35 40 45

Ser Gly Asp Ile Cys Asn Ala Cys Val Leu Leu Val Lys Arg Trp Lys
50 55 60

Lys Leu Pro Ala Gly Ser Lys Lys Asn Trp Asn His Val Val Asp Ala
65 70 75 80

Arg Ala Gly Pro Ser Leu Lys Thr Thr Leu Lys Pro Lys Lys Val Lys
85 90 95

Thr Leu Ser Gly Asn Arg Ile Lys Ser Asn Gln Ile Ser Lys Leu Gln
100 105 110

Lys Glu Phe Lys Arg His Asn Ser Asp Ala His Ser Thr Thr Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Gln Ser Pro Cys Tyr Ser Asn Gln Ser Asp Asp Gly
130 135 140

ES 2 758 504 T3

Ser Asp Thr Glu Met Ala Ser Gly Ser Asn Arg Thr Pro Val Phe Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Trp Lys Arg Gln Lys Ile Cys Cys Gly Ile
 165 170 175

Ile Tyr Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Leu Ile Asp Thr His Leu Phe
 180 185 190

Lys Pro Cys Cys Ser Asn Lys Lys Ala Ala Ala Glu Lys Pro Glu Glu
 195 200 205

Gln Gly Pro Glu Pro Leu Pro Ile Ser Thr Gln Glu Trp
 210 215 220

- <210> 19
- <211> 1236
- <212> ADN
- <213> *Cricetulus griseus*

<400> 19

```

ctcagaagaa aagatgtttg gttttcacia gccaaagatg taccgaagta tagagggctg      60
ctgtatctgc agagccaagt cctccagctc tcggttcacg gacagtaaac gttatgaaaa      120
ggacttccag agctgttttg ggttgcacga gactcgctca ggagatatct gcaatgcctg      180
tgtgctgctt gtgaaaagat ggaagaagtt gccagcagga tcaaaaaaaaa actggaatca      240
tgtgtcacac tcaagggcag gaccagctct aaagacaaca ttgaaaccaa agaaagtгаа      300
aactctatct ggaaacagga tgaaaagcaa ccagatcagt aaactgcaga aggagttaa      360
acgccacaac tctgatgctc acagtaccac ctcaagtgcc tcgccagccc agtctccctg      420
ctacagtaac cagtcagatg atggctcaga cacagagatg gcttccagct ctaacagaac      480
tccagttttt tccttcttag atcttaccta ctggaaaaga cagaaaatat gttgtgggat      540
catctataag ggccgttttg ggaagtcct catcgacacg catctcttca agccttgctg      600
cagcagtaag aaggcagctc ctgagaagcc tgaggaacag ggaccagcgc ctctgcccat      660
ctctactcag gagtgggtgac tgaggttcat gcagaaggga acaaagagca atttaaactt      720
tgaaaagacc acaaagcaac agactgacc tcctattttt aacttgata cctgctattc      780
tgccaaaaga cttttctag aatagttttt aatgggttac ccatccccc atccaacaaa      840
ctcggaaagcc agttctagct tactgcaaga agagagtgta cataatattt aatagtctga      900
gtatttcata ggaaggctga atgctgctgt aaagtgctct ttaagtcttt ttttttttt      960
aatcccctct aatgaatgag attagggggg ttccagggga cagagatggg atttgttgtg     1020
tgataaacca tatgtagttt agtctttctg tggagaggca gtggttgggg cattttaa      1080
ggctggctac acttgttttc ccctcatggt aatttgatcat aactcagtag cacgacctgc     1140
ccctagaagt agttaaagat ttttaaagtc taaggcgttg ccaaggttct gatgattcag     1200
acctgtacta ctgattatta agcaggacag actgag                                     1236
    
```

- <210> 20
- <211> 205

ES 2 758 504 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1 5 10 15

His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys
20 25 30

Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu
35 40 45

Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys
50 55 60

Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp
85 90 95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
100 105 110

Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
115 120 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys
130 135 140

Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro
145 150 155 160

Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn
165 170 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala
180 185 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
195 200 205

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
20 25

ES 2 758 504 T3

<210> 22
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15
 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 25 30
 Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45
 Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60
 Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95
 Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110
 Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125
 Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140
 Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

ES 2 758 504 T3

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255

Ser

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - METTL20_1 con sentido

<400> 23
 cccugauguu guuagaggat t 21

<210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - METTL20_1 antisentido

<400> 24
 uccucuaaca acaucagggt t 21

<210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - C12orf35_1 con sentido

<400> 25
 cauccagaca aaucuuacat t 21

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - C12orf35_1 antisentido

<400> 26
 uguaagauuu gucuggaugt g 21

<210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - C12orf35_2 con sentido

<400> 27
 ccagaaagau aaaucuacat t 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - C12orf35_2 antisentido

<400> 28
 uguagauuuu ucuuucuggt a 21

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - Caprin2_6 con sentido

<400> 29
 ugaccugccc ugaaagaaat t 21

<210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - Caprin2_6 antisentido

<400> 30
 uuucuuucag ggcaggucag t 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip - FAM60A con sentido

<400> 31
 gcuuccagcu cuaacagaat t 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip - FAM60A antisentido

<400> 32
 uucuguuaga gcuggaagcc a 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - IPO8_1 con sentido

<400> 33
 gacccgaacu uugacccuat t 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - IPO8_1 antisentido

<400> 34
 uagggucaaa guucggguct g 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - IPO8_2 con sentido

<400> 35
 cggagacucu ucaaaugat t 21

<210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip - IPO8_2 antisentido

<400> 36
 ucaauuugaa gagucuccgg a 21

 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip - IP08_3 con sentido

 <400> 37
 gccugauuga agacgaggat t 21

 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip - IP08_3 antisentido

 <400> 38
 uccucgucuu caaucaggct t 21

 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip - Dennd5b_2 con sentido

 <400> 39
 gggucucccu uauucaagat t 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip - Dennd5b_2 antisentido

 <400> 40
 ucuugaauaa gggagaccct g 21

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip - Amn1_4 con sentido

 <400> 41

gcugcuuaag uauuacugat t	21
<210> 42	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> ARNip - Amn1_4 antisentido	
<400> 42	
ucaguaauac uuaagcagcc a	21
<210> 43	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> ARNip - TMTC1_1 con sentido	
<400> 43	
guauaccugu gauaaaacat t	21
<210> 44	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> ARNip - TMTC1_1 antisentido	
<400> 44	
uguuuuauca cagguauaca t	21
<210> 45	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> ARNip - TMTC1_2 con sentido	
<400> 45	
cggugaaugu cauucuacat t	21
<210> 46	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> ARNip - TMTC1_2 antisentido	
<400> 46	
uguagaauga caucaccgc a	21

ES 2 758 504 T3

<210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo de PCR20

 <400> 47
 accagtgaat aatcgtgttt 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso de PCR20

 <400> 48
 ctatgagtca atgtcccaag 20

 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo de PCR28

 <400> 49
 cacacacaac ctctaaca ccc 23

 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso de PCR28

 <400> 50
 ttccgcaccg actcagttct 20

 <210> 51
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

 <400> 51
 atgttttggtt ttcacaagcc aaagatgtac cgaagtatag agggctgctg tatctgcaga 60
 gccaaagtccct ccagctctcg gttcacggac agtaaacggt atgaaaagga cttccagagc 120
 tgttttgg 128

 <210> 52

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

 <400> 52
 tgtaccgaag tatagagggc tgctg 25

 <210> 53
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus

 <400> 53
 tgtccgtgaa ccgagagctg gagga 25

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 1

 <400> 54
 gtcccagcac tcatgaggat 20

 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2

 <400> 55
 cctcctagct ccaggtattt 20

 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 3

 <400> 56
 gaggacttgg ctctgcagat 20

 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 4

 <400> 57

ttccacagag cacagccgat

20

<210> 58
 <211> 1080
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 58
 ccttagtatt gggatthttga ccagggtagt taatttcagt catcatttct aaactctaag 60
 gttgtcatat ctgtgatttt cataccttcc taaagggtgac tgtatagaac ttcagttatc 120
 aaagaacaca cccccactt ccacagagca cagccgatat gtggagcctc ttgtgtcctg 180
 ggaacagagt ggtcatagt aatgcacact actttcccag cagggagttt aaagttttag 240
 gtacattctt aatggcatgt gtgtatgggg gtgggcacag tagtaaagaa agtgccaaca 300
 tgactgactg ctccatgatg tggttaaggt ttttattaga tgaacagcag ccagcaaact 360
 gggcatggcc agggttctgt ctcttgagta ttgtggtata gttagttcct atgtttgtgtg 420
 atataagaaa caaaggaggt agtggatgcc tcctagctcc aggtattttc gaatgttttg 480
 tatactggcc ctatggagta gtagatctgg ggaattcttg tagttttggtt gacttggcta 540
 taaaattgta tgtgctggag gtaggggtgga acagagaaaa gtccttgcat cgtttcttgt 600
 catttcctt aacaaagctg tgccaattcc tttgtcttta caggtattgc tcagaagaaa 660
 agatgtttgg ttttcacaag ccaaatgatgt accgaagtat agagggctgc tgtatctgca 720
 gagccaagtc ctccagctct cggttcacgg acagtaaacg ttatgaaaag gacttccaga 780
 gctgttttgg gtaagattag ttatgggtccc tccccaccc cattaccct cactctccac 840
 cgaggcaggg tttctctgta gcttaagagc ttgtcctgga actggctctg tagaccaggt 900
 tagcctcaaa ctcacagaga tcctcatgag tgctgggact aaaggcatgc accaccacca 960
 tccacctgta ttccattctt agagggaaaa ataatcagga ttgtgtggaa atgtttccat 1020
 gcaaagcaat ggaacaatg tgctaattt taaaatcact agttttctat tatttggggt 1080

<210> 59
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 59
 atgtttgggtt ttcacaagcc aaagatgtac cgaagtatag agggctgctg taccctccag 60
 ctctcggttc acggacagta aacgttatga aaaggacttc cagagctggt ttgg 114

<210> 60
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 60

ES 2 758 504 T3

atgtttgggtt ttcacaagcc aaagatgtac cgaagtatag agggctgctg tatctgccaa 60
gtcctccagc tctcggttca cggacagtaa acgttatgaa aaggacttcc agagctgttt 120
tgg 123

<210> 61
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip - C12orf35_3 con sentido

<400> 61
cagtgtatcc cgttattaa 19

<210> 62
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip - C12orf35_3 antisentido

<400> 62
ttaataacgg gatacactg 19

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip - C12orf35_5 con sentido

<400> 63
gcaactgtat ctcatcaaa 19

<210> 64
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip - C12orf35_5 antisentido

<400> 64
tttgatgaga tacagttgc 19

<210> 65
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo

<400> 65 gcatccagtg aacttactta tccagat	27
<210> 66 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador inverso	
<400> 66 gctctgccac tgctgttgaa ag	22
<210> 67 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador directo	
<400> 67 tgctgggatt aaaggggaaa gcttt	25
<210> 68 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador de corte	
<400> 68 tctagaaaca gactgagaat tttgcac	27
<210> 69 <211> 1188 <212> ADN <213> Cricetulus griseus	
<220> <221> misc_feature <222> (864)..(917) <223> sitio de unión de TALEN y espaciador	
<400> 69 atgaattgga atgcaaaacc agagaatgct gccccaaacc caccatattc taaaagccag	60
tcgtctcttt tgcagcagtt tttaatgcct tccacaactt ctcaaagttc tttcagctgt	120
ctccacata accaagaagc atgcatatat cccactaatt caaattcagt ttcacagcca	180
cttctgaacg tcaggagttt cataaatcct ccgatctctg tttctaattgt gcataatagg	240
acagttgtgg cctcacagac ctcagtagaa agagtcacat atacaaatgt taaaggagcc	300
caacaaccaa accacaattt gcaaacagtg tcttctggag ttgtgcaaaa tgcctgatg	360

ES 2 758 504 T3

aattcaacaa tgaggaatth tatgccttct cttacagagg caacatata tcataaacct 420
gatggtgggc ctagtatgcc atatatgcat gcaccacaga gtcatcttgt cacatcagac 480
acctactctg tgcaactaca gatgactcct tcaactctg taagaggccc tgtaacttac 540
caaggaatt atcaaggaaa tccgggactt aaccactcga tggcaggatga gcttggctgg 600
gtacaatgtg catccagtga acttacttat ccagattaca gaccacctcc aaagcaatat 660
ccttatttac cacaaagcct tgtgcaagac acttctgttc agaacaacaaa ctttgtgtca 720
tctacatcat tacaagttaa aaataatcag cttccacctt ctacacagac cttaccatca 780
aagcgcctg tacctgtgtc gtcatatcag tatgctgcag aaaccagcaa aagactccct 840
ccccccctt acagctgtag atattggaagc caacatgtgc aaaattctca gtctgtttct 900
agacacttgc ctgtggaagt tcctcagagt tcagaaatgc actcgtctga aaaaaagaaa 960
gatgcttaca aagtctttca acagcagtgg cagagcacta gtaaaaatgt cagtacaata 1020
ggaaaattct gtgagttgaa aattaatata aaacagtctt acaatgactc tgctggctct 1080
tctggggatg gtgttcatac tcttgttcaa aataatcaag aagaaagaaa gtattcttat 1140
aatccaagta caaatcaaat actagacaca aatgtcacia aagaaaag 1188

<210> 70
<211> 1180
<212> ADN
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 70
atgaattgga atgcaaaacc agagaatgct gcccacaaacc caccatattc taaaagccag 60
tcgtctcttt tgacagcagtt tttaatgcct tccacaactt ctcaaagttc tttcagctgt 120
ctcccacata accaagaagc atgcatatat cccactaatt caaattcagt ttcacagcca 180
cttctgaacg tcaggagttt cataaatcct ccgatctctg tttctaattgt gcataatagg 240
acagttgtgg cctcacagac ctacagtagaa agagtcacat atacaaatgt taaaggagcc 300
caacaaccaa accacaatth gcaaacagtg tcttctggag ttgtgcaaaa tgcctggatg 360
aattcaacaa tgaggaatth tatgccttct cttacagagg caacatata tcataaacct 420
gatggtgggc ctagtatgcc atatatgcat gcaccacaga gtcatcttgt cacatcagac 480
acctactctg tgcaactaca gatgactcct tcaactctg taagaggccc tgtaacttac 540
caaggaatt atcaaggaaa tccgggactt aaccactcga tggcaggatga gcttggctgg 600
gtacaatgtg catccagtga acttacttat ccagattaca gaccacctcc aaagcaatat 660
ccttatttac cacaaagcct tgtgcaagac acttctgttc agaacaacaaa ctttgtgtca 720
tctacatcat tacaagttaa aaataatcag cttccacctt ctacacagac cttaccatca 780
aagcgcctg tacctgtgtc gtcatatcag tatgctgcag aaaccagcaa aagactccct 840

ES 2 758 504 T3

ccccccctt acagctgtag atatggaagc caacatgtgc aagtctgttt ctagacactt 900
gcctgtggaa gttcctcaga gttcagaaat gcactcgtct gaaaaaaga aagatgctta 960
caaagtcttt caacagcagt ggcagagcac tagtaaaaat gtcagtacaa taggaaaatt 1020
ctgtgagttg aaaattaata caaacagtc ttacaatgac tctgctggct cttctgggga 1080
tgggtgtcat actcttgttc aaaataatca agaagaaaga aagtattctt ataatccaag 1140
tacaaatcaa atactagaca caaatgtcac aaaagaaaag 1180

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 71
gcaaaattct cagtctgttt

20

<210> 72
<211> 1168
<212> ADN
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 72
atgaattgga atgcaaaacc agagaatgct gccccaaacc caccatattc taaaagccag 60
tcgtctcttt tgacagcagtt tttaatgcct tccacaactt ctcaaagttc tttcagctgt 120
ctcccacata accaagaagc atgcatatat cccactaatt caaattcagt ttcacagcca 180
cttctgaacg tcaggagttt cataaatcct ccgatctctg tttctaattgt gcataatagg 240
acagttgtgg cctcacagac ctacagtagaa agagtcacat atacaaatgt taaaggagcc 300
caacaaccaa accacaatth gcaaacagtg tcttctggag ttgtgcaaaa tgcctggatg 360
aattcaacaa tgaggaatth tatgccttct cttacagagg caaccatatt tcataaacct 420
gatggtgggc ctagtatgcc atatatgcat gcaccacaga gtcattctgt cacatcagac 480
acctactctg tgcaactaca gatgactcct tcaaactctg taagaggccc tgtaacttac 540
caaggaaatt atcaaggaaa tccgggactt aaccactcga tggcaggtga gcttggctgg 600
gtacaatgtg catccagtga acttacttat ccagattaca gaccacctcc aaagcaatat 660
ccttatttac cacaaagctt tgtgcaagac acttctgttc agaacaacaaa ctttgtgtca 720
tctacatcat tacaagttaa aaataatcag cttccacctt ctacacagac cttaccatca 780
aagcgccttg tacctgtgtc gtcatatcag tatgctgcag aaaccagcaa aagactccct 840
ccccccctt acagctgtag atatggaagc caacatgtct agacacttgc ctgtggaagt 900
tcctcagagt tcagaaatgc actcgtctga aaaaaagaaa gatgcttaca aagtctttca 960
acagcagttg cagagcacta gtaaaaatgt cagtacaata ggaaaattct gtgagttgaa 1020
aattaatata aaacagctct acaatgactc tgctggctct tctggggatg gtgttcatac 1080
tcttgttcaa aataatcaag aagaaagaaa gtattcttat aatccaagta caaatcaaat 1140
actagacaca aatgtcacia aagaaaag 1168

<210> 73

ES 2 758 504 T3

<211> 59
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 73
 caacatgtgc aaaattctca gtctgtttct agacacttgc ctgtggaagt tcctcagag 59

<210> 74
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 74
 atgaattgga atgcaaaacc agagaatgct gccccaaacc caccatattc taaaagccag 60
 tcgtctcttt tgacagcagtt tttaatgcct tccacaactt ctcaaagttc tttcagctgt 120
 ctcccacata accaagaagc atgcatatat cccactaatt caaattcagt ttcacagcca 180
 cttctgaaag tcaggagttt cataaatcct ccgatctctg tttctaagt gcataatag 240
 acagttgtgg cctcacagac ctcaagtagaa agagtcacat atacaaatgt taaaggagcc 300
 caacaaccaa accacaattt gcaaacagtg tcttctggag ttgtgcaaaa tgcctggatg 360
 aattcaacaa tgaggaattt tatgccttct cttacagagg caacatattc tcataaacct 420
 gatggtgggc ctagtatgcc atatatgcat gcaccacaga gtcatcttgt cacatcagac 480
 acctactctg tgcaactaca gatgactcct tcaaactctg taagaggccc tgtaacttac 540
 caaggaaatt atcaaggaaa tccgggactt aaccactoga tggcaggtga gottggctgg 600
 gtacaatgtg catccagtga acttacttat ccagattaca gaccacctcc aaagcaatat 660
 ccttatttac cacaaagctt tgtgcaagac acttctgttc agaaacaaaa ctttgtgtca 720
 tctacatcat tacaagttaa aaataatcag cttccacctt ctacacagac cttaccatca 780
 aagcgccctg tacctgtgtc gtcatatcag tatgctgcag aaaccagcaa aagactccct 840
 cccccccct tacagctgta gatatggaag cattcagaaa tgcaactcgtc tgaaaaaaag 900
 aaagatgctt acaaagtctt tcaacagcag tggcagagca ctagtaaaaa tgtcagtaca 960
 ataggaaaat tctgtgagtt gaaaattaat acaaacagct cttacaatga ctctgctggc 1020
 tcttctgggg atggtgttca tactcttgtt caaaataatc aagaagaaag aaagtattct 1080
 tataatccaa gtacaaatca aatactagac acaaatgtca caaaagaaaa g 1131

<210> 75
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 75

ES 2 758 504 T3

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Asn Ala Ala Pro Asn Pro Pro Tyr
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln Phe Leu Met Pro Ser Thr
20 25 30

Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Cys Leu Pro His Asn Gln Glu Ala Cys
35 40 45

Ile Tyr Pro Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn Val
50 55 60

Arg Ser Phe Ile Asn Pro Pro Ile Ser Val Ser Asn Val His Asn Arg
65 70 75 80

Thr Val Val Ala Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Val Thr Tyr Thr Asn
85 90 95

Val Lys Gly Ala Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
100 105 110

Gly Val Val Gln Asn Ala Trp Met Asn Ser Thr Met Arg Asn Phe Met
115 120 125

Pro Ser Leu Thr Glu Ala Thr Ile Ser His Lys Pro Asp Gly Gly Pro
130 135 140

Ser Met Pro Tyr Met His Ala Pro Gln Ser His Leu Val Thr Ser Asp
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Gln Met Thr Pro Ser Asn Ser Val Arg Gly
165 170 175

Pro Val Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gln Gly Asn Pro Gly Leu Asn His
180 185 190

Ser Met Ala Gly Glu Leu Gly Trp Val Gln Cys Ala Ser Ser Glu Leu
195 200 205

Thr Tyr Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro
210 215 220

Gln Ser Phe Val Gln Asp Thr Ser Val Gln Lys Gln Asn Phe Val Ser
225 230 235 240

ES 2 758 504 T3

Ser Thr Ser Leu Gln Val Lys Asn Asn Gln Leu Pro Pro Ser Thr Gln
 245 250 255

Thr Leu Pro Ser Lys Arg Pro Val Pro Val Ser Ser Tyr Gln Tyr Ala
 260 265 270

Ala Glu Thr Ser Lys Arg Leu Pro Pro Pro Tyr Ser Cys Arg Tyr
 275 280 285

Gly Ser Gln His Val Gln Asn Ser Gln Ser Val Ser Arg His Leu Pro
 290 295 300

Val Glu Val Pro Gln Ser Ser Glu Met His Ser Ser Glu Lys Lys Lys
 305 310 315 320

Asp Ala Tyr Lys Val Phe Gln Gln Gln Trp Gln Ser Thr Ser Lys Asn
 325 330 335

Val Ser Thr Ile Gly Lys Phe Cys Glu Leu Lys Ile Asn Thr Lys Gln
 340 345 350

Ser Tyr Asn Asp Ser Ala Gly Ser Ser Gly Asp Gly Val His Thr Leu
 355 360 365

Val Gln Asn Asn Gln Glu Glu Arg Lys Tyr Ser Tyr Asn Pro Ser Thr
 370 375 380

Asn Gln Ile Leu Asp Thr Asn Val Thr Lys Glu Lys
 385 390 395

<210> 76
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 76

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Asn Ala Ala Pro Asn Pro Pro Tyr
 1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln Phe Leu Met Pro Ser Thr
 20 25 30

Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Cys Leu Pro His Asn Gln Glu Ala Cys
 35 40 45

Ile Tyr Pro Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn Val
 50 55 60

ES 2 758 504 T3

Arg Ser Phe Ile Asn Pro Pro Ile Ser Val Ser Asn Val His Asn Arg
65 70 75 80

Thr Val Val Ala Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Val Thr Tyr Thr Asn
85 90 95

Val Lys Gly Ala Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
100 105 110

Gly Val Val Gln Asn Ala Trp Met Asn Ser Thr Met Arg Asn Phe Met
115 120 125

Pro Ser Leu Thr Glu Ala Thr Ile Ser His Lys Pro Asp Gly Gly Pro
130 135 140

Ser Met Pro Tyr Met His Ala Pro Gln Ser His Leu Val Thr Ser Asp
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Gln Met Thr Pro Ser Asn Ser Val Arg Gly
165 170 175

Pro Val Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gln Gly Asn Pro Gly Leu Asn His
180 185 190

Ser Met Ala Gly Glu Leu Gly Trp Val Gln Cys Ala Ser Ser Glu Leu
195 200 205

Thr Tyr Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro
210 215 220

Gln Ser Phe Val Gln Asp Thr Ser Val Gln Lys Gln Asn Phe Val Ser
225 230 235 240

Ser Thr Ser Leu Gln Val Lys Asn Asn Gln Leu Pro Pro Ser Thr Gln
245 250 255

Thr Leu Pro Ser Lys Arg Pro Val Pro Val Ser Ser Tyr Gln Tyr Ala
260 265 270

Ala Glu Thr Ser Lys Arg Leu Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Cys Arg Tyr
275 280 285

Gly Ser Gln His Val Gln Val Cys Phe
290 295

- <210> 77
- <211> 293
- <212> PRT
- <213> Cricetulus griseus
- <400> 77

ES 2 758 504 T3

Met Asn Trp Asn Ala Lys Pro Glu Asn Ala Ala Pro Asn Pro Pro Tyr
 1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln Phe Leu Met Pro Ser Thr
 20 25 30

Thr Ser Gln Ser Ser Phe Ser Cys Leu Pro His Asn Gln Glu Ala Cys
 35 40 45

Ile Tyr Pro Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Gln Pro Leu Leu Asn Val
 50 55 60

Arg Ser Phe Ile Asn Pro Pro Ile Ser Val Ser Asn Val His Asn Arg
 65 70 75 80

Thr Val Val Ala Ser Gln Thr Ser Val Glu Arg Val Thr Tyr Thr Asn
 85 90 95

Val Lys Gly Ala Gln Gln Pro Asn His Asn Leu Gln Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Gly Val Val Gln Asn Ala Trp Met Asn Ser Thr Met Arg Asn Phe Met
 115 120 125

Pro Ser Leu Thr Glu Ala Thr Ile Ser His Lys Pro Asp Gly Gly Pro
 130 135 140

Ser Met Pro Tyr Met His Ala Pro Gln Ser His Leu Val Thr Ser Asp
 145 150 155 160

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Gln Met Thr Pro Ser Asn Ser Val Arg Gly
 165 170 175

Pro Val Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gln Gly Asn Pro Gly Leu Asn His
 180 185 190

Ser Met Ala Gly Glu Leu Gly Trp Val Gln Cys Ala Ser Ser Glu Leu
 195 200 205

Thr Tyr Pro Asp Tyr Arg Pro Pro Pro Lys Gln Tyr Pro Tyr Leu Pro
 210 215 220

Gln Ser Phe Val Gln Asp Thr Ser Val Gln Lys Gln Asn Phe Val Ser

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora eucariota aislada para la producción recombinante de un producto de interés, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula porque la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina por supresión génica, mutación génica, eliminación génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores,
- 5
- en la que la mutación génica se selecciona de una o más mutaciones de desplazamiento del marco en la secuencia codificante y/o uno o más codones de parada introducidos en la secuencia codificante,
- 10
- en la que el silenciamiento génico se consigue mediante moléculas de antisentido o mediante moléculas que mediante la interferencia de ARN comprendido en el célula,
- 15
- en la que el gen C12orf35 es un gen que codifica una proteína que comparte al menos un 70 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8, y en la que la célula comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés comprendido en un casete de expresión, en la que el producto de interés es un polipéptido seleccionado de un polipéptido terapéutico y un polipéptido de diagnóstico.
- 20
2. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula hospedadora eucariota tiene una o más de las siguientes características:
- a) el gen C12orf35 comprende como mutación génica una o más mutaciones en el gen C12orf35 que proporciona un producto de expresión no funcional o menos funcional;
- 25
- b) al menos una o todas las copias del gen C12orf35 están eliminadas o funcionalmente inactivadas en el genoma de la célula eucariota;
- c) una parte de un cromosoma está eliminada, en la que la parte eliminada comprende el gen C12orf35.
- 30
3. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero, preferiblemente una célula CHO.
4. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula eucariota se proporciona como clon celular o línea celular.
- 35
5. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con la reivindicación 2c), en la que:
- a) la célula eucariota es una célula de hámster y al menos una parte de la región telomérica del cromosoma 8 está eliminada, en la que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35; o
- 40
- b) la célula eucariota es una célula de ratón y al menos una parte de la región telomérica del cromosoma 6 está eliminada, en la que dicha parte eliminada comprende el gen C12orf35.
- 45
6. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la célula eucariota aislada de acuerdo con a) o b) tiene una o más de las siguientes características:
- i. la región telomérica eliminada comprende el gen C12orf35 y comprende uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Bicd1, Amn1, proteína 20 de tipo metiltransferasa, Dennd5b, FAM60A, Caprina2, Ipo8 y RPS4Y2;
- 50
- ii. la eliminación se induce por rotura del cromosoma y el punto de rotura está ubicado centromérico del gen Ipo8;
- iii. la eliminación se induce por rotura del cromosoma y el punto de rotura está ubicado centromérico del gen Ipo8 dentro del gen Tmtc1;
- 55
- iv. al menos una parte de la región telomérica está eliminada en ambos cromosomas del respectivo par de cromosomas, en la que las partes eliminadas comprenden el gen C12orf35.
7. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la función promotora del gen C12orf35 se altera, opcionalmente introduciendo una eliminación del promotor o introduciendo una construcción entre el promotor y el inicio de la transcripción.
- 60
8. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el gen C12orf35 es un gen que codifica una proteína que comparte al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una
- 65

o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8.

5 9. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en la que adicionalmente el efecto de la proteína FAM60A está alterado en dicha célula, en la que la proteína FAM60A comparte al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 11 a 18.

10 10. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en la que:

a) la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina en dicha célula y en la que la reducción o eliminación provoca un aumento en la producción volumétrica de un producto recombinante de interés en comparación con una célula correspondiente en la que la expresión funcional del gen C12orf35 no está reducida o eliminada; y/o

15 b) el genoma de la célula eucariota se altera para dañar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula.

20 11. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés está comprendido en un casete de expresión que se integra en el genoma de la célula eucariota.

12. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 11, que tiene una o más de las siguientes características:

25 a) la célula eucariota comprende, integrado en su genoma, al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés y al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección o polipéptido indicador y en la que dichos polinucleótidos heterólogos están ubicados en el mismo vector de expresión o en diferentes; y/o

30 b) la célula eucariota comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un receptor de folato como marcador de selección y/o comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador de selección.

35 13. La célula hospedadora eucariota aislada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la célula eucariota secreta dicho polipéptido de interés en el medio de cultivo celular.

14. Un método para seleccionar una célula hospedadora que expresa de forma recombinante un producto de interés, en el que el producto de interés es un polipéptido, que comprende:

40 (a) proporcionar células eucariotas de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 13 como células hospedadoras; y

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

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dichas células hospedadoras proporcionadas en la fase (a) comprenden adicionalmente al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección y la fase (b) comprende cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en condiciones selectivas para el marcador de selección.

50 16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que los polinucleótidos heterólogos se introducen en las células eucariotas transfecando uno o más vectores de expresión.

55 17. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 14 a 16, en el que las células hospedadoras seleccionadas expresan de forma recombinante una molécula de inmunoglobulina.

18. Un método para producir de forma recombinante un producto de interés, que comprende utilizar una célula hospedadora eucariota como célula hospedadora para la expresión recombinante del producto de interés y, que comprende:

60 (a) cultivar las células hospedadoras en condiciones que permiten la expresión del producto de interés;

(b) aislar el producto de interés del medio de cultivo celular y/o de dichas células hospedadoras; y

65 (c) opcionalmente procesar el producto de interés aislado;

- 5 en el que la célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora eucariota aislada para la producción recombinante de un producto de interés, en la que el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 está alterado en dicha célula porque la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina por supresión génica, mutación génica, eliminación génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores,
- 10 en el que la mutación génica se selecciona de una o más mutaciones de desplazamiento del marco en la secuencia codificante y/o uno o más codones de parada introducidos en la secuencia codificante,
- 15 en el que el silenciamiento génico se consigue mediante moléculas de antisentido o mediante moléculas que median la interferencia de ARN comprendido en el célula,
- en el que el gen C12orf35 es un gen que codifica una proteína que comparte al menos un 70 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8, y en el que la célula comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica el producto de interés comprendido en un casete de expresión, en el que el producto de interés es un polipéptido.
- 20 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora eucariota de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1-13.
- 25 20. Un método para producir una célula eucariota de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende alterar el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 en dicha célula reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen C12orf35 mediante supresión génica, mutación génica, eliminación génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores, en el que el gen C12orf35 es un gen que codifica una proteína que comparte al menos un 70 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8.
- 30 21. Un método que comprende analizar células eucariotas que expresan de forma recombinante un polipéptido de interés para su idoneidad como células hospedadoras para la expresión recombinante de un producto de interés, analizando directa o indirectamente si el efecto del producto de expresión del gen C12orf35 endógeno está alterado en dichas células, en el que el gen C12orf35 es un gen que codifica una proteína que comparte al menos un 70 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 a 7 o la proteína codificada por la SEQ ID NO: 8,
- 35 en el que el método comprende además seleccionar al menos una célula en la que la expresión funcional de C12orf35 está alterada porque la expresión funcional del gen C12orf35 se reduce o elimina por supresión génica, mutación génica, eliminación génica, silenciamiento génico o una combinación de cualquiera de los anteriores, para la expresión recombinante del producto de interés.
- 40 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende una o más de las siguientes características:
- 45 a) antes del análisis, las células eucariotas se tratan con un agente que induce rotura del cromosoma y en el que el análisis comprende analizar si el tratamiento con dicho agente provocaba una eliminación de una parte de un cromosoma que incluye el gen C12orf35;
- 50 b) antes del análisis, las células eucariotas se transfectan con un polinucleótido heterólogo que codifica un producto de interés y un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador de selección, y en el que antes del análisis se realiza al menos una etapa de selección para identificar células hospedadoras transfectadas satisfactoriamente;
- 55 c) comprendiendo el método adicionalmente analizar directa o indirectamente si el efecto de FAM60A está alterado en dichas células, en el que la proteína FAM60A comparte al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 11 a 18;
- 60 d) se analiza una pluralidad de clones celulares para discriminar entre clones celulares estables e inestables y/o entre de alta y baja producción y en el que se selecciona uno o más clones celulares como clon de producción en el que la expresión del gen C12orf35 y opcionalmente FAM60A está reducida o eliminada, en el que la proteína FAM60A comparte al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 11 a 18.
- 65 23. El método de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, en el que las células eucariotas son células de hámster y el método comprende analizar si la expresión de uno o más genes ubicados en la región telomérica del cromosoma 8 y que se seleccionan del grupo que consiste en el gen Tmtc1 y genes ubicados teloméricos del gen Tmtc1 está eliminada o reducida, analizando de ese modo si la expresión del gen C12orf35 está reducida o eliminada en dichas células.

Fig. 1

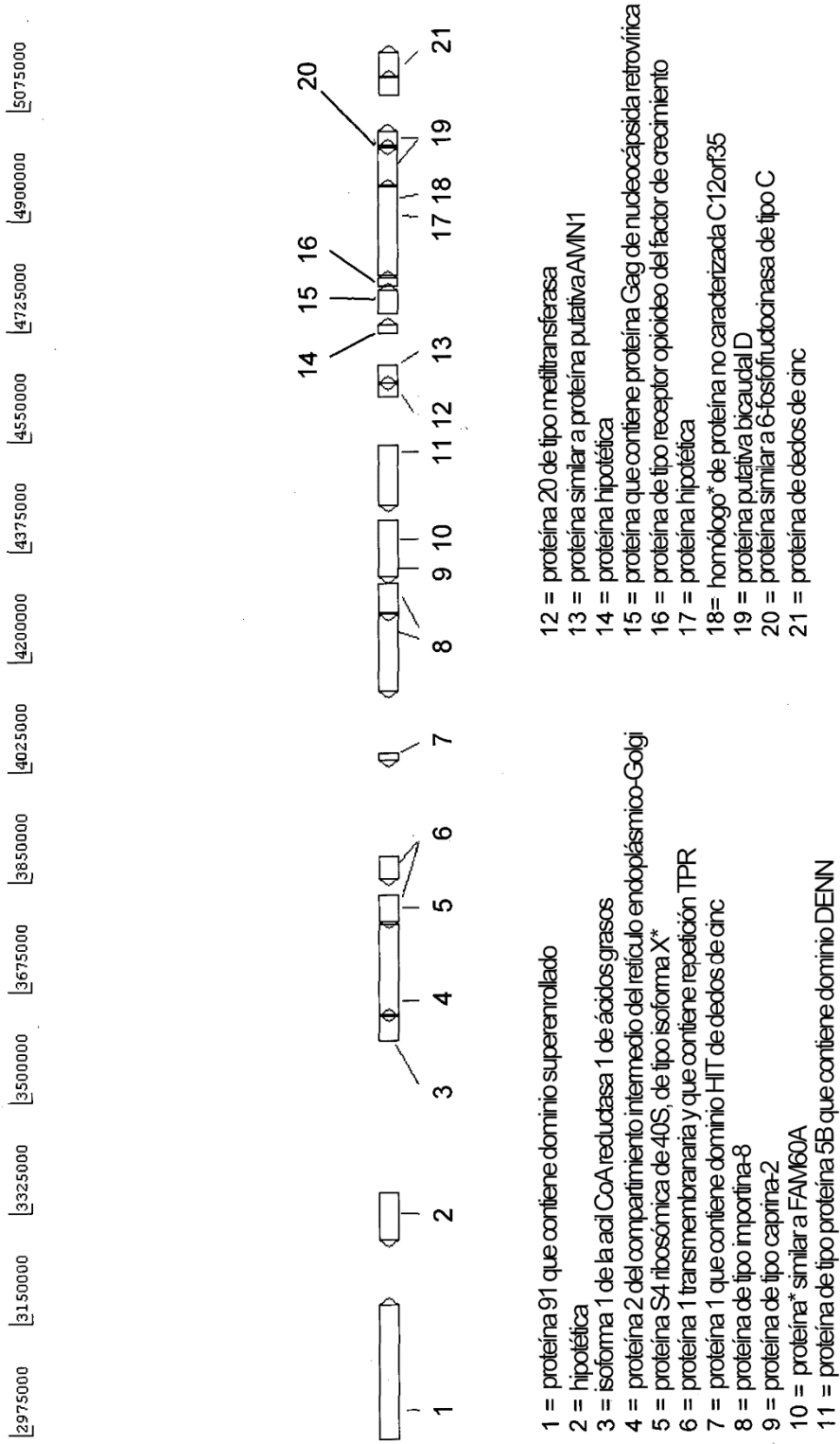


Fig. 2

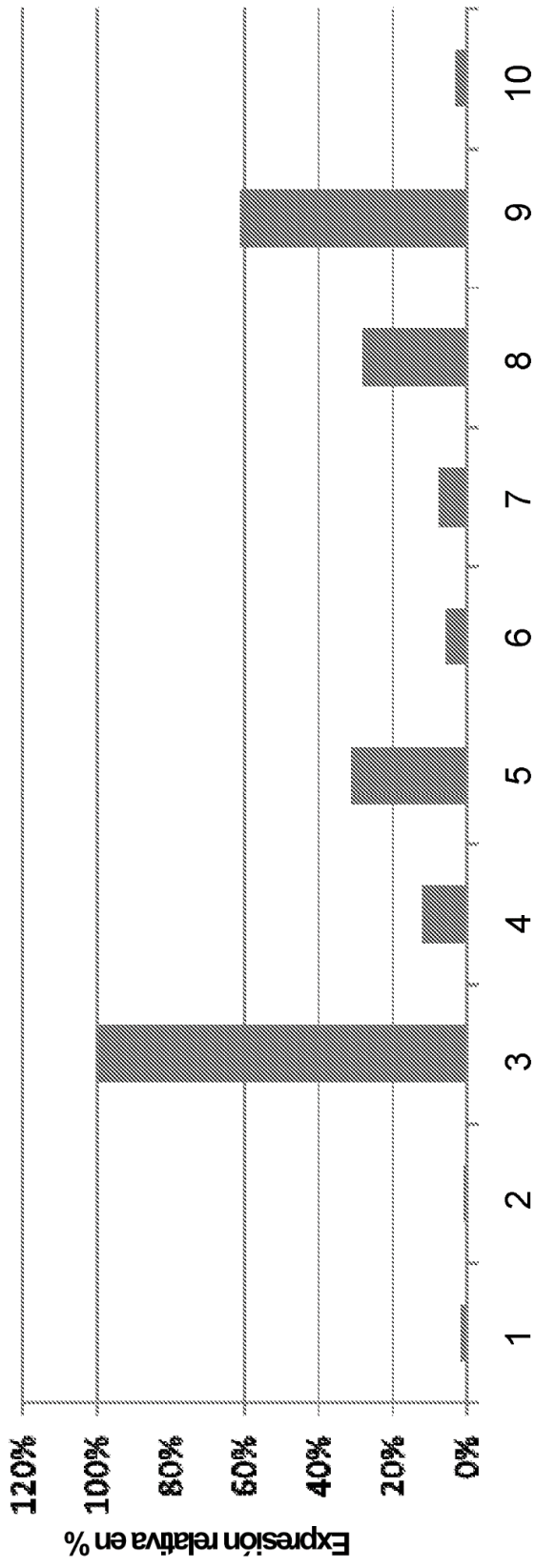
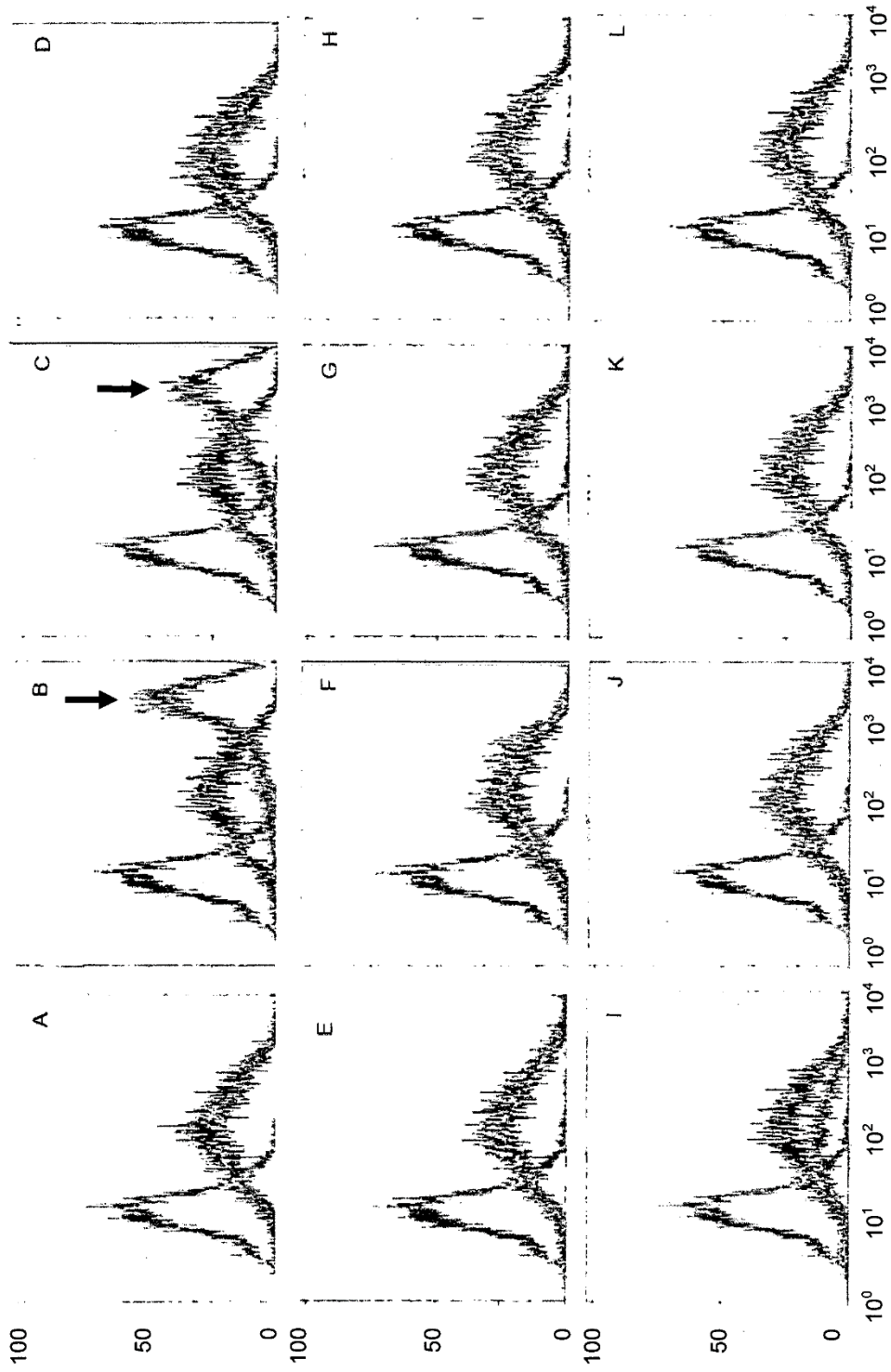


Fig. 3



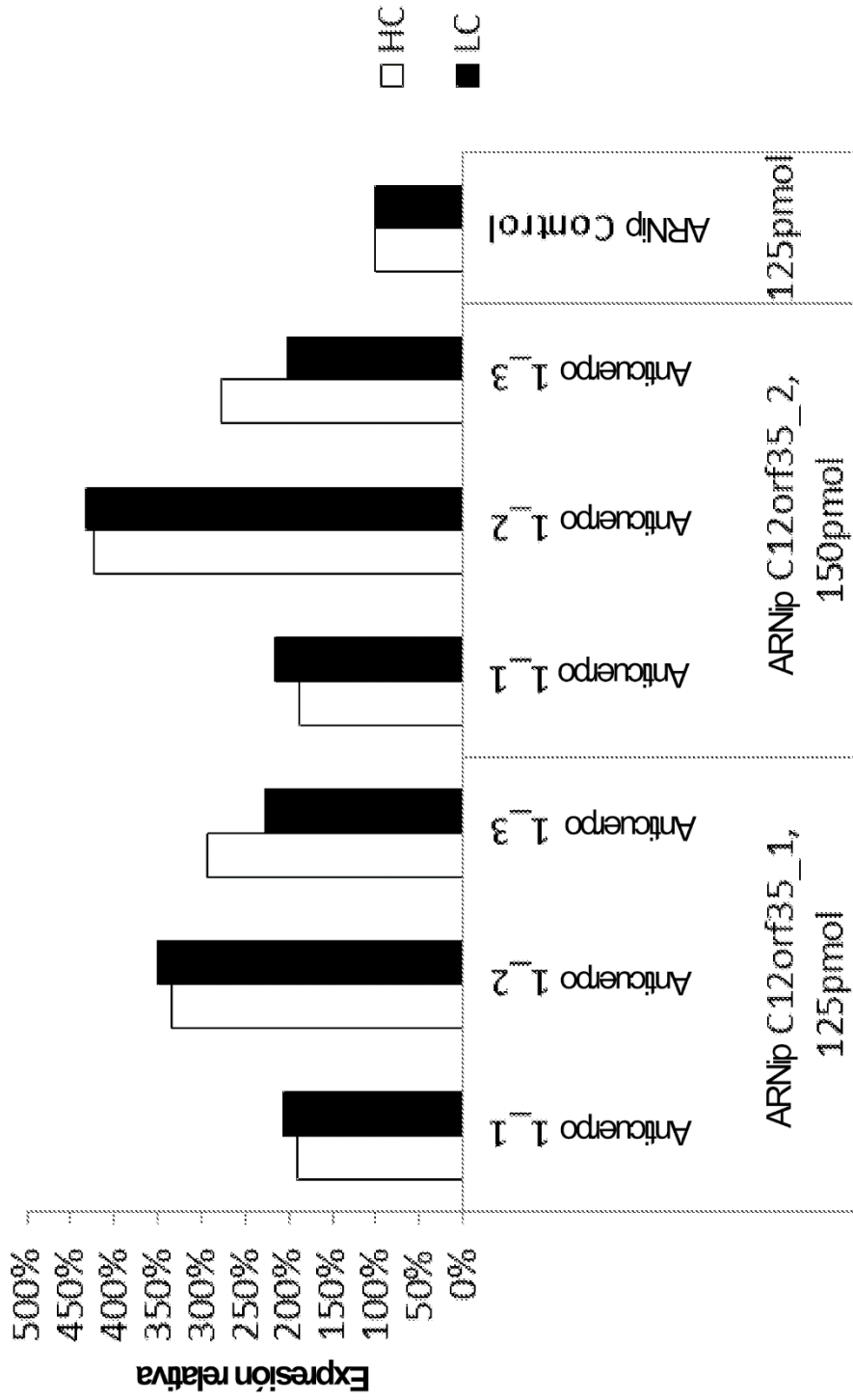


Fig. 4

Fig.5

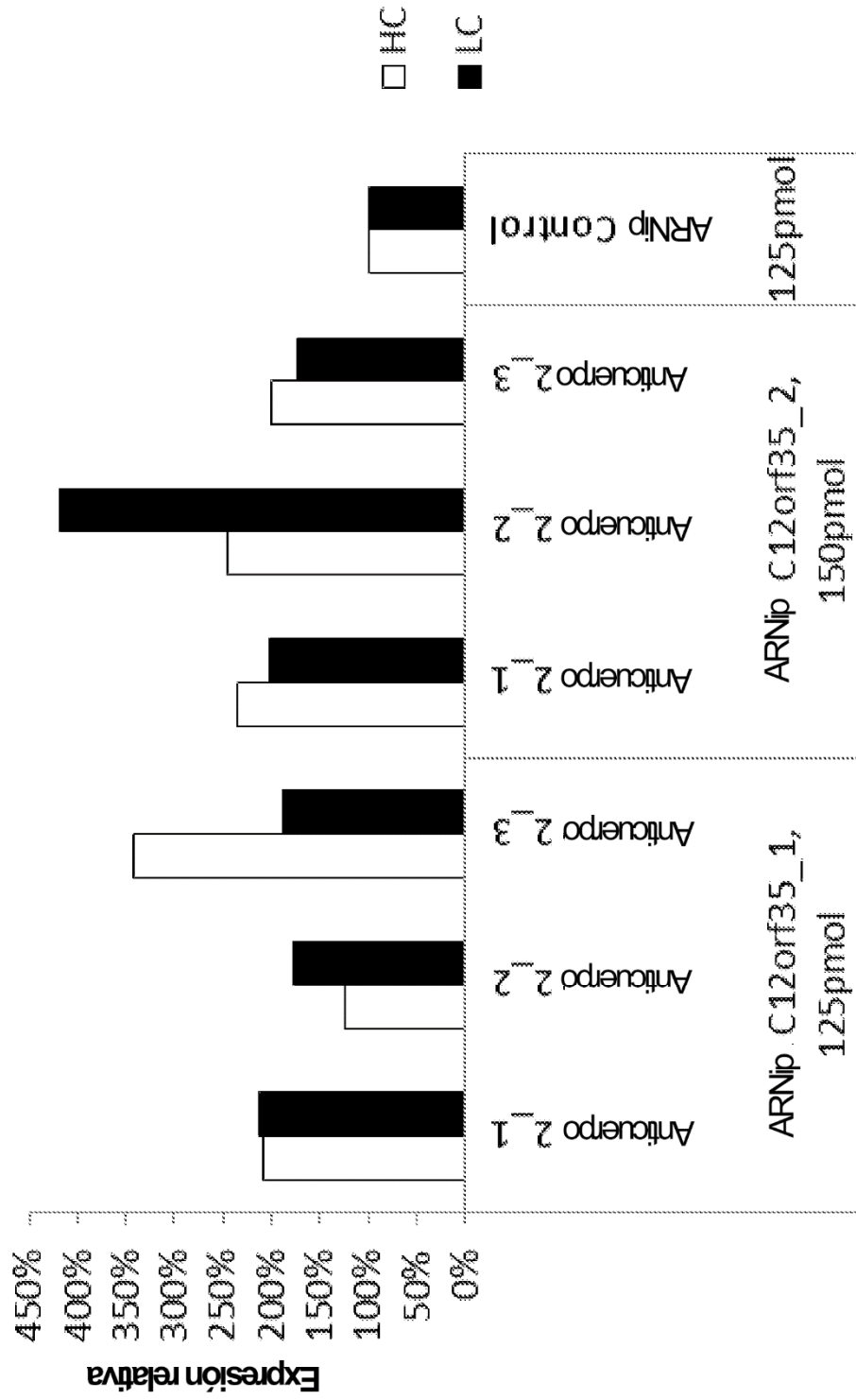
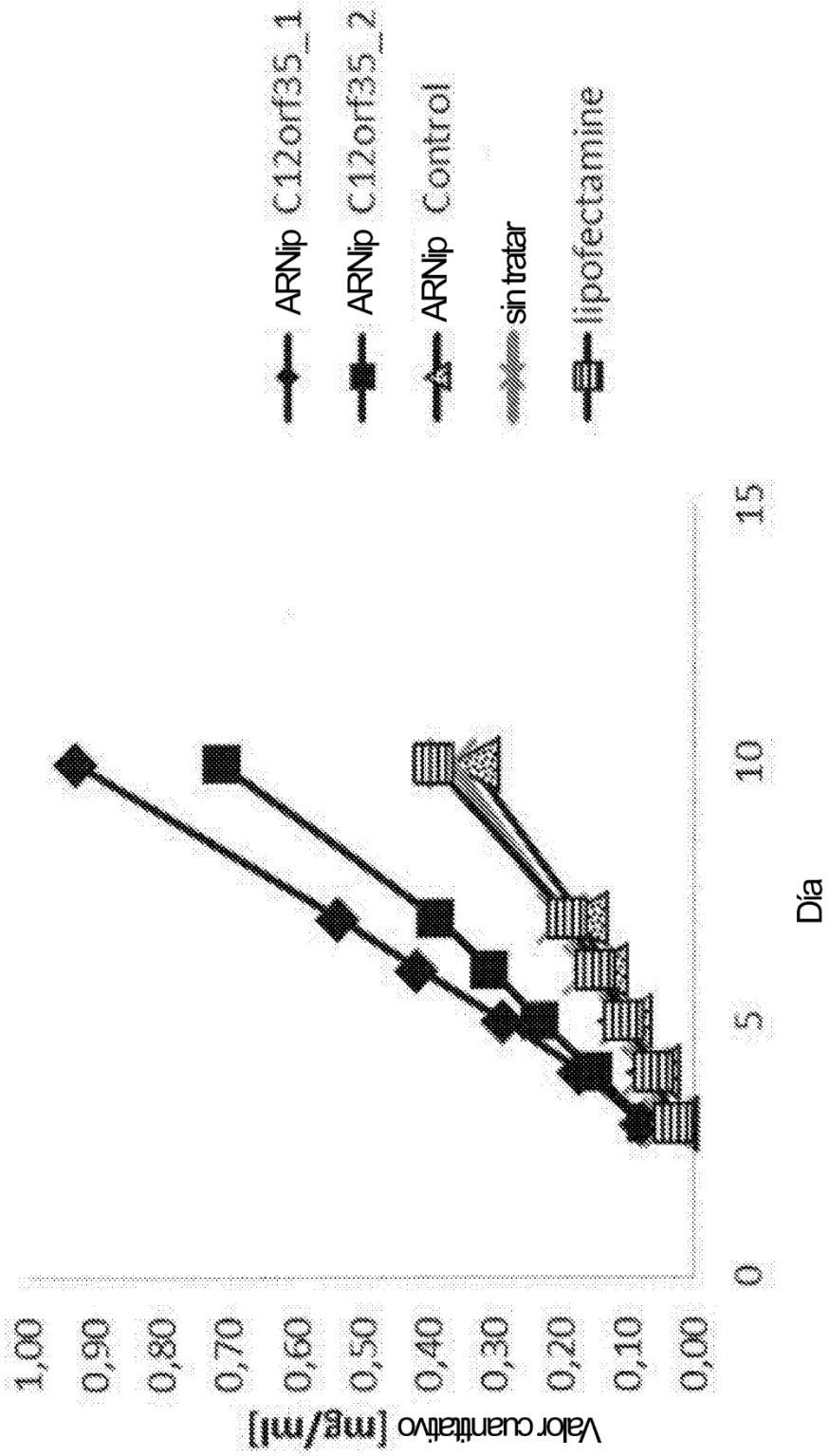


Fig. 6



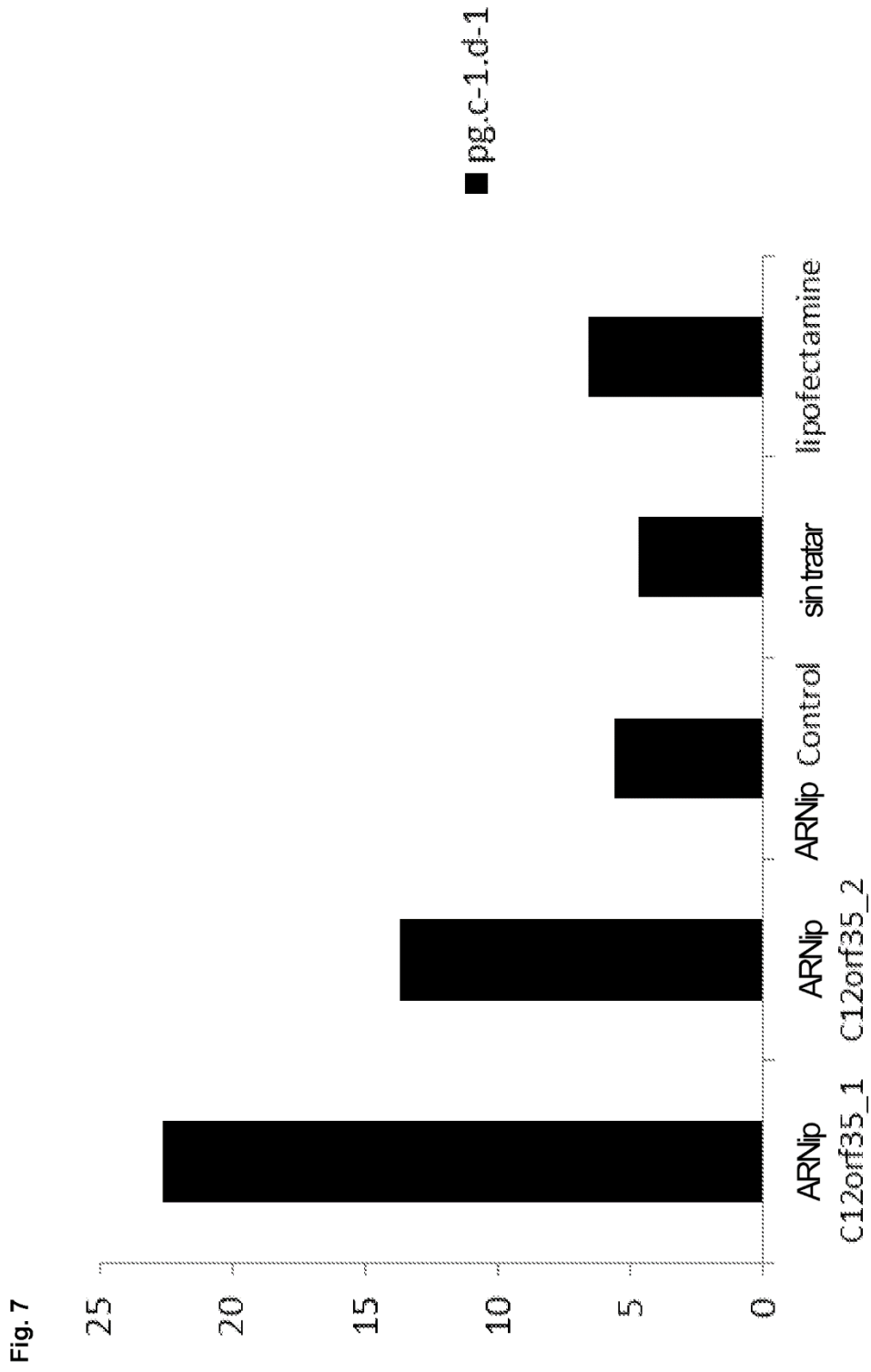


Fig. 8

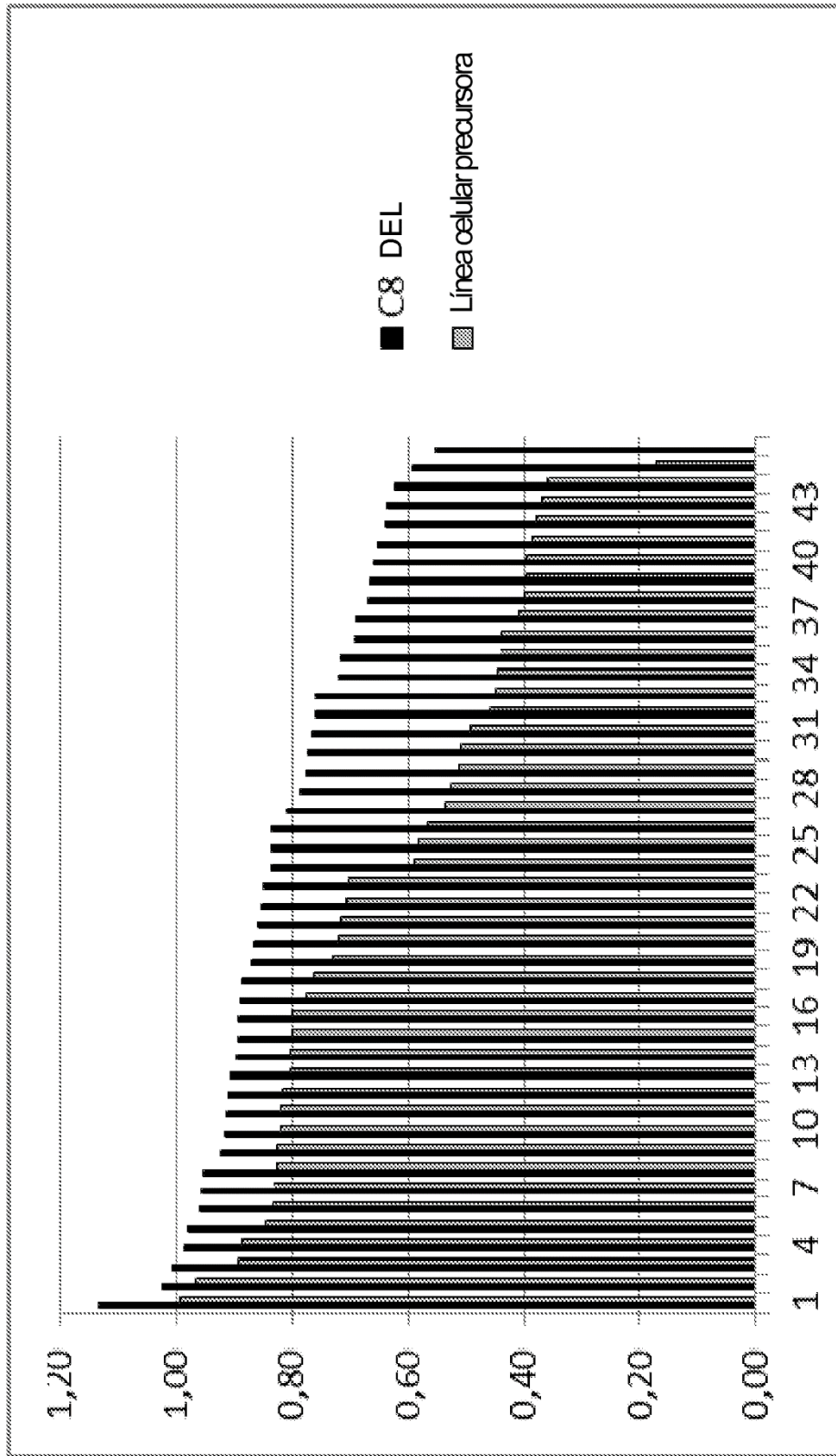
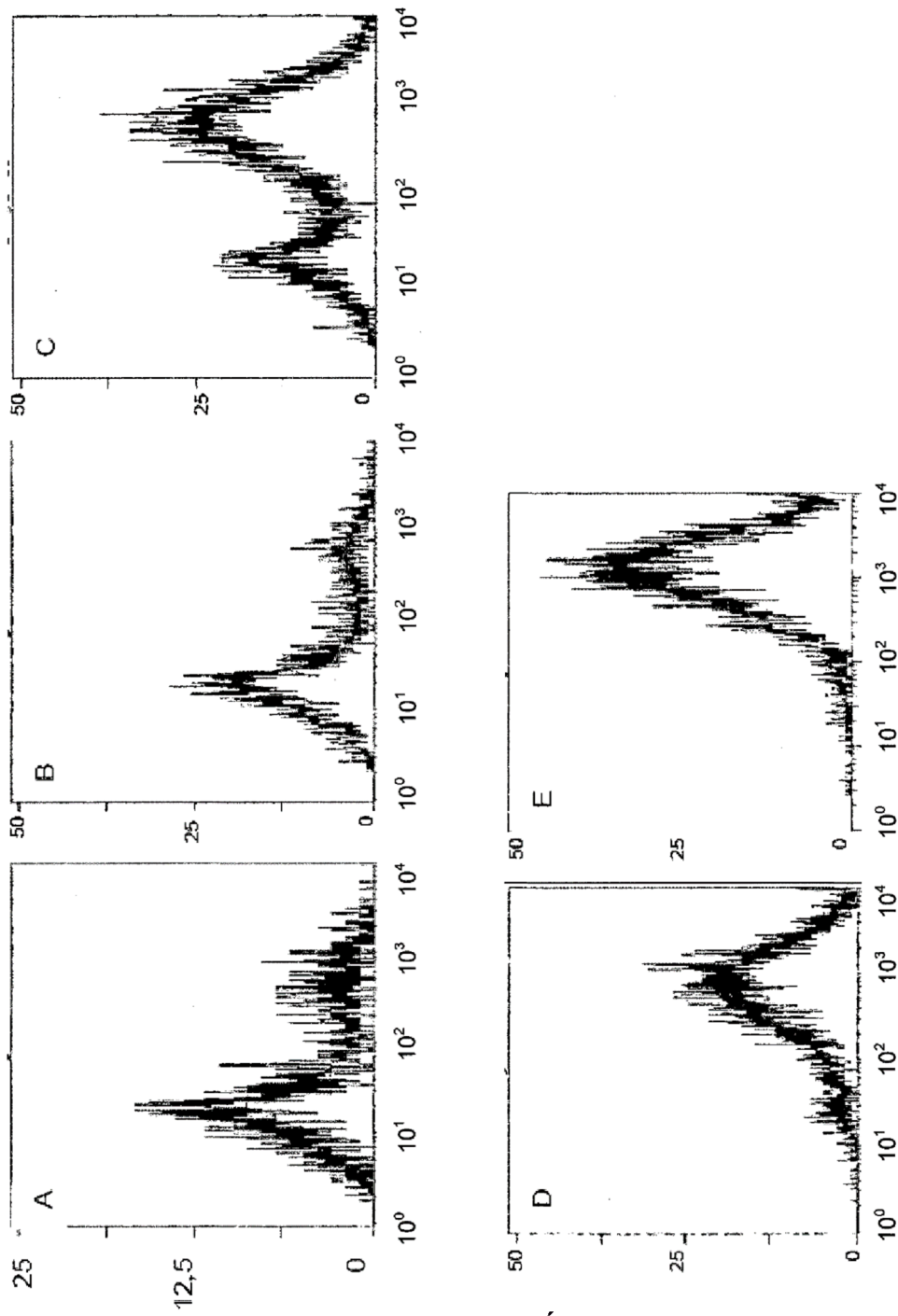


Fig. 9



HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

Fig. 10

