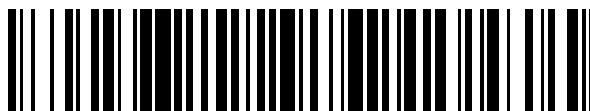


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 073**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016** **PCT/US2016/029472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16176275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016** **E 16787029 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3289092**

54 Título: **Método de fabricación de una proteína terapéutica**

30 Prioridad:

**27.04.2015 US 201562153178 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2020**

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**  
**301 Binney Street**  
**Cambridge, MA 02142, US y**  
**BIOFACTURA INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TIJANI, RASHEED;**  
**SAMPEY, DARRYL BACON;**  
**ROBBLEE, JOHN;**  
**WEI, GAN y**  
**HE, CHAOMEI**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

ES 2 789 073 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**

Método de fabricación de una proteína terapéutica

**5 Antecedentes de la invención**

La producción de proteínas terapéuticas usando sistemas de expresión de células de mamíferos es cada vez más importante dentro de la industria de la biotecnología. Se han descrito diversos sistemas de cultivo y transfección, pero cada uno tiene limitaciones significativas.

10 El documento US 2010/0028940 se refiere a métodos para usar vectores marcadores de selección para generar sistemas de expresión génica estables. Se divulgan, entre otros, métodos que comprenden transfectar células que son auxótrofas para el colesterol con un vector que codifica la 3-cetoesteroide reductasa (KSR).

15 El documento US 2012/0231500 se refiere a la expresión transitoria de polipéptidos heterólogos en líneas celulares de mamíferos. La línea celular puede comprender un ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr y un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa exógena.

20 Se puede acceder a un resumen de una disertación de D. Sampey, Development, characterization and optimization of a novel mammalian protein expression system en <https://rum.lib.umd.edu/handle/1903/19298>; la defensa oral fue en diciembre de 2016.

**Sumario de la invención**

25 La invención descrita en el presente documento se basa, en parte, en el descubrimiento de que la combinación de células auxótrofas para colesterol y auxótrofas para glutamina con marcadores de selección adicionales puede aprovecharse en métodos de fabricación de proteínas terapéuticas, para evitar complicaciones inesperadas de fabricación asociadas con células auxótrofas para colesterol (p. ej., baja productividad). La invención, según se reivindica, se refiere a un método de fabricación de una proteína terapéutica, que comprende: transfectar una célula

30 auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina con (i) un ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de colesterol en la célula; (ii) un ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de glutamina en la célula; (iii) un ácido nucleico que comprende un gen de resistencia a antibióticos aminoglucosídicos; y (iv) un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica.

35 En una realización, la célula es una célula NSO.

En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de fusión que contiene Fc.

40 En algunas realizaciones, en la etapa de transfección, la célula se transfecta con ácidos nucleicos (iii) que codifican una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (i) codifica una 3-cetoesteroide reductasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica una glutamina sintetasa.

45 En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácidos nucleicos (i) y (iv) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii). En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácido nucleico (i) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii) y (iii). En algunas realizaciones, la transfección del primer vector de expresión se realiza antes de la transfección del segundo vector de expresión. En

50 algunas realizaciones, la transfección del primer vector de expresión se realiza simultáneamente con la transfección del segundo vector de expresión.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la

55 transfección de ácido nucleico (ii)) en ausencia de glutamina introducida de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de un inhibidor de la glutamina sintetasa (p. ej., sulfoximina de metionina). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa.

60 En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en ausencia de glutamina introducida de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena, en ausencia de glutamina introducida de manera exógena y en presencia de un inhibidor de la glutamina sintetasa (p. ej., sulfoximina de metionina). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p.

65 ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en ausencia de glutamina introducida de

manera exógena.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica una glutamina sintetasa, una dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno o más genes de resistencia a antibióticos (p. ej., neomicina, blastidina, higromicina, puromicina, zeocina, ácido micofenólico).

En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácidos nucleicos (i) y (iv) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii). En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácido nucleico (i) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii) y (iv). En algunas realizaciones, la transfección del primer vector de expresión se realiza antes de la transfección del segundo vector de expresión. En algunas realizaciones, la transfección del primer vector de expresión se realiza simultáneamente con la transfección del segundo vector de expresión.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica el gen de resistencia a la neomicina de Tn5 que codifica un aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH 3' II).

En algunas realizaciones, tanto el primer como el segundo vector de expresión contienen HC y LC, un vector contiene KSR y el otro vector contiene GS u otro gen de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, hay tres vectores separados (p. ej., para selección triple), en donde los tres vectores contienen HC y LC; un primer vector contiene KSR, un segundo vector contiene GS y un tercer vector contiene cualquier gen de resistencia a antibióticos, p. ej., NEO.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de un antibiótico aminoglucosídico (p. ej., G418). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en presencia de un antibiótico aminoglucosídico (p. ej., G418).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica el gen de resistencia a la blastidina de *Bacillus cereus* (que codifica blastidina-S desaminasa).

En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en presencia de un antibiótico de nucleósido peptídico, un antibiótico aminoglucosídico (p. ej., blastidina).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica una higromicina B fosfotransferasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de un antibiótico aminoglucosídico (p. ej., higromicina B). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en presencia de un antibiótico de nucleósido peptídico, un antibiótico aminoglucosídico (p. ej., higromicina B).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica una puromicina N-acetil-transferasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de un antibiótico aminonucleosídico (p. ej., puromicina). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en presencia de un antibiótico de nucleósido peptídico, un antibiótico aminonucleosídico (p. ej., puromicina).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica un producto del gen Sh ble.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en

presencia de un antibiótico de glucopéptido quelado con cobre (p. ej., zeocina).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica el gen de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa (Ecogpt).

- 5 En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de MPA.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica el gen de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa (Ecogpt).

- 10 La invención presenta un método de fabricación de una proteína terapéutica, comprendiendo el método: cultivar una célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina; transfectar la célula con (i) un ácido nucleico que codifica una proteína que es capaz de restaurar la biosíntesis de colesterol en la célula (p. ej., KSR); (ii) un ácido nucleico que codifica una proteína que es capaz de restaurar la biosíntesis de glutamina en la célula (p. ej., glutatión sintetasa); (iii) un nucleico que comprende un gen de resistencia a antibióticos aminoglucosídicos que codifica una proteína que es capaz de proporcionar resistencia a G418 (p. ej., gen de resistencia a neomicina); y (iv) un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica (p. ej., un anticuerpo, p. ej., una cadena pesada y una cadena ligera); cultivar la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína terapéutica; y aislar y/o purificar la proteína terapéutica.

- 20 En algunas realizaciones, se transfecta en primer lugar ácido nucleico (iii) y durante y/o después de la transfección, se añade G418 al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se transfecta en primer lugar ácido nucleico (iii) y durante y/o después de la transfección, se añade G418 al medio de cultivo celular; y se transfecta en segundo lugar ácido nucleico (ii) y durante y/o después de la transfección el colesterol está ausente del medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se transfecta en primer lugar ácido nucleico (iii) y durante y/o después de la transfección, se añade G418 al medio de cultivo celular; y se transfecta en segundo lugar ácido nucleico (ii) y durante y/o después de la transfección el colesterol está ausente del medio de cultivo celular (p. ej., colesterol añadido de manera exógena); y se transfecta en tercer lugar ácido nucleico (i) y durante/después de la transfección la glutamina está ausente del medio de cultivo celular (p. ej., glutamina añadida de manera exógena) (opcionalmente, se añade sulfoximina de metionina (MSX) al medio de cultivo celular).

- 30 En algunas realizaciones, se transfectan simultáneamente ácido nucleico (ii) y (i), en donde se añade G418 al medio de cultivo celular y el medio de cultivo celular no contiene colesterol (p. ej., colesterol añadido de manera exógena). En algunas realizaciones, se transfectan simultáneamente ácidos nucleicos (i), (ii), (iii) y (iv), en donde el G418 se añade al medio de cultivo celular y el medio de cultivo celular no contiene colesterol (p. ej., colesterol añadido de manera exógena) y no contiene glutamina (p. ej., glutamina añadida de manera exógena) (opcionalmente se añade sulfoximina de metionina (MSX) al medio de cultivo celular). En algunas realizaciones, se incorpora ácido nucleico (iv) en la misma secuencia de ácido nucleico (p. ej., vector) que cada uno de (i), (ii) y (iii). En algunas realizaciones, se incorpora ácido nucleico (iv) en la misma secuencia de ácido nucleico (p. ej., vector) que cada uno de (i) y (ii); (i) y (iii); o (ii) y (iii). En algunas realizaciones, el ácido nucleico (iv) codifica la cadena pesada y ligera de un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, la cadena ligera se incorpora en la misma secuencia de ácido nucleico (p. ej., vector) que cada uno de (i) y (ii); (i) y (iii); (ii) y (iii); o (i), (ii) y (iii). En algunas realizaciones, la cadena pesada se incorpora en la misma secuencia de ácido nucleico (p. ej., vector) que cada uno de (i) y (ii); (i) y (iii); (ii) y (iii); o (i), (ii) y (iii). En algunas realizaciones, la cadena ligera y la cadena pesada se incorporan en la misma secuencia de ácido nucleico (p. ej., vector) que cada uno de (i) y (ii); (i) y (iii); (ii) y (iii); o (i), (ii) y (iii).

- 45 En algunas realizaciones, cualquiera de los ácidos nucleicos (i), (ii), (iii) y (iv) se incorporan en un único ácido nucleico (p. ej., un único vector). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i), (ii) y (iii); (i), (ii), (iii) y (iv); (ii) y (iii); o (ii) y (iv); (iii) y (iv); se incorporan en un único ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (iv) comprende dos ácidos nucleicos separados, uno que codifica una cadena pesada y otro que codifica una cadena ligera de un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, la cadena pesada se incorpora en otro ácido nucleico, p. ej., (i), (ii) o (iii). En algunas realizaciones, la cadena ligera se incorpora en otro ácido nucleico, p. ej., (i), (ii) o (iii).

En una realización, la célula es una célula NSO.

- 55 En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de fusión que contiene Fc.

- 60 En algunas realizaciones, en la etapa de transfección, la célula se transfecta con ácidos nucleicos (iv) que codifican una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (i) codifica una 3-cetoesteroide reductasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (ii) codifica una glutamina sintetasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (iii) codifica el gen de resistencia a la neomicina.

- 65 En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácido nucleico (i) y (iv) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii). En algunas realizaciones, un primer vector de expresión comprende ácido nucleico (i) y un segundo vector de expresión comprende ácidos nucleicos (ii) y (iv). En algunas realizaciones, la

transfección del primer vector de expresión se realiza antes de la transfección del segundo vector de expresión. En algunas realizaciones, la transfección del primer vector de expresión se realiza simultáneamente con la transfección del segundo vector de expresión.

- 5 En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en ausencia de glutamina introducida de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en presencia de un inhibidor de la glutamina sintetasa (p. ej., sulfoximina de metionina). En algunas realizaciones, la célula se cultiva  
10 (p. ej., durante y/o después de la transfección de ácido nucleico (i)) en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa.

En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y en ausencia de glutamina introducida de manera exógena. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en ausencia de colesterol introducido de manera exógena, en ausencia de glutamina introducida de manera exógena y en presencia de un inhibidor de la glutamina sintetasa (p. ej., sulfoximina de metionina). En algunas realizaciones, la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (i)) en ausencia de colesterol introducido de manera exógena y la célula se cultiva (p. ej., después de la transfección de ácido nucleico (ii)) en ausencia de glutamina introducida de  
15 manera exógena.

## 20 Breve descripción de las figuras

- La FIG. 1 representa un protocolo ilustrativo de los métodos descritos en el presente documento.  
La FIG. 2 representa la secuencia de aminoácidos de referencia del NCBI de la 3-cetoesteroide reductasa (NP\_057455) (SEQ ID NO: 1).  
25 La FIG. 3 representa la secuencia de ARNm de referencia del NCBI de HSD17B7 (NM\_016371.3) (SEQ ID NO: 2).  
La FIG. 4 representa la secuencia de aminoácidos de referencia del NCBI de la glutamina sintetasa (NP\_002056.2) (SEQ ID NO: 3).  
La FIG. 5A-E representa la secuencia de ARNm de referencia del NCBI de la glutamina sintetasa (NM\_002065.6) (SEQ ID NO: 4).  
30 La FIG. 6 representa la secuencia de aminoácidos de referencia del NCBI de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (NP\_000782.1) (SEQ ID NO: 5).  
La FIG. 7A-B representa la secuencia de ARNm de referencia del NCBI de DHFR (NM\_000791.3) (SEQ ID NO: 6).  
La FIG. 8 representa la estabilidad de las proteínas producidas usando el sistema de cultivo celular 3-KSR. La FIG. 8 enumera el título final de proteínas en el sobrenadante de células 3-KSR para 10 clones de células 3-KSR diferentes. Cuatro clones (3-261, 3-330, 3-351, 3-497) demostraron título de proteínas elevado. Sin embargo, como se muestra adicionalmente en la FIG. 8, el clon de 3-KSR 3-351, demostró una disminución de la productividad específica de célula.  
35 La FIG. 9 es un gráfico de líneas que representa la selección celular usando Neo (G418 100 µg/ml o 200 µg/ml). El gráfico representa la viabilidad celular frente a los días después la recuperación.  
La FIG. 10 es un gráfico de líneas que representa la selección celular usando glutatión sintetasa (GS) (reduce la concentración de glutamina de 2 mM a 0 mM o de 0,5 mM a 0 mM, respectivamente). El gráfico representa la viabilidad celular frente a los días después la recuperación.  
40 La FIG. 11 es un gráfico de líneas que representa la selección celular usando 3-KSR, neo y GS como selección triple. El gráfico representa la viabilidad celular frente a los días después la recuperación. El gen neo puede conferir resistencia a G418. La concentración de G418 en NSO es de 100 µg/ml y 200 µg/ml; reducen la concentración de glutamina de 2 mM a 0 mM o de 0,5 mM a 0 mM. También se puede usar un inhibidor de MSX para inhibir la actividad de GS.

## 50 Descripción detallada de la invención

En determinados sistemas de producción de proteínas recombinantes, tales como sistemas de células hospedadoras NSO, la auxotrofia para colesterol se aprovecha incorporando un gen de 3-cetoesteroide reductasa (3-KSR) en el vector que codifica la proteína terapéutica y se seleccionan células recombinantes eliminando el colesterol del medio de cultivo (documento US 2010/0028940). Sin embargo, los inventores de la presente divulgación descubrieron inesperadamente que este sistema puede adolecer de baja productividad (p. ej., producto proteico por célula al día) y títulos de proteínas bajos debido a la dificultad de amplificación en esta línea celular (véase, p. ej., FIG. 8). En otros sistemas de células hospedadoras NSO, la auxotrofia para glutamina se aprovecha incorporando un gen de glutamina sintetasa (GS) en el vector que codifica la proteína terapéutica y las células transfectadas se seleccionan eliminando la glutamina del medio de cultivo. Además, se puede añadir un inhibidor de GS al medio de cultivo para impulsar la selección hacia la incorporación de múltiples copias del gen GS y, por lo tanto, el gen que codifica la proteína de interés (Barnes *et al.* Cytotechnology. 2000. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NSO expression system Feb; 32 (2): 109-23). Cada sistema tiene limitaciones diferentes. Se describen en el presente documento métodos alternativos de fabricación de productos terapéuticos en, p. ej., un sistema de células  
55 hospedadoras NSO.

Una célula "auxótrofa para glutamina" como se usa en el presente documento se define como una célula que no sintetiza glutamina o no sintetiza suficiente glutamina para ser capaz de sobrevivir y crecer en medio de cultivo celular sin glutamina.

- 5 Una célula "auxótrofa para colesterol" como se usa en el presente documento se define como una célula que no sintetiza colesterol o no sintetiza suficiente colesterol para ser capaz de sobrevivir y crecer en medio de cultivo celular sin colesterol.

10 "Restaurar la biosíntesis de glutamina", como se usa en el presente documento, significa aumentar el nivel de biosíntesis de glutamina en una célula (desde el nivel en una célula auxótrofa para glutamina), al menos hasta un nivel que permita a la célula sobrevivir y crecer en medio de cultivo celular sin glutamina.

15 "Restaurar la biosíntesis de colesterol", como se usa en el presente documento, significa aumentar el nivel de biosíntesis de colesterol en una célula (desde el nivel en una célula auxótrofa para colesterol), al menos hasta un nivel que permita a la célula sobrevivir y crecer en medio de cultivo celular sin colesterol.

20 "Sobrevivir y crecer" o "supervivencia y crecimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una célula o cultivo de células para mantener más de 60 % de viabilidad celular durante el crecimiento en fase logarítmica, medida mediante exclusión con azul tripano.

### 3-cetoesteroide reductasa (KSR)

25 La enzima 3-cetoesteroide reductasa está codificada por el gen HSD17 $\beta$ 7 y actúa como una 3-cetoesteroide reductasa en la biosíntesis del colesterol (Marijanovic *et al.*, Mol Endocrinol. septiembre de 2003; 17 (9): 1715-25). Véase FIG. 2 (SEQ ID NO: 1) y FIG. 3 (SEQ ID NO: 2), respectivamente, para la secuencia de aminoácidos (NP\_057455) y ARNm (NM\_016371.3) de referencia del NCBI.

### Glutamina sintetasa (GS)

30 La enzima glutamina sintetasa codificada por el gen de glutamina sintetasa cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amoníaco (Eisenberg *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 2000, vol. 1477, 122-145). Se han encontrado varias variantes de transcrito con cortes y empalmes alternativos para este gen. Véase FIG. 4 (SEQ ID NO: 3) y FIG. 5 (SEQ ID NO: 4), respectivamente, para la secuencia de aminoácidos (NP\_002056.2) y ARNm (NM\_002065.6) de referencia del NCBI.

### Dihidrofolato reductasa (DHFR)

40 La enzima DHFR está codificada por el gen *DHFR* y convierte dihidrofolato en tetrahidrofolato, una lanzadera de grupo metilo necesaria para la síntesis *de novo* de purinas, ácido timidílico y determinados aminoácidos. Se han encontrado varias variantes de transcrito con cortes y empalmes alternativos para este gen. Véase FIG. 6 (SEQ ID NO: 5) y FIG. 7 (SEQ ID NO: 6), respectivamente, para la secuencia de aminoácidos (NP\_000782.1) y ARNm (NM\_000791.3) de referencia del NCBI.

### Marcadores de selección de genes de resistencia a antibióticos

45 Los genes de resistencia a antibióticos son marcadores de selección positiva usados habitualmente en el cultivo de células de mamíferos (véase, p. ej., Antibody Expression and Production, editor Mohamed Al-Rubeai, Springer Netherlands, Springer Science Business Media B.V., ISBN 978-94-007-1256-0; Cell Line Development, Mohamed Al-Rubeai 11 de agosto de 2009 Springer Science & Business Media). Los genes de resistencia a antibióticos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, genes que confieren resistencia al gen de resistencia a neomicina, blasticidina, higromicina, puromicina, zeocina, ácido micofenólico. Un experto en la materia conocería genes de resistencia a antibióticos adecuados e inhibidores correspondientes para su uso en selección celular.

55 En el método de la invención, se usa un gen de resistencia a antibióticos aminoglucosídicos.

Tabla 1. Marcadores de selección de antibióticos ilustrativos

| Antibiótico   | Mecanismo de acción                                                                                                                                                                                                                                             | Gen de resistencia  |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Higromicina B | La higromicina B es un antibiótico aminoglucosídico producido por <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . La higromicina B inhibe la síntesis de proteínas. Se ha informado de que interfiere con la translocación y provoca traducción errónea en el ribosoma 70S. | El gen <i>hph</i> . |

(continuación)

| Antibiótico  | Mecanismo de acción                                                                                                                                                                                                                                                         | Gen de resistencia                                                                                                                                      |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zeocin®      | Zeocin® es un antibiótico glucopeptídico quelado con cobre producido por <i>Streptomyces</i> CL990. Zeocin™ provoca muerte celular al intercalarse en el ADN y escindirlo.                                                                                                  | El gen Sh ble.                                                                                                                                          |
| Blasticidina | La blasticidina es un antibiótico de nucleósido peptídico aislado de <i>Streptomyces griseochromogenes</i> que inhibe la síntesis de proteínas al interferir con la formación de enlaces peptídicos en la maquinaria ribosómica.                                            | El gen de resistencia a blasticidina de <i>Bacillus cereus</i> (bsr), que codifica la blasticidina-S desaminasa.                                        |
| Puromicina   | La puromicina es un antibiótico aminonucleosídico producido por <i>Streptomyces alboniger</i> . Inhibe específicamente la transferencia de peptidilo en ribosomas tanto procariotas como eucariotas.                                                                        | El gen Pac que codifica una puromicina N-acetil-transferasa (PAC) que se encontró en una cepa productora de <i>Streptomyces</i> .                       |
| Geneticin    | G418 (Geneticin) es un antibiótico aminoglucosídico de estructura similar a la gentamicina B1, producido por <i>Micromonospora rhodorangea</i> . G418 bloquea la síntesis de polipéptidos al inhibir la etapa de alargamiento en células tanto procariotas como eucariotas. | El gen de resistencia a la neomicina (neo) de Tn5 que codifica una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, APH 3' II.                                       |
| Fleomicina   | La fleomicina es un antibiótico glucopeptídico de la familia de la bleomicina, aislado de una cepa mutante de <i>Streptomyces verticillus</i> . Se une e intercala en el ADN destruyendo de este modo la integridad de la doble hélice.                                     | El gen Sh ble de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> que codifica una proteína que se une con fleomicina, inhibiendo su actividad de escisión de ADN. |

### Vectores, células hospedadoras y producción de proteínas terapéuticas

- 5 Las proteínas terapéuticas para su uso en la invención se pueden producir a partir de una célula hospedadora. Una célula hospedadora se refiere a un vehículo que incluye los componentes celulares necesarios, p. ej., orgánulos, que se necesitan para expresar los polipéptidos y construcciones descritos en el presente documento a partir de sus ácidos nucleicos correspondientes. Los ácidos nucleicos se pueden incluir en vectores de ácido nucleico que pueden introducirse en la célula hospedadora mediante técnicas convencionales conocidas en este campo (p. ej., transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, infección, etc.). La elección de los vectores de ácido nucleico depende en parte de las células hospedadoras para usar. En general, son células hospedadoras preferidas las de origen procariota (p. ej., bacteriano) o eucariota (p. ej., de mamífero).

#### 15 Construcción de vector de ácido nucleico y células hospedadoras

Una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica para su uso en la invención puede prepararse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida) y mutagénesis por PCR. Se puede obtener una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para su uso en la invención usando técnicas convencionales, p. ej., síntesis génica. Como alternativa, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica de tipo silvestre puede mutarse para contener sustituciones de aminoácidos específicas usando técnicas convencionales en este campo, p. ej., mutagénesis QuikChange™. Las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR.

25 Se pueden insertar secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína terapéutica para su uso en la invención en un vector capaz de replicar y expresar las moléculas de ácido nucleico en células hospedadoras procariotas o eucariotas. Muchos vectores están disponibles en la técnica y pueden usarse para el fin de la invención. Cada vector puede contener diversos componentes que pueden ajustarse y optimizarse con respecto a compatibilidad con la célula hospedadora particular. Por ejemplo, los componentes del vector pueden incluir, pero sin limitación, un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés y una secuencia de terminación de la transcripción.

30 En un ejemplo, los vectores para su uso en la invención incluyen: un vector que comprende un promotor débil para un gen de selección (p. ej., 3-cetoesteroide reductasa y glutamina sintetasa) y un fuerte promotor para el gen que codifica la proteína de interés (p. ej., un anticuerpo, p. ej., cadena pesada y ligera de un anticuerpo). Los vectores pueden ser linealizados o superenrollados que presentan mejor eficacia de transfección. En algunas realizaciones, se emplea optimización de codones del vector para minimizar el uso de codones infrecuentes en la secuencia codificante y mejorar los rendimientos de producción de proteínas. Se describen vectores ilustrativos para su uso en la invención en Wurm (2004) Nature Biotechnology, vol. 22; número 11: 1393-1398.

En algunas realizaciones, se usan células de mamífero como células hospedadoras. El fenotipo auxótrofo para glutamina y auxótrofo para colesterol puede ser inducido por la manipulación genética de una célula no auxótrofa para glutamina y no auxótrofa para colesterol, incluyendo, por ejemplo, mutación o supresión de un gen necesario para la biosíntesis de glutamina endógena, tal como glutamina sintetasa. Los expertos en la técnica conocen bien métodos habituales de ingeniería genética, p. ej., mutagénesis dirigida, nucleasas de dedos de cinc, ARNhp, transposones, Véase, p. ej., Cytotechnology. Abril de 2007; 53 (1-3): 65-73. Las células de mieloma murino denominadas NSO son células auxótrofas para glutamina y auxótrofas para colesterol conocidas (véase, p. ej., Barnes *et al.* Cytotechnology. 2000. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NSO expression system feb; 32 (2): 109-23; y documento US 2010/0028940.

Los ejemplos adicionales de tipos celulares de mamífero que pueden manipularse para usarlos como células hospedadoras incluyen, pero sin limitación, células de riñón embrionario humano (HEK) (p. ej., HEK293, HEK 293F), de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NSO, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D), CRL7030 y HsS78Bst. En otras realizaciones, se usan células *E. coli* como células hospedadoras para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen, pero sin limitación, *E. coli* 294 (ATCC® 31.446), *E. coli* λ 1776 (ATCC® 31.537, *E. coli* BL21 (DE3) (ATCC® BAA-1025) y *E. coli* RV308 (ATCC® 31.608). Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posteriores a la traducción de productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores adecuados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína terapéutica expresada. Los vectores de expresión descritos anteriormente pueden introducirse en células hospedadoras adecuadas usando técnicas convencionales en este campo, p. ej., transformación, transfección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio y microinyección directa. Una vez que los vectores se introducen en células hospedadoras para la producción de proteínas, las células hospedadoras se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Se conocen en la técnica métodos para la expresión de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press; 2ª ed. 2004 (20 de julio de 2004) y Vladimir Voynov y Justin A. Caravella (eds.) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) Humana Press; 2ª ed. 2012 (28 de junio de 2012).

#### Producción, recuperación y purificación de proteínas

Se pueden cultivar células hospedadoras usadas para producir una proteína terapéutica para su uso en la invención en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados para células hospedadoras de mamífero incluyen medio esencial mínimo (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio de expresión Expi293™, DMEM con suero bovino fetal complementado (FBS) y RPMI-1640. Los ejemplos de medios adecuados para células hospedadoras bacterianas incluyen caldo de cultivo Luria (LB) más los complementos necesarios, tales como un agente de selección, p. ej., ampicilina. Las células hospedadoras se cultivan a temperaturas adecuadas, tales como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, p. ej., de 25 °C a aproximadamente 37 °C, preferentemente 37 °C, y niveles de CO<sub>2</sub> adecuados, tales como de 5 a 10 % (preferentemente 8 %). El pH del medio es, en general, de aproximadamente 6,8 a 7,4, p. ej., 7,0, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. Se conocen en la técnica condiciones convencionales de cultivo celular para la producción de una proteína terapéutica, p. ej., véase Butler, Cell Culture and Upstream Processing, Taylor y Francis; 1ª edición (25 de mayo de 2007).

La recuperación de proteínas implica normalmente romper la célula hospedadora, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se han roto, se pueden eliminar los residuos celulares mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente. Un anticuerpo para su uso en la invención puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica de purificación de proteínas, por ejemplo, por afinidad de proteína A, otra cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. (véase Process Scale Purification of Antibodies, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009). En algunos casos, una proteína terapéutica se puede conjugar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (marcador de His), que se une a la columna de afinidad de agarosa funcionalizada con níquel con afinidad micromolar. Otros marcadores peptídicos útiles para purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo procedente de la proteína hemaglutinina de la gripe.

#### Composiciones y preparaciones farmacéuticas

El método de la invención se puede usar para fabricar composiciones farmacéuticas que incluyen una o más proteínas terapéuticas descritas en el presente documento. Además de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica, las composiciones farmacéuticas pueden contener uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden formularse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

Los vehículos y excipientes aceptables en las composiciones farmacéuticas no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los vehículos y excipientes aceptables pueden incluir tampones, antioxidantes, conservantes, polímeros, aminoácidos y carbohidratos. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral en forma de una formulación inyectable. Las composiciones farmacéuticas para inyección (es decir, inyección intravenosa) se pueden formular usando una solución estéril o cualquier líquido farmacéuticamente aceptable como vehículo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina fisiológica y medios de cultivo celular (p. ej., medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio de Eagle modificado con  $\alpha$  (a-MEM), medio F-12). Se conocen en la técnica métodos de formulación, véase, p. ej., Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2ª ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006).

La composición farmacéutica se puede formar en una forma de dosis unitaria según sea necesario. La cantidad de componente activo, p. ej., una o más proteínas terapéuticas de la invención incluidas en las preparaciones farmacéuticas es tal que se proporciona una dosis adecuada dentro del intervalo designado (p. ej., una dosis dentro del intervalo de 0,01-500 mg/kg de peso corporal).

### Proteínas terapéuticas

Las proteínas terapéuticas que pueden prepararse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier proteína terapéutica recombinante de interés o biosimilar de la misma, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multispecíficos), proteínas de fusión (p. ej., fusión de Fc), anticoagulantes, factores sanguíneos, proteínas morfogenéticas óseas, armazones proteicos modificados por ingeniería genética, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, factores liberadores de hormonas, interferones, interleucinas y trombolíticos. Las proteínas terapéuticas incluyen proteínas tanto glucosiladas (p. ej., proteínas que tienen al menos una cadena de oligosacáridos) como no glucosiladas.

Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen, pero sin limitación, adalimumab, infliximab, palivizumab, cetuximab, natalizumab, eculizumab, ustekinumab, golimumab, ofatumab, canakinumab, belimumab, alirocumab, mepolizumab, necitumumab, nivolumab, dinutuximab, secukinumab, evolocumab, blinatumomab, pembrolizumab, ramucirumab, vedolizumab, siltuximab, obinutuzumab, trastuzumab, raxibacumab, pertuzumab, brentuximab, ipilimumab, denosumab, tocilizumab, ofatumumab, canakinumab, certolizumab, catumaxomab, ranibizumab, panitumumab, bevacizumab, cetuximab, efalizumab, omalizumab, tositumomab, ibritumomab, alemtuzumab, gemtuzumab, basiliximab, daclizumab, rituximab y abciximab.

Las proteínas de fusión ilustrativas incluyen, pero sin limitación, alefacept, entanercept, abatacept, belatacept, aflibercept, ziv-aflibercept, rilonacept, romiplostim, apocept, trebananib, blisibimod y dulaglutida.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1. Fabricación de anticuerpos terapéuticos que utilizan una célula auxótrofa doble

El siguiente ejemplo describe métodos de fabricación de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, que comprenden la expresión de la proteína terapéutica de interés en una célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina. El método permite convenientemente el aumento en la amplificación y el número de copias del gen de interés y la producción en ausencia de colesterol, que es muy insoluble en soluciones acuosas y con el que es muy difícil trabajar. El método ilustrativo se describe adicionalmente en la **FIG. 1**.

Las células auxótrofas para glutamina y auxótrofas para colesterol, tales como células NSO, se transfectan con un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una 3-cetoesteroide reductasa (3-KSR). Durante y después de esta primera transfección, las células se mantienen en medio de cultivo sin colesterol para seleccionar las células que expresan el primer vector, produciendo de este modo un cultivo de células auxótrofas para glutamina que expresan 3-KSR. Estas células se transfectan simultánea o posteriormente con un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa (GS) y la proteína de interés, p. ej., la cadena pesada y ligera de un anticuerpo terapéutico. Durante y después de esta segunda transfección, las células se mantienen en medio de cultivo celular sin glutamina para seleccionar las células que expresan el segundo vector. Para seleccionar adicionalmente las células que han incorporado múltiples copias del segundo vector, el medio de cultivo celular durante y/o después de la segunda transfección se complementa con un inhibidor de la glutamina sintetasa tal como sulfoximina de metionina (MSX). Las células productoras de anticuerpos de 3-KSR-GS finales pueden mantenerse en un medio sin colesterol, evitando problemas de fabricación asociados con colesterol, y presentan un alto nivel de productividad procedente de la selección de MSX.

#### Ejemplo 2: Ensayo de viabilidad celular:

El siguiente ejemplo describe un ensayo de azul tripano para determinar la viabilidad celular como un sustituto de células que presentan supervivencia y crecimiento adecuados.

Preparar una solución al 0,4 % de azul tripano en solución salina isotónica tamponada, pH de 7,2 a 7,3 (es decir, solución salina tamponada con fosfato). Añadir 0,1 ml de solución madre de azul tripano a 1 ml de células. Cargar un hemocitómetro y examinar inmediatamente bajo un microscopio con bajo aumento. Contar la cantidad de células con tinción azul y la cantidad de células totales. La viabilidad celular se calcula como el número de células viables dividido por el número total de células dentro de las cuadrículas en el hemocitómetro. Si las células captan azul tripano, se consideran inviables. La viabilidad celular es al menos del 90 % para cultivos sanos en fase logarítmica.

$$\% \text{ de células viables} = [1,00 - (\text{número de células azules} \div \text{número de células totales})] \times 100$$

La densidad celular de la suspensión de la línea celular se puede determinar usando un hemocitómetro. Para calcular el número de células viables por ml de cultivo, se usa la siguiente fórmula, corrigiendo con respecto al factor de dilución: número de células viables  $\times 10E4 \times 1,1$  = células/ml de cultivo.

### Ejemplo 3. Fabricación de anticuerpos terapéuticos utilizando un método de selección triple

El siguiente ejemplo describe métodos de fabricación de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, que comprenden expresión de la proteína terapéutica de interés en una célula auxótrofa para colesterol y glutamina con un tercer mecanismo de selección adicional, p. ej., gen de resistencia a la neomicina (p. ej., usando G418 para selección). El método permite convenientemente el aumento en la amplificación y el número de copias del gen de interés y la producción en ausencia de colesterol, que es muy insoluble en soluciones acuosas y con el que es muy difícil trabajar, superando al mismo tiempo las dificultades de fabricación inesperadas asociadas con el sistema de selección de cultivo celular de 3-KSR, incluyendo, por ejemplo, baja productividad.

La selección de células NSO se optimizó en primer lugar usando tanto una sola selección de neomicina (**FIG. 9**) como una sola selección de GS (**FIG. 10**). Para la optimización de neomicina, se transfectaron células según la práctica convencional con un vector de ácido nucleico que codifica un gen de resistencia a la neomicina. Después se añadió neomicina al medio de cultivo celular a (100  $\mu\text{g/ml}$  o 200  $\mu\text{g/ml}$ ) para selección. La viabilidad celular se midió en los días indicados después de la recuperación. Para selección basada en GS, las células se transfectaron con un vector de ácido nucleico que codifica GS y se mantuvieron en medios de cultivo celular sin glutamina. La viabilidad celular se midió en los días indicados después de la recuperación. Se optimizó un método de selección triple basado en 3-KSR usando selección de neomicina, 3-KSR y GS para superar la productividad inesperadamente baja asociada con la selección de 3-KSR (**FIG. 8**). Las células se transfectaron según la práctica convencional con uno o más vectores de ácido nucleico que codifican un gen de resistencia a 3-KSR, GS y neomicina. Para selección, las células se mantuvieron en ausencia de glutamina y colesterol y en presencia de neomicina. Como se muestra en la **FIG. 11**, la selección triple mantuvo amplia viabilidad celular después de la recuperación.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.  
BIOFACTURA, INC.

<120> MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

<130> P104127EP51

<140> EP 16 787 029.4  
<141> 2016-04-27

<150> US 62 / 153,178  
<151> 27/04/2015

160(7):

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 341  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

# ES 2 789 073 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Lys | Val | Val | Leu | Ile | Thr | Gly | Ala | Ser | Ser | Gly | Ile | Gly | Leu | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ala | Leu | Cys | Lys | Arg | Leu | Leu | Ala | Glu | Asp | Asp | Glu | Leu | His | Leu | Cys | 20  | 25  | 30  |     |
| Leu | Ala | Cys | Arg | Asn | Met | Ser | Lys | Ala | Glu | Ala | Val | Cys | Ala | Ala | Leu | 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Ala | Ser | His | Pro | Thr | Ala | Glu | Val | Thr | Ile | Val | Gln | Val | Asp | Val | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Asn | Leu | Gln | Ser | Val | Phe | Arg | Ala | Ser | Lys | Glu | Leu | Lys | Gln | Arg | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Phe | Gln | Arg | Leu | Asp | Cys | Ile | Tyr | Leu | Asn | Ala | Gly | Ile | Met | Pro | Asn | 85  | 90  | 95  |     |
| Pro | Gln | Leu | Asn | Ile | Lys | Ala | Leu | Phe | Phe | Gly | Leu | Phe | Ser | Arg | Lys | 100 | 105 | 110 |     |
| Val | Ile | His | Met | Phe | Ser | Thr | Ala | Glu | Gly | Leu | Leu | Thr | Gln | Gly | Asp | 115 | 120 | 125 |     |
| Lys | Ile | Thr | Ala | Asp | Gly | Leu | Gln | Glu | Val | Phe | Glu | Thr | Asn | Val | Phe | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | His | Phe | Ile | Leu | Ile | Arg | Glu | Leu | Glu | Pro | Leu | Leu | Cys | His | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |

# ES 2 789 073 T3

Asp Asn Pro Ser Gln Leu Ile Trp Thr Ser Ser Arg Ser Ala Arg Lys  
 165 170 175  
 Ser Asn Phe Ser Leu Glu Asp Phe Gln His Ser Lys Gly Lys Glu Pro  
 180 185 190  
 Tyr Ser Ser Ser Lys Tyr Ala Thr Asp Leu Leu Ser Val Ala Leu Asn  
 195 200 205  
 Arg Asn Phe Asn Gln Gln Gly Leu Tyr Ser Asn Val Ala Cys Pro Gly  
 210 215 220  
 Thr Ala Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Gly Ile Leu Pro Pro Phe Ile Trp  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Leu Met Pro Ala Ile Leu Leu Leu Arg Phe Phe Ala Asn Ala  
 245 250 255  
 Phe Thr Leu Thr Pro Tyr Asn Gly Thr Glu Ala Leu Val Trp Leu Phe  
 260 265 270  
 His Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asn Pro Leu Ile Lys Tyr Leu Ser Ala  
 275 280 285  
 Thr Thr Gly Phe Gly Arg Asn Tyr Ile Met Thr Gln Lys Met Asp Leu  
 290 295 300  
 Asp Glu Asp Thr Ala Glu Lys Phe Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Lys His Ile Arg Val Thr Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gln Ala Arg Leu  
 325 330 335  
 Ser Gly Ser Cys Leu  
 340

<210> 2  
 <211> 1537  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

# ES 2 789 073 T3

|            |             |             |            |            |            |      |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| gtactctgat | tggtgacggg  | tgaggcggcc  | cgaaatcgta | ggacttccga | aagcagcggc | 60   |
| ggcgtttgct | tactgcttg   | gaagtgtgag  | tgcgcgaaga | tgcgaaaggt | ggttttgatc | 120  |
| accggggcta | gcagtggcat  | tggcctggcc  | ctctgcaagc | ggctgctggc | ggaagatgat | 180  |
| gagcttcata | tgtgtttggc  | gtgcaggaac  | atgagcaagg | cagaagctgt | ctgtgctgct | 240  |
| ctgctggcct | ctcaccacac  | tgctgaggtc  | accattgtcc | aggtggatgt | cagcaacctg | 300  |
| cagtcggtct | tccgggcctc  | caaggaactt  | aagcaaaggt | ttcagagatt | agactgtata | 360  |
| tatctaaatg | ctgggatcat  | gcctaatacca | caactaaata | tcaaagcact | tttctttggc | 420  |
| ctcttttcaa | gaaaagtgat  | tcatatgttc  | tccacagctg | aaggcctgct | gaccaggggt | 480  |
| gataagatca | ctgctgatgg  | acttcaggag  | gtgtttgaga | ccaatgtctt | tggccatttt | 540  |
| atcctgattc | gggaactgga  | gcctctcctc  | tgtcacagtg | acaatccatc | tcagctcatc | 600  |
| tggacatcat | ctcgcagtgc  | aaggaaatct  | aatttcagcc | tcgaggactt | ccagcacagc | 660  |
| aaaggcaagg | aacctacag   | ctcttccaaa  | tatgccactg | accttttgag | tgtggctttg | 720  |
| aacaggaact | tcaaccagca  | gggtctctat  | tccaatgtgg | cctgtccagg | tacagcattg | 780  |
| accaatttga | catatggaat  | tctgcctccg  | tttatatgga | cgctgttgat | gccggcaata | 840  |
| ttgctacttc | gcttttttgc  | aatgcattc   | actttgacac | catataatgg | aacagaagct | 900  |
| ctggtatggc | ttttccacca  | aaagcctgaa  | tctctcaatc | ctctgatcaa | atatctgagt | 960  |
| gccaccactg | gcttttgaag  | aaattacatt  | atgaccaga  | agatggacct | agatgaagac | 1020 |
| actgctgaaa | aattttatca  | aaagtactg   | gaactggaaa | agcacattag | ggtcactatt | 1080 |
| caaaaaacag | ataatcaggc  | caggctcagt  | ggctcatgcc | tataattcca | gcactttggg | 1140 |
| aggccaaggc | agaaggatca  | cttgagacca  | ggagttcaag | accagcctga | gaaacatagt | 1200 |
| gagcccttgt | ctctacaaaa  | agaaataaaa  | ataatagctg | ggtgtggtgg | catgcgcatg | 1260 |
| tagtcccagc | tactcagaag  | gatgaggtgg  | gaggatctct | tgaggctggg | aggcagaggt | 1320 |
| tgcagtgagc | tgagattgtg  | ccactgcaact | ccagcctggg | tgacagcgag | accctgtctc | 1380 |
| aaaatatgta | tatatattaat | atatatataa  | aaccagagct | gacaatgaca | ctctggaaca | 1440 |
| ttgcatacct | tctgtacatt  | ctgggttaca  | tggatttcta | ctgagttgga | taatatgcat | 1500 |
| ttgtaataaa | ctatgaacta  | tgaaaaaaaaa | aaaaaaa    |            |            | 1537 |

5 <210> 3  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

# ES 2 789 073 T3

Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val  
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp  
20 25 30

Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp  
35 40 45

# ES 2 789 073 T3

Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly  
 50 55 60  
 Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu  
 85 90 95  
 Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn  
 100 105 110  
 Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His  
 115 120 125  
 Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly  
 130 135 140  
 His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro  
 145 150 155 160  
 Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val  
 165 170 175  
 Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly  
 180 185 190  
 Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro  
 195 200 205  
 Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile  
 210 215 220  
 Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe  
 245 250 255  
 Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu  
 260 265 270  
 Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr  
 275 280 285  
 Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His  
 290 295 300

# ES 2 789 073 T3

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser  
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr  
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr  
340 345 350

Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro  
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn  
370

<210> 4  
<211> 8337  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gtaaaactat tccccgtgaa ggcggcaggg cagaggtcca gggcgggctt tgctgggagc | 60   |
| ctcgggaccc cgggttgggg gccgtggggc ggcacctggc gagctggcgg gtgggcggcg | 120  |
| agccgaggct tcccggcctg gcggcaactc gccctctgc cctcagccct cccggctccg  | 180  |
| ctcccttccc ccacgccgcc ctgcccctcc cccacgcccc tttctctttc tttctttctt | 240  |
| tcccagttcg cttgccccca cccagcggc gcccgccggg ctctctgccc aatggccgcg  | 300  |
| gggcccggga ccgcatcagc tgatcgggcc gggctcctgg ccgctgggag ccaatcaggg | 360  |
| caccgggggc ggccccgggc cgcggataaa ggggtgcggg ctgctggcgg ctctgcagag | 420  |
| tcgagagtgg gagaagagcg gagcgtgtga gcagtactgc ggcctcctct cctctcctaa | 480  |
| cctcgctctc gcggcctagc tttaccgcc cgcctgctcg gcgaccagcg gggatcctcc  | 540  |
| cccagccgca agtccacgaa gaaagcaacg aatgaaaatt atgaagacaa cgagaagtca | 600  |
| gactcctccg ggtcgcgctc cagctgcttc ggcttcgtcg cctactctgt gaactccggg | 660  |
| gagagatctc gagtcaagat taagacctta acccaccaac ctgcctgttc ggacaccccc | 720  |
| cgggccgggc gctgtctgtc cccttctcca tcgccctctc ccagaaagct ccggtgcttg | 780  |
| gaccagctag agtctgagaa agaggagagg cgcgaacgcc actccaaaaa gagaagggtt | 840  |
| aaagagggca accctaacga tacgcttgac tttctgtggc tgggaacacc ttccaccatg | 900  |
| accacctcag caagttccca cttaaataaa ggcacaaagc aggtgtacat gtccctgcct | 960  |
| cagggtgaga aagtccaggc catgtatatc tggatcgatg gtactggaga aggactgcgc | 1020 |
| tgcaagaccc ggaccctgga cagtgcgccc aagtgtgtgg aagagttgcc tgagtggaat | 1080 |

# ES 2 789 073 T3

|             |            |             |             |             |            |      |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| ttcgatggct  | ctagtacttt | acagtctgag  | ggttccaaca  | gtgacatgta  | tctcgtgcct | 1140 |
| gctgccatgt  | ttcgggaccc | cttccgtaag  | gaccctaaca  | agctgggtgt  | atgtgaagtt | 1200 |
| ttcaagtaca  | atcgaaggcc | tgcagagacc  | aatttgaggc  | acacctgtaa  | acggataatg | 1260 |
| gacatgggtga | gcaaccagca | cccctggttt  | ggcatggagc  | aggagtatac  | cctcatgggg | 1320 |
| acagatgggc  | acccttttgg | ttggccttcc  | aacggcttcc  | cagggcccca  | gggtccatat | 1380 |
| tactgtgggtg | tgggagcaga | cagagcctat  | ggcagggaca  | tcgtggaggc  | ccattaccgg | 1440 |
| gcctgcttgt  | atgctggagt | caagattgcg  | gggactaatg  | ccgagggtcat | gcctgcccag | 1500 |
| tgggaatttc  | agattggacc | ttgtgaagga  | atcagcatgg  | gagatcatct  | ctgggtggcc | 1560 |
| cgtttcatct  | tgcatacgtg | gtgtgaagac  | tttggagtga  | tagcaacctt  | tgatcctaag | 1620 |
| cccattcctg  | ggaactggaa | tggtgcaggc  | tgccatacca  | acttcagcac  | caaggccatg | 1680 |
| cgggaggaga  | atggtctgaa | gtacatcgag  | gaggccattg  | agaaactaag  | caagcggcac | 1740 |
| cagtaccaca  | tccgtgccta | tgatcccaag  | ggaggcctgg  | acaatgcccg  | acgtctaact | 1800 |
| ggattccatg  | aaacctccaa | catcaacgac  | ttttctgctg  | gtgtagccaa  | tcgtagcgcc | 1860 |
| agcatacgca  | ttccccggac | tgttggccag  | gagaagaagg  | gttactttga  | agatcgtcgc | 1920 |
| ccctctgcc   | actgcgaccc | cttttcggtg  | acagaagccc  | tcataccgac  | gtgtcttctc | 1980 |
| aatgaaaccg  | gcgatgagcc | cttccagtac  | aaaaattaag  | tggactagac  | ctccagctgt | 2040 |
| tgagcccctc  | ctagtctctc | atcccactcc  | aactcttccc  | cctctcccag  | ttgtcccgat | 2100 |
| tgtaactcaa  | agggtggaat | atcaaggctg  | tttttttcat  | tccatgtgcc  | cagttaatct | 2160 |
| tgctttcttt  | gtttggctgg | gatagagggg  | tcaagttatt  | aatttcttca  | cacctaccct | 2220 |
| cctttttttc  | cctatcactg | aagcttttta  | gtgcattagt  | ggggaggagg  | gtggggagac | 2280 |
| ataaccactg  | cttccattta | atgggggtgca | cctgtccaat  | aggcgtagct  | atccggacag | 2340 |
| agcacgtttg  | cagaaggggg | tctcttcttc  | caggtagctg  | aaaggggaag  | acctgacgta | 2400 |
| ctctggttag  | gttaggactt | gccctcgtgg  | tggaaacttt  | tcttaaaaag  | ttataaccaa | 2460 |
| cttttctatt  | aaaagtggga | attaggagag  | aaggtagggg  | ttgggaatca  | gagagaatgg | 2520 |
| ctttgggtctc | ttgcttgtgg | gactagcctg  | gcttgggact  | aaatgccctg  | ctctgaacac | 2580 |
| gaagcttagt  | ataaactgat | ggatatccct  | accttgaaaag | aagaaaaggt  | tcttactgct | 2640 |
| tggtccttga  | tttatcacac | aaagcagaat  | agtattttta  | tattttaaag  | taaagacaaa | 2700 |
| aaactatatg  | tatggttttg | tggattatgt  | gtgttttctc  | aaaggaaaaa  | accatccagg | 2760 |
| tcacggggca  | ccaaatttga | gacaaatagt  | cggattagaa  | ataaagcatc  | tcattttgag | 2820 |
| tagagagcaa  | gggaagtggg | tcttagatgg  | tgatctggga  | ttaggccctc  | aagacccttt | 2880 |
| tgggtttctg  | ccctgcccac | cctctggaga  | aggtgggcac  | tggattagtt  | aacagacaac | 2940 |

# ES 2 789 073 T3

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| acgttactag cagtcacttg atctccgtgg ctttggttta aaagacacac ttgtccacat   | 3000 |
| aggtttagag ataagagttg gctggtcaac ttgagcatgt tactgacaga gggggtattg   | 3060 |
| gggttatttt ctggtaggaa tagcatgtca ctaaagcagg ccttttgata ttaaattttt   | 3120 |
| taaaaagcaa aattatagaa gtttagattt taatcaaatt tgtagggttt ctaggtaatt   | 3180 |
| tttacagaat tgcttgtttg cttcaactgt ctccctacctc tgctcttgga ggagatgggg  | 3240 |
| acagggctgg agtcaaaaaca cttgtaattt tgtatcttga tgtctttgtt aagactgctg  | 3300 |
| aagaattatt ttttttcttt tataataagg aataaaccct acctttattc cttcatttca   | 3360 |
| tctaccattt tctggttctt gtgttggttg tggcaggcca gctgtggttt tcttttgcca   | 3420 |
| tgacaacttc taattgccat gtacagtatg ttcaaagtca aataactcct cattgtaaac   | 3480 |
| aaactgtgta actgccccaa gcagcactta taaatcagcc taacataaga tctctctgat   | 3540 |
| gtgtttgtga ttctttcaaa tccctatgtg ccattatatt tctttatttc ctaaaacagg   | 3600 |
| caaaataagc tcaagtttat gtactctgag tttttaaaac actggagtga tgttgctgac   | 3660 |
| cagccgtttc ctgtacctct ctaagttggg tatttgggac ttaagggatt aagtttttca   | 3720 |
| cctagactta gttacacaca atcttggtcat ttccctagcct agaggtttgt agcagggtac | 3780 |
| aagccccact cctccccctt cctttgctcc cctgagtttg gttttggctt accataacat   | 3840 |
| tgttttgacc attcctagcc taatacaata gcctaacata atgtaagatt aactggcttt   | 3900 |
| acgattttcta ttctctgctc tcagtgataa gaaacaaata ttagctacct tgctacctg   | 3960 |
| gttgaagcct tccaaggctg gctatgccct aggcattggg tcatccttg gtgtatcttg    | 4020 |
| ccttgagga agaccagtgg accgattgtg attctcaaaa gctctgtgtt gtcacctgtg    | 4080 |
| cccttgcccc ttgctcttat cttggtccgt gtatctggga gttcttccac cttatcttg    | 4140 |
| ccaattccta ccttcgttca ttccctcatga ggttggttaa aagctccctc cggctcccat  | 4200 |
| gatgctgtgc atatacctag caaaaagcaa ttattggaca cattggagtg caatattatt   | 4260 |
| aatagcatta atactactaa taatgtgggc aatagtgatt gtttttaaaa ggcagtatac   | 4320 |
| tcttaccagt gcgaggtagc tggggcctgt gatagttttt agagataagt tcttcaggca   | 4380 |
| actgtgtatt ttacactagt caagtaatcc tagatatccg tggtttttct taagaaagt    | 4440 |
| ggctcgtaat atgatttaaat attcaaagta gagtcatcta cctattagct tgctggcgtg  | 4500 |
| gtcctagttt atgcctgttt cagcatgatt gttgagtacc ctgtttcatc ctagcat      | 4560 |
| tcttgatttt gttgttaaat gatgtatacc cttatttcca ttgaatctgt gcttccaccc   | 4620 |
| ccccaaactga agttgtcttc cctttgcttg gccaccctta cagcctcttg gatggtgtat  | 4680 |
| cctacagtgt aagcactaaa ctgaagaggc agtgacctga gcactttgga ttttgttcat   | 4740 |
| tgtaatcaat tccatgacaa aatgattgca tgagaaggaa ttttaaatc ataggatcag    | 4800 |
| aatttaggtg aaaacaacca gcataattgt ttcttcaccc tctcacctag aattagcttt   | 4860 |

# ES 2 789 073 T3

|             |             |             |            |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| gacctacagg  | tcacagtgca  | atcccccttgt | atttctaagg | tgttttttat  | agttcatttg  | 4920 |
| cagacaatgg  | gttatgtgat  | aactttttatc | agtgatagat | taaacagaat  | aatgaccaag  | 4980 |
| ctttcaacct  | taaggagtca  | ggccagtatt  | tacaaaagga | ggtctccatg  | aactccttaa  | 5040 |
| atatgagttc  | ccctaatatc  | atcttgccag  | gtactaaata | acaactgata  | gcacaagcta  | 5100 |
| tagggaattt  | gaaagaattc  | catggatggg  | tgttgtctag | ggccttttgt  | tgtttttgag  | 5160 |
| acggggctctg | actctcacc   | aggctggagt  | atagtgtggc | gcaatcttgg  | ctcactgcaa  | 5220 |
| cttctgcctc  | ccagattcaa  | gcgattctcc  | tgctcagcc  | tcccaagtag  | ctgagactac  | 5280 |
| aggtgtgcac  | caccatgctc  | agctaatttt  | tgtattttta | gtacagatgg  | ggtttcacca  | 5340 |
| tgttggccag  | gctggctctg  | aactcctgat  | ctcccaaagt | gaggtcttga  | actggctctg  | 5400 |
| aactcctcca  | cctcccaaag  | tgctgggatt  | acaggcgtga | gccactgcac  | ccggcctagg  | 5460 |
| gccatgtaaa  | aagccagatc  | tgtgctgctg  | tctgtgtaga | agggtagaca  | agtggatgag  | 5520 |
| aagttcctga  | actattcctg  | gcccttttac  | cactaagtga | aagtaacttg  | ctgccccaaa  | 5580 |
| gaaagatgtc  | tcatcattcg  | acaggacttt  | ctagttgaac | ttcatgaaag  | caagagatcc  | 5640 |
| tgtttttctt  | gctcaccact  | gtatcttgag  | acctgttgta | gtgcctgcaa  | tacttattta  | 5700 |
| ataagttatt  | tttaagtatc  | agttttgtga  | gctttaactc | tatgaggtct  | ttgttgtttg  | 5760 |
| actgtatttt  | aactctggcc  | atgacagcaa  | gacaaagttc | cattttttatt | gagcttaaaa  | 5820 |
| agaatcaagg  | ccagggtgaag | tggtcttacgc | ctgtgatccc | aacactttgt  | gaggctgcag  | 5880 |
| caggaggatc  | tcttgagccc  | aggagtttga  | gaccgttcta | ggcaatgtag  | tgagggtccag | 5940 |
| actccacaaa  | ataatttttt  | tttaaattgc  | acgcctgtag | tctcagctat  | caggaggctg  | 6000 |
| agatgggagg  | atgacttgag  | cccaggaaat  | tgaagctgca | gtgaattgtg  | attgcaccac  | 6060 |
| tgcactccag  | cctgggtgac  | agatcaagac  | cttgccataa | caaaacaaaa  | caaacaaaac  | 6120 |
| ccccaaaaac  | aaattgaaaa  | tgttgattct  | ttttactaca | aacattatgg  | cagcactaaa  | 6180 |
| aacttcgtgg  | gagtgtactg  | tggaaaatag  | tgtacttaat | taattctcat  | tgtaatcagg  | 6240 |
| ctaccaagag  | ccttggtgtg  | ctttaagagt  | tataactgcc | aggcacagtg  | gctcatgcct  | 6300 |
| ataatcccag  | caccttgaga  | ggccgaggca  | ggtggatcac | ctgagatcgg  | gagtttgaga  | 6360 |
| ccagccgggc  | caatatggtg  | aaacaagctg  | tgtctctact | aaatacaaaa  | aattagccgg  | 6420 |
| gcgtgggtggc | acatgcctgt  | aatcccagct  | gcttgggaga | ctgagacagg  | agaattgctt  | 6480 |
| gaacctggaa  | ggcggagggt  | gcagtgagct  | gagattgcaa | cattgtactc  | cagcctgggc  | 6540 |
| aacaagaggg  | aaactccatc  | tcaaaaaaaaa | aaaaaaagtt | gtaactgagg  | ctgggcatgg  | 6600 |
| tggctcatac  | ctgtaatccc  | agcactttga  | aaagccgagg | caggtagatc  | acttgagctc  | 6660 |
| agaagttcga  | gactagcctg  | ggcaacatga  | caaaacccca | tctctacaaa  | aaatacgaaa  | 6720 |

# ES 2 789 073 T3

|            |             |             |            |             |            |      |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| aattagctgg | gcgtggtggc  | atgcacctgt  | agtcctagct | acctgggagg  | ctgaggtggg | 6780 |
| aagattactt | gaagctgcag  | tgagccatgg  | ttgtgccact | gccctccagt  | ctgggcaaca | 6840 |
| aagtgcagcc | ctgtctcaaa  | aaaacaaaaa  | aaaattataa | ctgatgtaaa  | ctggcagttt | 6900 |
| aggctgggtg | tgggtggctca | agcctgtaat  | cctagcactt | tgggaggcca  | aggcaggtgg | 6960 |
| atcacctgag | ttcaggagtt  | cgagaccagc  | gtggccaaca | tggtgaaacc  | ttgtctctat | 7020 |
| taaaaatacc | aaaattagca  | agatgtggtg  | gtgggtgcct | ataattccag  | ctactcagga | 7080 |
| ggctgaggca | ggaggatcgc  | tggagccagg  | gaggcagagg | ttacagtaag  | caaagatcac | 7140 |
| tccacttcac | tccagcctgg  | gcaaaagagt  | gagacatata | aaaaaataaa  | caaataaata | 7200 |
| aataaataag | tggcagttca  | tcattttaact | ccaaagactt | tgcgtacatt  | tctactgaaa | 7260 |
| acaatctgag | ctgattagaa  | ccctgccatt  | ttatagcctt | tagctcgatc  | tccgaccgtt | 7320 |
| catttaaaaa | aattctactt  | caggccgggc  | atggtggctc | aagcctgtaa  | tcccatcact | 7380 |
| gtaggaggcc | aaagtgggca  | gatcacttaa  | ggtcaggagt | ttgagaccag  | cctggccacc | 7440 |
| atggtgaaac | cccatctcta  | ctaaaaatac  | aaaaattagc | cgggcttggg  | ggtgagcacc | 7500 |
| tgtaatccca | ccctgccgag  | tggcaggctg  | aggcaggaga | atcgcttgag  | cccaagagcc | 7560 |
| ggagggttga | gtgagccaag  | cttgccacct  | tgcactccag | cctaggcaac  | agagtgtgac | 7620 |
| tccatctcaa | gaaaaaaaaa  | attctatttc  | attttacaat | atgcagatat  | atgtccatac | 7680 |
| acatgcataa | tataaatgta  | taccatattt  | gtgagaatat | gcataatatgt | acacattaga | 7740 |
| tacacaatac | aagcacaata  | catatgtctt  | ttgcccaga  | tacagcattt  | tgtaaaggag | 7800 |
| acaggaattt | agtaatatat  | gtccagaaa   | cagtacacaa | gagaattcgc  | cgagatgaga | 7860 |
| aagttgtcac | taggaatggg  | gagtggtaag  | atgtagaagg | tataattgtt  | cttaaagttc | 7920 |
| tactgccaac | tctttccaat  | taattacca   | ctctgccatg | ctttatggac  | aggaggttgt | 7980 |
| cggacactgt | caattaataa  | atatttgagc  | atgatacact | gcttgagact  | cctctaatat | 8040 |
| aggagagtga | tatcctagtg  | catgttacag  | agggagtgtc | cacacagttc  | ctattgtcat | 8100 |
| ttgatgagtt | acttttcagg  | ggccttgtag  | ctgagcaagt | tgtcctcttt  | ttgatggatt | 8160 |
| tcagattgag | ttacctgcat  | tgtcttgaga  | ttgcagcgtg | tttcctccac  | tgtacggcgt | 8220 |
| agtcagcaga | tctattagtt  | aaactccagt  | gggccctcag | tcactaaatc  | tatcctctgt | 8280 |
| gttgaaggct | ttctgcattt  | gcctttcaat  | aaaggtttag | aataactcct  | taaaaaa    | 8337 |

<210> 5  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 5

# ES 2 789 073 T3

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

<210> 6  
 <211> 3932  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

# ES 2 789 073 T3

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| tcccagacag aacctactat gtgcggcggc agctggggcg ggaaggcggg agctgggggc  | 60  |
| gctggggggcg ctgcggccgc tgcggccgct gcagccgctg cagcgccagg gtccacctgg | 120 |
| tcggctgcac ctgtggagga ggaggtggat ttcaggcttc ccgtagactg gaagaatcgg  | 180 |
| ctcaaaaccg cttgcctcgc aggggctgag ctggaggcag cgaggccgcc cgacgcaggc  | 240 |
| ttccggcgag acatggcagg gcaaggatgg cagcccggcg gcagggcctg gcgaggagcg  | 300 |
| cgagcccgcg gccgcagttc ccaggcgtct gcgggcgcga gcacgccgcg accctgcgtg  | 360 |

# ES 2 789 073 T3

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| cgccggggcg gggggggcggg gcctcgccctg cacaaatggg gacgaggggg gcggggcggc | 420  |
| cacaatttcg cgccaaactt gaccgcgcgt tctgctgtaa cgagcgggct cggaggtcct   | 480  |
| cccgtgctg tcatggttg ttcgctaaac tgcacgtcg ctgtgtccca gaacatgggc      | 540  |
| atcggcaaga acggggacct gccctggcca ccgctcagga atgaattcag atatttccag   | 600  |
| agaatgacca caacctcttc agtagaaggt aaacagaatc tggtgattat gggtaagaag   | 660  |
| acctggttct ccattcctga gaagaatcga cctttaaagg gtagaattaa tttagttctc   | 720  |
| agcagagaac tcaaggaacc tccacaagga gctcattttc tttccagaag tctagatgat   | 780  |
| gccttaaaac ttactgaaca accagaatta gcaataaag tagacatggt ctggatagtt    | 840  |
| ggtggcagtt ctgtttataa ggaagccatg aatcaccocag gccatcttaa actatttgtg  | 900  |
| acaaggatca tgcaagactt tgaaagtgc acgttttttc cagaaattga tttggagaaa    | 960  |
| tataaacttc tgccagaata cccagggtgt ctctctgatg tccaggagga gaaaggcatt   | 1020 |
| aagtacaaat ttgaagtata tgagaagaat gattaatatg aagggtgttt ctagtttaag   | 1080 |
| ttgttcccc tccctctgaa aaaagtatgt atttttacat tagaaaagg tttttgtga      | 1140 |
| ctttagatct ataattatct ctaagcaact agtttttatt cccactact cttgtctcta    | 1200 |
| tcagatacca tttatgagac attcttgcta taactaagtg cttctccaag accccaactg   | 1260 |
| agtccccagc acctgctaca gtgagctgcc attccacacc catcacatgt ggcactcttg   | 1320 |
| ccagtccttg acattgtcgg gcttttcaca tgttggtaat atttattaaa gatgaagatc   | 1380 |
| cacataccct tcaactgagc agtttcacta gtggaaatac caaaagcttc ctacgtgtat   | 1440 |
| atccagaggt ttgtagataa atgttgccac cttgtttgta acagtgaaaa attgaaaaca   | 1500 |
| acctggaagt ccagtgatgg gaaaatgagt atgtttctgt cttagattgg ggaacccaaa   | 1560 |
| gcagattgca agactgaaat ttcagtgaat gcagtgtatt tgctaggtca taccagaaat   | 1620 |
| catcaattga ggtacggaga aactgaactg agaaggtaag aaaagcaatt taaagtcagc   | 1680 |
| gagcaggttc tcattgataa caagctccat actgctgaga tacagggaaa tggagggggg   | 1740 |
| aaagctggag tattgatccc gccccctcc ttggttgta gctccctgtc ctgtgtgtgg     | 1800 |
| gcggaacata gtccagctgc tctatagcaa gtctcaggtg tttgcagtaa gaagctgctg   | 1860 |
| gcatgcacgg gaacagtga tgccaaacac ttaaagcaat tcgatgttta agtatgtaag    | 1920 |
| ttcttttttt tttagacagc gtttcgctct tgttgcccag gctagcatgc aatggtgtga   | 1980 |
| cctcggctta ctgcaacctc cgccttccca gattcaagcg attctcctgc ctcaggctcc   | 2040 |
| caagtagcta ggaccaggtg cgcgccacca cgcccgcta atttttgtat tttgtatttt    | 2100 |
| tagtagagat ggggtttcac catgttggtc aggctagtct cgaactcgtg accgcaagcg   | 2160 |
| attcaccac ctcagcctcc caaagtgtg ggattaccgg cttgagccac cacaccggc      | 2220 |

# ES 2 789 073 T3

```

acatcttcat tctttttatg tagtaaaaag tataaggcca cacatggttt atttgaagta 2280
ttttataatt taaaaaaata cagaagcagg aaaaccaatt ataagttcaa gtgagggatg 2340
atggttgctt gaaccaaagg gttgcatgta gtaagaaatt gtgatttaag atatatttta 2400
aagttataag tagcaggata ttctgatgga gtttgacttt ggttttgggc ccagggagtt 2460
tcagatgcct ttgagaaatg aatgaagtag agagaaaata aaagaaaaac cagccaggca 2520
cagtggctca cacctgtaat cccagcgctt tgggaggcta aggcaggcag atcacttgag 2580
accagcttgg gcaacatggc aaagcccat ctctacaaaa aacacaaaaa ttagctgggc 2640
attgtggcgc acacctgtat tcccacttag tcaggaagct gagatggaag aattaattga 2700
gccacagagt tcaaggctgc agtgagtcgt gattgtgcca ctgcactcca gccggggtga 2760
cagaagagac cttgtctcga aaaggaatct gaaaacaatg gaaccatgcc ttcataattc 2820
tagaaagtta ttttcaactg ataaatctat attcacccaa ataatcaagg gtgaaggtaa 2880
aataatacat ttttagacaa gcaaagactc aggggttacc tccatgtgcc ctttttaggg 2940
aagctgttgg agaaaatact ccagcaaat gaaggagtac acaaaccaga gaatgacatg 3000
aatccagcaa ataggatcca acacaggcaa tattccagct atggagctag ctttaaaaag 3060
gaacagtaaa aatattaatc ggttagctgg gtggaatggc ccatgcctgt agtcccagct 3120
actcaggagg ctgagcagca ggacgacttg agcccaagag ttccagacca gcctggccac 3180
cttagtgaga tcccttctct taaaaataat aacttattgc cagatttggg gcatttggaa 3240
agaagttcat tgaagataaa gcaaaagtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaca aggggaaagg 3300
gttggttagg caatcattct agggcagaaa gaagtacagg ataggaagag cataatacac 3360
tgtttttctc aacaaggagc agtatgtaca cagtcataat gatgtgactg cttagcccct 3420
aaatatggta actactctgg gacaatatgg gaggaaggt gaagattgtg atggtgtaag 3480
agctaaatcc tcatctgtca tatccagaaa tcaatatata atatataata atgaaatgac 3540
taagttatgt gaggaaaaaa acagaagaca ttgctaaaag agttaaaggt cattgctctg 3600
gagaattagg agggatggg caggggactg ttaggatgca ttataaactg aaaagccttt 3660
ttaaattttt atgtattaat atatgcattc acttgaaaaa ctaaaaaaa acaataattt 3720
ggaaaaaccc atgaaggtaa ctaacggaag gaaaaactaa gagaatgaaa agtatttgcc 3780
tctgaaaaga acaactggca ggactgttgt ttctattgta agacttttgg agccatttaa 3840
ttgtacttaa ccattttcat ctatttcttt aataagaaca attccatctt aataaagagt 3900
tacacttggt aataagtaaa aaaaaaaaaa aa 3932

```

<210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Marcador 6xHis sintético  
 <400> 7

His His His His His His  
 1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de una proteína terapéutica, que comprende: transfectar una célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina con (i) un ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de colesterol en la célula; (ii) un ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de glutamina en la célula; (iii) un ácido nucleico que comprende un gen de resistencia a antibióticos aminoglucosídicos; y (iv) un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende transfectar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina con al menos uno de un primer, segundo y tercer vector, en donde el primer vector comprende el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de colesterol; el segundo vector comprende el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de glutamina y el ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica; y el tercer vector comprende el ácido nucleico que comprende el gen de resistencia a antibióticos aminoglucosídicos.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en ausencia de colesterol añadido de manera exógena durante o después de la transfección con el ácido nucleico que codifica la proteína que restaura la biosíntesis de colesterol.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en ausencia de glutamina añadida de manera exógena durante o después de la transfección con el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de glutamina.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina reduciendo la concentración de glutamina de 2 mM a 0 mM o de 0,5 mM a 0 mM después de la transfección con el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de glutamina.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en presencia de un inhibidor de la 3-cetoesteroide reductasa durante o después de la transfección con el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de colesterol.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en presencia de un inhibidor de la glutamina sintetasa durante o después de la transfección con el ácido nucleico que codifica una proteína que restaura la biosíntesis de colesterol.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en presencia de un antibiótico aminoglucosídico durante o después de la transfección con el ácido nucleico que comprende el gen de resistencia a antibiótico aminoglucosídico.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende cultivar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina en presencia de G418 a una concentración de 100 µg/ml o 200 µg/ml.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el gen de resistencia a aminoglucósidos comprende un gen de resistencia a la neomicina y el método comprende transfectar la célula con un ácido nucleico que codifica el gen de resistencia a la neomicina.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende además recuperar la proteína terapéutica de la célula y medir la viabilidad de la célula después de dicha recuperación.
12. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína que restaura la biosíntesis de colesterol comprende 3-cetoesteroide reductasa y el método comprende transfectar la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina con un ácido nucleico que codifica 3-cetoesteroide reductasa.
13. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína capaz de restaurar la biosíntesis de glutamina comprende glutamina sintetasa y el método comprende transfectar la célula con un ácido nucleico que codifica glutamina sintetasa.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la proteína terapéutica comprende un anticuerpo, una proteína de fusión, un anticoagulante, un factor sanguíneo, una proteína morfogenética ósea, un armazón proteico modificado por ingeniería genética, una enzima, un factor de crecimiento, una hormona, un factor liberador de hormonas, una interleucina o una proteína trombolítica, y el método comprende transfectar la célula con un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, una proteína de fusión, un anticoagulante, un factor sanguíneo, una proteína morfogenética ósea, un armazón proteico modificado por ingeniería genética, una enzima, un factor de crecimiento, una hormona, un factor liberador de hormonas, una interleucina o una proteína trombolítica.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la célula auxótrofa para colesterol y auxótrofa para glutamina es una célula NSO.

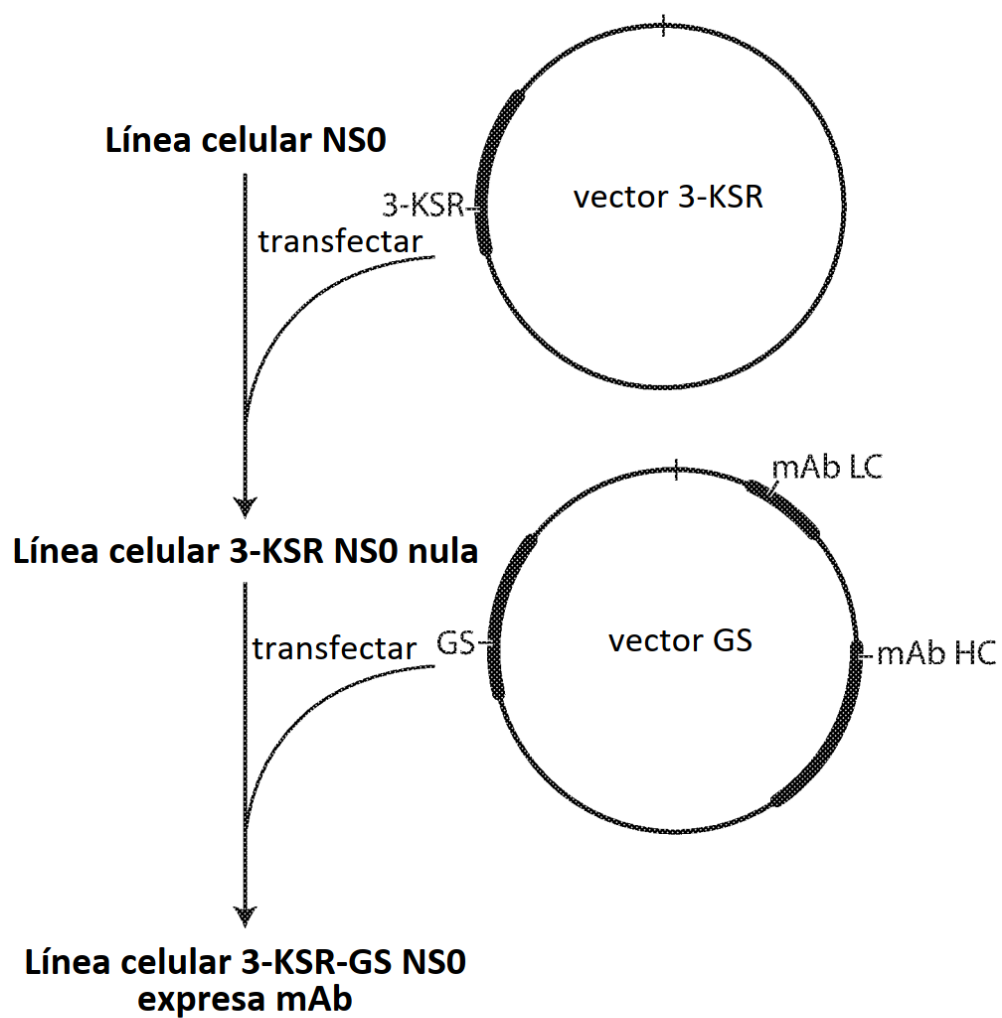


FIG. 1

Secuencia de referencia NCBI: NP\_057455

```
1 mrkvvltga ssgiglalck rllaeddelh lclacrnmsk aeavcaalla shptaectiv
61 qvdvsnlqsv fraskelkqr fqrldciyln agimpnpqln ikalffglfs rkvihamfsta
121 eglltqgdki tadglqevfe tnvfghfili relepllchs dnpsqliwts srsarksnfs
181 ledfqhskgk epyssskyat dllsvalnrn fnqgglysnv acpgtaltnl tygilppfiw
241 tllmpailll rffanaftlt pyngtealvw lfhqkpesln plikylsatt gfgornyimtq
301 kmldldetae kfyqkllele khirvtiqkt dnqarlsgsc 1
```

SEQ ID NO. 1

FIG. 2

## Secuencia de referencia NCBI: NM\_016371.3

```

1  gtactctgat  tgggtgacggg  tgaggcggcc  cgaaatcgta  ggacttccga  aagcagcggc
61  ggcggttgct  tcactgcttg  gaagtgtgag  tgcgcgaaga  tgcgaaaggt  ggttttgatc
121  accggggcta  gcagtggcat  tggcctggcc  ctctgcaagc  ggctgctggc  ggaagatgat
181  gagcttcata  tgtgtttggc  gtgcaggaac  atgagcaagg  cagaagctgt  ctgtgctgct
241  ctgctggcct  ctcacccac  tgctgaggtc  accattgtcc  aggtggatgt  cagcaacctg
301  cagtccgtct  tccgggcctc  caaggaactt  aagcaaaggt  ttcagagatt  agactgtata
361  tatctaaatg  ctgggatcat  gcctaataca  caactaaata  tcaaagcact  tttctttggc
421  ctcttttcaa  gaaaagtgat  tcatatgttc  tccacagctg  aaggcctgct  gaccaggggt
481  gataagatca  ctgctgatgg  acttcaggag  gtgtttgaga  ccaatgtctt  tggccatttt
541  atcctgattc  ggggaactgga  gcctctcctc  tgtcacagtg  acaatccatc  tcagctcatc
601  tggacatcat  ctgcagtgcc  aaggaaatct  aatttcagcc  tcgaggactt  ccagcacagc
661  aaaggcaagg  aaccctacag  ctcttccaaa  tatgccactg  accttttgag  tgtggctttg
721  aacagggaact  tcaaccagca  gggctctctat  tccaatgtgg  cctgtccagg  tacagcattg
781  accaatttga  catatggaat  tctgcctcgc  tttatatgga  cgctgttgat  gccggcaata
841  ttgctacttc  gcttttttgc  aaatgcattc  actttgacac  catataatgg  aacagaagct
901  ctgggtatggc  ttttccacca  aaagcctgaa  tctctcaatc  ctctgatcaa  atatctgagt
961  gccaccactg  gctttggaag  aaattacatt  atgaccaga  agatggacct  agatgaagac
1021  actgctgaaa  aattttatca  aaagttactg  gaactggaaa  agcacattag  ggctactatt
1081  caaaaaacag  ataatcaggc  caggctcagt  ggctcatgcc  tataattcca  gcactttggg
1141  aggccaaaggc  agaaggatca  cttgagacca  ggagttcaag  accagcctga  gaaacatagt
1201  gagcccttgt  ctctacaaaa  agaaataaaa  ataatagctg  ggtgtggtgg  catgcgcatg
1261  tagtcccagc  tactcagaag  gatgaggtgg  gaggatctct  tgaggctggg  aggcagaggt
1321  tgcagtgagc  tgagattgtg  ccaactgcact  ccagcctggg  tgacagcgag  accctgtctc
1381  aaaatatgta  tatatttaat  atatatataa  aaccagagct  gacaatgaca  ctctggaaca
1441  ttgcatacct  tctgtacatt  ctgggggtaca  tggatttcta  ctgagttgga  taatatgcat
1501  ttgtaataaaa  ctatgaacta  tgaaaaaaaa  aaaaaaa

```

SEQ ID NO. 2

FIG. 3

Secuencia de referencia NCBI: NP\_002056.2

```
1  mttsasshln kgikqvymsl pqgekvqamy iwidgtgegl rcktrtldse pkcveelpew
61 nfdgsstlqs egsnsdmylv paamfrdpfr kdpnklvlce vfkyrrpae tnlrhtckri
121 mdmvsngqhpw fgmegeytlm gtdghpfgwp sngfpgpggp yycgvgadra ygrdiveahy
181 raclyagvki agtnaevmpa qwefqigpce gismgdhlwv arfilhrvce dfgviatfdp
241 kpipgnwnqa gchtnfstka mreenglkyi eeaieklskr hqyhiraydp kggldnarrl
301 tgfhetsnin dfsagvanrs asiriprtvg gekkgyfedr rpsancdpfs vtealirtcl
361 lnetgdepfq ykn
```

SEQ ID NO. 3

FIG. 4

## Secuencia de referencia NCBI: NM\_002065.6

```

1  gtaaaactat tccccgtgaa ggcggcaggg cagaggtcca gggcgggctt tgctgggagc
61  ctccgggaccc cgggttgggg gccgtggggc ggcacctggc gagctggcgg gtgggcggcg
121 agccgagggct tcccgccctg gcggcaactc gcccctctgc cctcagccct cccggctccg
181 ctcccttccc ccacgccgcc ctgcccctcc cccacgcccc tttctctttc tttctttctt
241 tcccagttcg cttgccccca cccagcggc gcccgccggg ctccctcgccc aatggccggc
301 gggcccggga ccgcctcagc tgatcgggcc gggctcctgg ccgctgggag ccaatcaggg
361 caccgggggc ggccccgggc cgcggataaa ggggtcgggg ctgctggcgg ctctgcagag
421 tcgagagtgg gagaagagcg gagcgtgtga gcagtactgc ggctcctct cctctcctaa
481 cctcgctctc gcggcctagc tttaccgcgc cgctgctcg gcgaccagcg gggatcctcc
541 cccagccgca agtccacgaa gaaagcaacg aatgaaaatt atgaagacaa cgagaagtca
601 gactcctccg ggtcgcgctc cagctgcttc ggcttcgctg cctactctgt gaactccggg
661 gagagatctc gagtcaagat taagacctta acccaccacac ctgcctgttc ggacaccccc
721 cgggcccggc gctgtctgtc cctttctcca tcgcccctct ccagaaagct cgggtgcttg
781 gaccagctag agtctgagaa agaggagagg cgcgaacgcc actccaaaaa gagaagggtt
841 aaagagggca accctaacga tacgcttgac tttctgtggc tgggaacacc ttccaccatg
901 accacctcag caagttccca cttaaataaa ggcatacagc aggtgtacat gtccctgcct
961 cagggtgaga aagtccaggc catgtatatc tggatcgatg gtactggaga aggactgcgc
1021 tgcaagaccc ggacctgga cagtgcgccc aagtgtgtgg aagagttgcc tgagtggaat
1081 ttcgatggct ctagtacttt acagtctgag ggttccaaca gtgacatgta tctcgtgcct
1141 gctgccatgt ttcgggaccc cttccgtaag gaccctaaca agctgggtgt atgtgaagtt
1201 ttcaagtaca atcgaaggcc tgcagagacc aatttgaggc acacctgtaa acggataatg
1261 gacatggtga gcaaccagca cccctggttt ggcataggagc aggagtatac cctcatgggg
1321 acagatgggc acccctttgg ttggccttcc aacggcttcc cagggccccca ggggtccatat
1381 tactgtgggtg tgggagcaga cagagcctat ggcagggaca tcgtggaggc ccattaccgg
1441 gcctgcttgt atgctggagt caagattgcg gggactaatg ccgaggtcat gcctgccagc
1501 tgggaatttc agattggacc ttgtgaagga atcagcatgg gagatcatct ctgggtggcc
1561 cgtttcatct tgcacgtgt gtgtgaagac tttggagtga tagcaacctt tgatcctaag
1621 ccattcctg ggaactggaa tgggtcaggc tgccatacca acttcagcac caaggccatg

```

FIG. 5A

```

1681 cgggaggaga atggtctgaa gtacatcgag gagggcattg agaaactaag caagcggcac
1741 cagtaccaca tccgtgccta tgatcccaag ggaggcctgg acaatgcccg acgtctaact
1801 ggattccatg aaacctccaa catcaacgac ttttctgctg gtgtagccaa tcgtagcgcc
1861 agcatacgca ttccccggac tgttggccag gagaagaagg gttactttga agatcgctgc
1921 ccctctgcca actgcgaccc cttttcggtg acagaagccc tcatccgcac gtgtcttctc
1981 aatgaaaccg gcgatgagcc cttccagtag aaaaattaag tggactagac ctccagctgt
2041 tgagcccctc ctagttcttc atcccactcc aactcttccc cctctcccag ttgtcccgat
2101 tgtaactcaa aggttggaat atcaaggtag ttttttcat tccatgtgcc cagttaatct
2161 tgctttcttt gtttggctgg gatagagggg tcaagttatt aatttcttca cacctaccct
2221 cttttttttc cctatcactg aagcttttta gtgcattagt ggggaggagg gtggggagac
2281 ataaccactg cttccattta atgggggtgca cctgtccaat aggcgtagct atccggacag
2341 agcacgtttg cagaaggggg tctcttcttc caggtagctg aaaggggaag acctgacgta
2401 ctctggttag gttaggactt gccctcgtgg tggaaacttt tcttaaaaag ttataaccaa
2461 cttttctatt aaaagtggga attaggagag aaggtagggg ttgggaatca gagagaatgg
2521 ctttggcttc ttgcttgtgg gactagcctg gcttgggact aaatgccctg ctctgaacac
2581 gaagcttagt ataaactgat ggatatccct accttgaaag aagaaaaggt tcttactgct
2641 tggtccttga tttatcacac aaagcagaat agtattttta tatttaaatg taaagacaaa
2701 aaactatatg tatggttttg tggattatgt gtgttttgct aaaggaaaaa accatccagg
2761 tcacggggca ccaaatttga gacaaatagt cggattagaa ataaagcatc tcatttttag
2821 tagagagcaa gggaagtggg tcttagatgg tgatctggga ttagggcctc aagacccttt
2881 tgggtttctg ccctgccac cctctggaga aggtgggcac tggattagt aacagacaac
2941 acgttactag cagtcacttg atctccgtgg ctttggttta aaagacacac ttgtccacat
3001 aggttttagag ataagagttg gctgggtcaac ttgagcatgt tactgacaga gggggtattg
3061 gggttatttt ctggtaggaa tagcatgtca ctaaagcagg ctttttgata ttaaattttt
3121 taaaaagcaa aattatagaa gtttagattt taatcaaatt tgtagggttt ctaggtaatt
3181 tttacagaat tgcttgtttg cttcaactgt ctcctacctc tgctcttggg ggagatgggg
3241 acagggctgg agtcaaaaaca cttgtaattt tgtatcttga tgtctttgtt aagactgctg
3301 aagaattatt ttttttcttt tataataagg aataaacccc acctttattc cttcatttca
3361 tctaccattt tctggttctt gtgttggctg tggcaggcca gctgtggttt tcttttgcca
3421 tgacaacttc taattgcoat gtacagtatg ttcaaagtca aataactcct cattgtaaac
3481 aaactgtgta actgcccaca gcagcactta taaatcagcc taacataaga tctctctgat
3541 gtgtttgtga ttctttcaaa tccctatgtg ccattatatt tctttatttc ctaaaacagg
3601 caaaataagc tcaagtttat gtactctgag tttttaaaac actggagtga tgttgctgac

```

FIG. 5B

```

3661 cagccgtttc ctgtacctct ctaagttggg tatttgggac ttaagggatt aagtttttca
3721 cctagactta gttacacaca atcttgccat ttcttagcct agaggtttgt agcagggtag
3781 aagccccact cctccccctt cctttgctcc cctgagtttg gttttggctt accataacat
3841 tgttttgacc attcctagcc taatacaata gcctaacata atgtaagatt aactggcttt
3901 acgattttcta ttctctgctc tcagtataaa gaaacaaata ttagctaccc tgctaccctg
3961 gttgaagcct tccaaggctg gctatgccct aggcattggg tcctccttgg gtgtatcttg
4021 ccttgacagga agaccagtgg accgattgtg attctcaaaa gctctgtgtt gtcacctgtg
4081 cccttgcccc ttgctcttat cttgggtccg gtatctggga gttcttccac cttatcttgg
4141 ccaattccta ccttcgttca ttctcatga gggtgggtaa aagctccctc cggctcccat
4201 gatgctgtgc atatacctag caaaaagcaa ttattggaca cattggagtg caatattatt
4261 aatagcatta atactactaa taatgtgggc aatagtattt gtttttaaaa ggcagtatac
4321 tcttaccagt gcgaggtagc tggggcctgt gatagttttt agagataagt tcttcaggca
4381 actgtgtatt ttacactagt caagtaatcc tagatatccg tggtttttct taagaaagt
4441 ggctcgtaat atgatttaat attcaaagta gagtcattct cctattagct tgctggcgtg
4501 gtcctagttt atgcctgttt cagcatgatt gttgagtacc ctgtttcatc cttagcattt
4561 tcttgatttt gttgttaaat gatgtatacc cttatttcca ttgaatctgt gcttccacct
4621 ccccaactga agttgtcttc cctttgcttg gccaccctta cagcctcttg gatgggtgat
4681 cctacagtgt aagcactaaa ctgaagaggc agtgacctga gcactttgga tttgttcat
4741 tgtaatcaat tccatgacaa aatgattgca tgagaaggaa ttttaaattc ataggatcag
4801 aatttaggtg aaaacaacca gcatatttgt ttcttcacct tctcacctag aattagcttt
4861 gacctacagg tcacagtgca atccccctgt atttctaagg tgttttttat agttcatttg
4921 cagacaatgg gttatgtgat aactttttat agtgatagat taaacagaat aatgaccaag
4981 ctttcaacct taaggagtca ggccagtatt tacaaaagga ggtctccatg aactccttaa
5041 atatgagttc ccctaataatc atcttgccag gtactaaata acaactgata gcacaagcta
5101 tagggaattt gaaagaattc catggatggg tgttgtctag ggccttttgt tgtttttgag
5161 acgggggtctg actctcacct aggtctggagt atagtgtggc gcaatcttgg ctactgcaa
5221 cttctgcctc ccagattcaa gcgattctcc tgctcagcc tccaagtag ctgagactac
5281 aggtgtgcac caccatgctc agctaatttt tgtattttta gtacagatgg ggtttcacca
5341 tgttggccag gctggctctg aactcctgat ctcccaaagt gaggtcttga actggctctg
5401 aactcctcca cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga gccactgcac ccggcctagg
5461 gccatgtaaa aagccagatc tgtgtgtctg tctgtgtaga aggtagaca agtggatgag
5521 aagttcctga actattcttg gcccttttac cactaagtga aagtaacttg ctgccccaaa

```

FIG. 5C

```

5581 gaaagatgtc tcattcattcg acaggacttt ctagttgaac ttcattgaaag caagagatcc
5641 tgttttttctt gctcaccact gtatcttgag acctgttgta gtgcctgcaa tactttattta
5701 ataagttatt ttttaagtatc agttttgtga gctttaactc tatgaggctct ttgttgtttg
5761 actgtatttt aactctggcc atgacagcaa gacaaagttc cattttttatt gagcttaaaa
5821 agaatacaagg ccaggtgaag tggcttacgc ctgtgatccc aacactttgt gaggctgcag
5881 caggaggatc tcttgagccc aggagtttga gaccgttcta ggcaatgtag tgaggctcag
5941 actccacaaa ataatttttt tttaaattgc acgctgtag tctcagctat caggaggctg
6001 agatgggagg atgacttgag cccaggaaat tgaagctgca gtgaattgtg attgcaccac
6061 tgcactccag cctgggtgac agatcaagac cttgcctaaa caaaacaaaa caaacaaaaa
6121 cccaaaaaac aaattgaaaa tgttgattct ttttactaca aacattatgg cagcactaaa
6181 aacttcgtgg gagtgtactg tggaaaatag tgtacttaat taattctcat tgtaatcagg
6241 ctaccaagag ccttggtgtg ctttaagagt tataactgcc aggcacagtg gctcatgcct
6301 ataatccag caccttgaga ggccgaggca ggtggatcac ctgagatcgg gagtttgaga
6361 ccagccgggc caatatggtg aaacaagctg tgtctctact aaatacaaaa aattagccgg
6421 gcgtggtggc acatgcctgt aatcccagct gcttgggaga ctgagacagg agaattgctt
6481 gaacctggaa ggccgagggt gcagtgagct gagattgcaa cattgtactc cagcctgggc
6541 aacaagaggg aaactccatc tcaaaaaaaaa aaaaaaagtt gtaactgagg ctgggcatgg
6601 tggctcatat ctgtaatccc agcactttga aaagccgagg caggtagatc acttgagctc
6661 agaagttcga gactagcctg ggcaacatga caaaacccca tctctacaaa aaatacgaag
6721 aattagctgg gcgtggtggc atgcacctgt agtcctagct acctgggagg ctgagggtggg
6781 aagattactt gaagctgcag tgagccatgg ttgtgccact gccctccagt ctgggcaaca
6841 aagtgagacc ctgtctcaaa aaacacaaaa aaattataa ctgatgtaaa ctggcagttt
6901 aggctgggtg tgggtggctca agcctgtaat cctagcaact tgggaggcca aggcagggtg
6961 atcacctgag ttcaggagtt cgagaccagc gtggccaaca tggtgaaacc ttgtctctat
7021 taaaaatacc aaaattagca agatgtggtg gtgggtgcct ataattccag ctactcagga
7081 ggctgaggca ggaggatcgc tggagccagg gaggcagagg ttacagtaag caaagatcac
7141 tccacttcac tccagcctgg gcaaaagagt gagacatata aaaaaataaa caaataaata
7201 aataaataag tggcagttca tcatttaact ccaaagactt tgcgtacatt tctactgaaa
7261 acaatctgag ctgattagaa ccctgccatt ttatagcctt tagctcgatc tccgaccgtt
7321 catttaaaaa aattctactt caggccgggc atggtggctc aagcctgtaa tccatcact
7381 gtaggaggcc aaagtgggca gatcacttaa ggtcaggagt ttgagaccag cctggccacc
7441 atggtgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc cgggcttggg ggtgagcacc
7501 tgtaatccca ccctgccgag tggcaggctg aggcaggaga atcgcttgag cccaagagcc
7561 ggaggttgca gtgagccaag cttgcaccat tgcactccag cctaggcaac agagtgtgac

```

FIG. 5D

```

7621 tccatctcaa gaaaaaaaaa attctatttc attttacaat atgcagatat atgtccatac
7681 acatgcataa tataaatgta taccatattt gtgagaatat gcatatatgt acacattaga
7741 tacacaatac aagcacaata catatgtctt ttgcccaaga tacagcattt tgtaaaggag
7801 acaggaatth agtaatatat gttccagaaa cagtacacaa gagaattcgc cgagatgaga
7861 aagttgtcac taggaatggg gagtggtaag atgtagaagg tataattggt cttaaagttc
7921 tactgccaac tttttccaat taattacca ctctgccatg ctttatggac aggaggttgt
7981 cggacactgt caattaataa atatttgagc atgatacact gcttgagct cctctaata
8041 aggagagtga tatcctagt catgttacag agggagtgtc cacacagttc ctattgtcat
8101 ttgatgagtt acttttcagg ggccttgtag ctgagcaagt tgcctcttt ttgatggatt
8161 tcagattgag ttacctgcat tgtcttgaga ttgcagcgtg tttcctccac tgtacggcgt
8221 agtcagcaga tctattagtt aaactccagt gggccctcag tcactaaatc tctctctgt
8281 gttgaaggct ttctgcattt gcttttcaat aaaggtttag aataactcct taaaaaa
SEQ ID NO. 4

```

FIG. 5E

Secuencia de referencia NCBI: NP\_000782.1

```
1 mvgslnclva vsqnmgigkn gdlpwpplrn efryfgrmtt tssvegkqnl vimgkktwfs
61 ipeknrplkg rinlvlsrel keppggahfl srslddalkl tegpelankv dmvwivggss
121 vykeamnhpg hklfvtrim qdfesdtffp eidlekykll peypgvlsdv qeekgikykf
181 evyeknd
```

FIG. 6

## Secuencia de referencia NCBI: NM\_000791

```

1  tcccagacag aacctactat gtgcggcgccg agctggggcg ggaagggcg agctggggcg
61  gctggggcg ctgcggccgc tgcggccgct gcagccgctg cagcgccagg gtccacctgg
121  tgggctgcac ctgtggagga ggaggtggat ttcaggcttc ccgtagactg gaagaatcgg
181  ctcaaaaccg cttgcctcgc aggggctgag ctggaggcag cgaggccgcc cgacgcaggc
241  ttccggcgag acatggcagg gcaaggatgg cagcccggcg gcagggcctg gcgaggagcg
301  cgagcccgcg gccgcagttc ccaggcgctc gcgggcgcga gcacgcccgcg accctgcgtg
361  cgccggggcg gggggcgggg gcctcgccctg cacaatggg gacgaggggg gcggggcggc
421  cacaatttcg cgccaaactt gaccgcgcgt tctgctgtaa cgagcgggct cgagggtcct
481  cccgctgctg tcatggttgg ttgcgtaaac tgcctcgtcg ctgtgtccca gaacatgggc
541  atcggaaga acggggacct gccctggcca ccgctcagga atgaattcag atatttccag
601  agaatgacca caacctcttc agtagaagg aaacagaatc tggtgattat gggtaagaag
661  acctggttct ccattcctga gaagaatcga cctttaagg gtagaattaa tttagttctc
721  agcagagaac tcaaggaacc tccacaagga gctcattttc tttccagaag tctagatgat
781  gccttaaaac ttactgaaca accagaatta gcaaataaag tagacatggt ctggatagtt
841  ggtggcagtt ctgtttataa ggaagccatg aatcaccag gccatcttaa actatttctg
901  acaaggatca tgcaagactt tgaaagtgac acgttttttc cagaaattga tttggagaaa
961  tataaacttc tgccagaata cccagggtgt ctctctgatg tccaggagga gaaaggcatt
1021 aagtacaaat ttgaagtata tgagaagaat gattaatatg aagggtgttt ctagttaaag
1081 ttgttcccc tccctctgaa aaaagtatgt atttttacat tagaaaagg tttttgttga
1141 cttagatct ataattattt ctaagcaact agtttttatt cccactact cttgtctcta
1201 tcagatacca tttatgagac attcttgcta taactaagtg cttctccaag accccaactg
1261 agtccccagc acctgctaca gtgagctgcc attccacacc catcacatgt ggcactcttg
1321 ccagtccctg acattgtcgg gcttttcaca tgttggtaat atttattaaa gatgaagatc
1381 cacataccct tcaactgagc agtttcaact gtggaaatac caaagcttc ctacgtgtat
1441 atccagaggt ttgtagataa atgttgccac cttgtttgta acagtgaata attgaaaaca
1501 acctggaagt ccagtgatgg gaaaatgagt atgtttctgt cttagattgg ggaacccaaa
1561 gcagattgca agactgaaat ttcagtgaat gcagtgtatt tgctaggtca taccagaaat
1621 catcaattga ggtacggaga aactgaactg agaaggtaat aaaagcaatt taaagtcagc
1681 gagcaggttc tcattgataa caagctccat actgctgaga tacagggaat tggagggggg
1741 aaagctggag tattgatccc gccccctcc ttggttgta gctccctgtc ctgtgtgtgg
1801 gcggaacata gtccagctgc totatagcaa gtctcagggtg tttgcagtaa gaagctgctg
1861 gcatgcacgg gaacagtgaat tgccaaacac ttaaagcaat tcgatgttta agtatgtaag
1921 ttctttttt ttttagacagc gtttgcgtct tgttgcccag gctagcatgc aatgggtgtg
1981 cctcggttta ctgcaacctc cgcttccca gattcaagcg attctcctgc ctgaggctcc
2041 caagtagcta ggaccagggt cgccgccacca cgcccgcta atttttgtat tttgtatttt
2101 tagtagagat ggggtttcac catgttggtc aggttagtct cgaactcgtg accgcaagcg
2161 attcaccac ctcagcctcc caaagtgtg ggattaccgg cttgagccac cacaccggc
2221 acatcttcat tctttttatg tagtaaaaag tataaggcca cacatggttt atttgaagta
2281 ttttataatt taaaaaata cagaagcagg aaaaccaatt ataagttcaa gtgagggatg
2341 atggttgctt gaaccaaagg gttgcatgta gtaagaaatt gtgatttaag atatatatta
2401 aagttataag tagcaggata ttctgatgga gtttgacttt ggttttgggc ccagggagtt
2461 tcagatgcct ttgagaaatg aatgaagtag agagaaaata aaagaaaaac cagccaggca
2521 cagtggctca cacctgtaat ccagcgctt tgggaggcta aggcaggcag atcacttgag
2581 accagcttgg gcaacatggc aaagcccat ctctacaaaa aacacaaaaa ttagtgggc
2641 attgtggcg acacctgtat toccatctag tcaggaagct gagatggaag aattaattga
2701 gccacagagt tcaaggctgc agtgagctgt gattgtgcca ctgactcca gccggggtga
2761 cagaagagac cttgtctcga aaaggaatct gaaaacaatg gaaccatgcc ttcataattc
2821 tagaaagtta ttttcaactg ataaatctat attcacccaa ataatcaagg gtgaaggtaa

```

FIG. 7A

```

2881 aataatacat ttttagacaa gcaaagactc aggggttacc tccatgtgcc ctttttaggg
2941 aagctgttgg agaaaatact ccagcaaaat gaaggagtac acaaaccaga gaatgacatg
3001 aatccagcaa ataggatcca acacaggcaa tattccagct atggagctag ctttaaaaag
3061 gaacagtaaa aatattaatc ggttagctgg gtggaatggc ccatgcctgt agtcccagct
3121 actcaggagg ctcagcagca ggacgacttg agcccaagag ttccagacca gcctggccac
3181 cttagtgaga tcccttctct taaaaataat aacttattgc cagatttggg gcatttggaa
3241 agaagtcat tgaagataaa gcaaaagtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaca aggggaaagg
3301 gttggttagg caatcattct agggcagaaa gaagtacagg ataggaagag cataatacac
3361 tgtttttctc aacaaggagc agtatgtaca cagtcataat gatgtgactg cttagccctt
3421 aaatatggta actactctgg gacaatatgg gaggaaaagt gaagattgtg atggtgtaag
3481 agctaaatcc tcactctgtc tatccagaaa tcactatata atatataata atgaaatgac
3541 taagttatgt gaggaaaaaa acagaagaca ttgctaaaag agttaaaagt cattgctctg
3601 gagaattagg agggatgggg caggggactg ttaggatgca ttataaactg aaaagccttt
3661 ttaaaatttt atgtattaat atatgcattc acttgaaaaa ctaaaaaaaa acaataattt
3721 ggaaaaaccc atgaaggtaa ctaacggaag gaaaaactaa gagaatgaaa agtatttgcc
3781 tctggaaaga acaactggca ggactgttgt ttccattgta agacttttgg agccatttaa
3841 ttgtacttaa ccattttcat ctatttcttt aataagaaca attccatctt aataaagagt
3901 tacacttggt aataagtaaa aaaaaaaaaa aa

```

FIG. 7B

| Clon  | Título final en el sobrenadante (ELISA, mg/l) |
|-------|-----------------------------------------------|
| 3-324 | 66                                            |
| 3-388 | 48                                            |
| 3-261 | 287                                           |
| 3-330 | 268                                           |
| 3-503 | 215                                           |
| 3-351 | 170                                           |
| 3-269 | NA                                            |
| 3-497 | 177                                           |
| 2-280 | NA                                            |
| 3-37  | 60                                            |

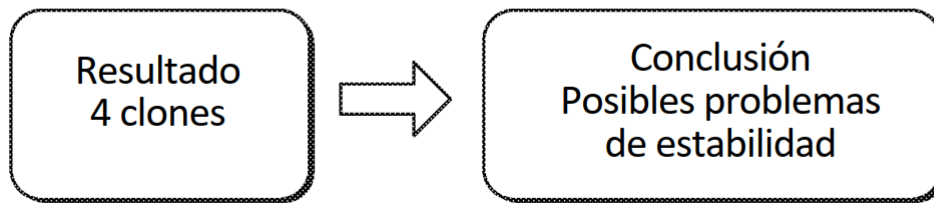
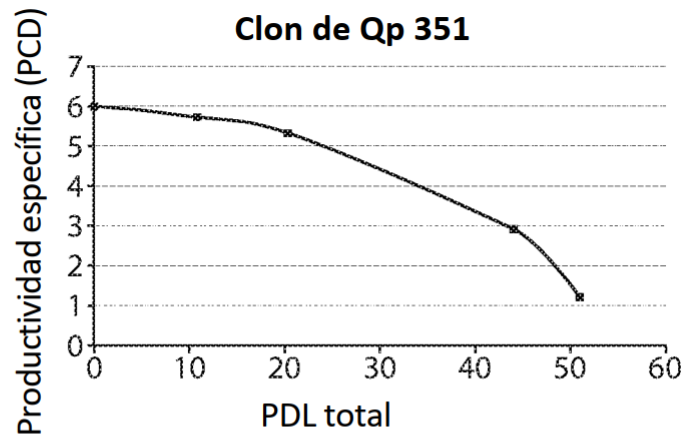


FIG. 8

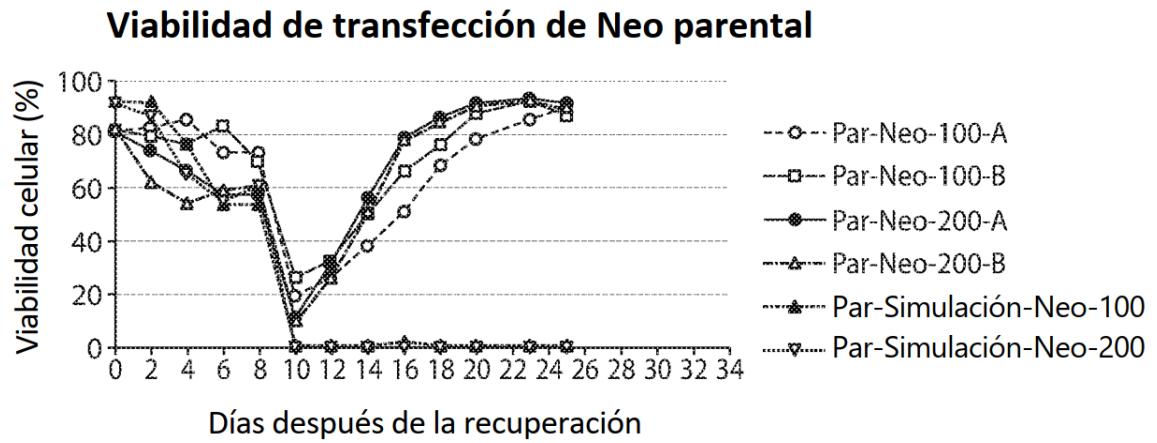


FIG. 9

### Viabilidad de transfecciones de GS parental

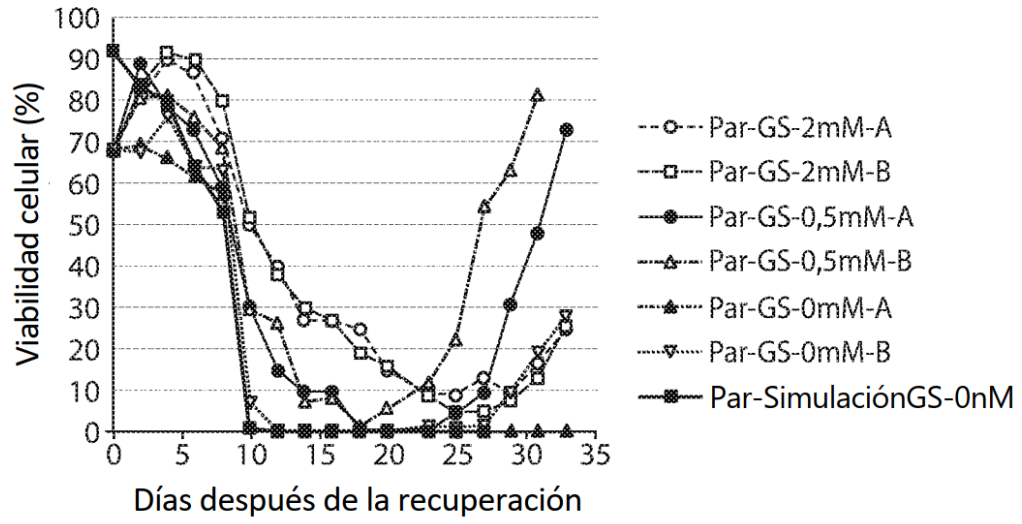


FIG. 10

### Viabilidad celular de transfecciones triples del estudio 3

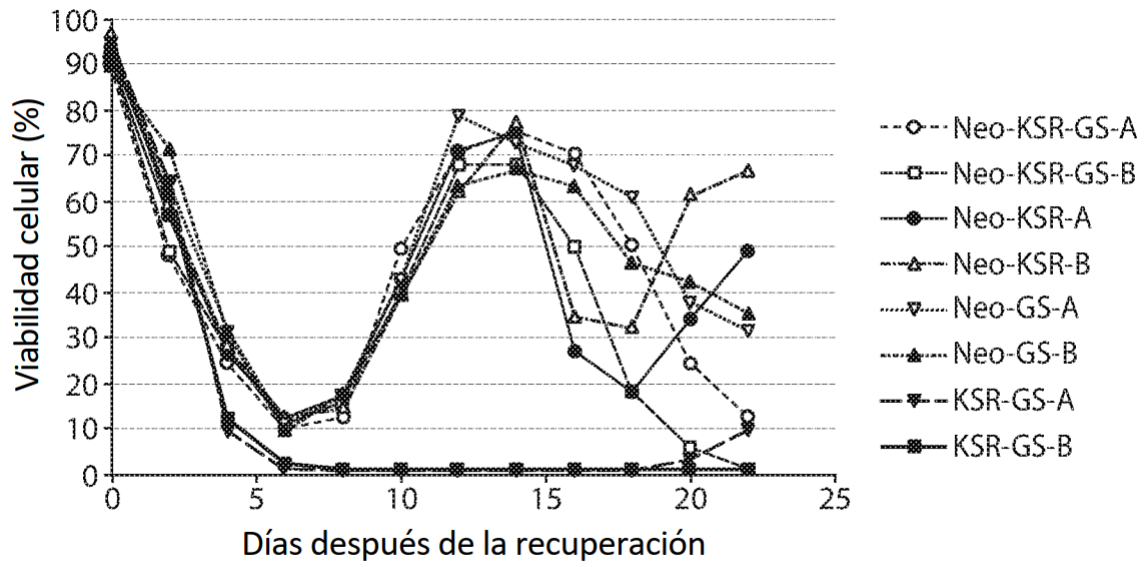


FIG. 11