

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 044**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/67 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2018** **PCT/US2018/035764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018** **WO18223108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2018** **E 18734359 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024** **EP 3630977**

54 Título: **Métodos y composiciones para promover la producción de proteínas que contienen aminoácidos no naturales**

30 Prioridad:

02.06.2017 US 201762514754 P

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

04.09.2024

73 Titular/es:

AMBRX, INC. (100.0%)
10975 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

CHEN, SIGENG;
LU, YINGCHUN y
TIAN, FENG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 044 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

Métodos y composiciones para promover la producción de proteínas que contienen aminoácidos no naturales

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente divulgación pertenece al campo de la ingeniería genómica y la generación de líneas celulares para producir polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales. La invención se refiere de manera general al campo de la generación, el desarrollo y la producción de líneas celulares de polipéptidos y proteínas que contienen aminoácidos no naturales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La aplicación del sistema de manipulación dirigida químicamente ortogonal en células eucariotas (EuCODE), (Feng et al., (2013), *A general approach to site-specific antibody drug conjugates*, PNAS 111(5): 1766-1771; Schultz et al., USPN 7,083,970), supone un gran avance en la producción genética de proteínas que contienen aminoácidos no naturales. En los últimos años, esta tecnología ha progresado rápidamente en el campo de la conjugación de fármacos con anticuerpos (ADC); (Consultar, por ejemplo, las Publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20150018530, 20150141624, 20150152187 y 20150152190). Sin embargo, una aplicación más amplia de las proteínas que contienen aminoácidos no naturales en la industria se ha visto obstaculizada por el bajo rendimiento relativo en células de mamíferos.

Las observaciones indican que un factor importante que probablemente contribuya al bajo rendimiento de la producción de proteínas, podría ser la apoptosis inducida provocada por el exceso de ARNt no cargado en el sistema. Como se sabe en la técnica, la apoptosis puede iniciarse por varios factores intrínsecos o extrínsecos en los cultivos celulares, incluyendo los procesos de producción. Otros retos que contribuyen al bajo rendimiento de la producción de proteínas son los factores estresantes celulares capaces de activar vías apoptóticas intrínsecas al aumentar la escala en los procesos de biorreactores. Por lo tanto, hay una necesidad, en la industria, de métodos y composiciones mejorados para promover y aumentar la producción de proteínas que contienen aminoácidos no naturales. Esta invención aborda estas y otras necesidades, como será evidente al revisar la siguiente divulgación.

La WO 2016/066995 describe la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas.

La WO 2008/127900 describe métodos de codificación genética de aminoácidos no naturales en células eucariotas usando pares de ARNt/sintetasa ortogonales.

Zhang et al., *Scientific Reports* (2015), 6(1), describe la manipulación CRISPRi de la expansión del código genético mediante RF1 para la reasignación del codón ámbar en bacterias.

La WO 2009/151591 describe métodos y composiciones para la generación de líneas celulares deficientes en Bax y Bak.

Marie Grav et al., *Biotechnology Journal* (2015), 10(9):1446-1456, describe la generación en un único paso de líneas celulares CHO de triple desactivación mediante CRISPR-Cas9 y enriquecimiento fluorescente.

Ilegems et al., *Prot. Eng. Design & Selection* (2004), 17(12):821-827, describe que la regulación por disminución de eRFI mediante ARN de interferencia aumenta la eficacia de supresión del ARNt mal acilado en células humanas.

Lajoie et al., *Science* (2013), 342(6156):357-360, describe la construcción y caracterización de un organismo recodificado genómicamente.

La WO 2010/141851 describe la mejora de la incorporación de aminoácidos no naturales en células eucariotas.

Wang y Wang, *J. Am. Chem. Soc.* (2008), 130(19):6066-6067, describen nuevos métodos que permiten la incorporación eficaz de aminoácidos no naturales en la levadura.

Wang y Wang, *Methods mol. biol.* (2011), 794: 199-213, describen la incorporación genética de aminoácidos no naturales a proteínas en la levadura.

Cohen et al., *Chembiochem* (2016), 17(11):1008-1011, describe un sistema basado en un único plásmido para la mutagénesis eficiente de aminoácidos no canónicos en células de mamífero cultivadas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método para generar una línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, el método comprende inactivar uno o más sitios o regiones diana en una célula, en donde el uno o más sitios o regiones diana es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak, en donde la célula expresa un gen de interés que contiene un codón selector, y en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt).

La presente invención también proporciona un método para disminuir o reducir la apoptosis en una célula, en donde la célula expresa un gen de interés que contiene un codón selector, y en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt), el método comprendiendo inactivar uno o más sitios o regiones diana proapoptóticas en la célula, en donde el uno o más sitios o regiones diana proapoptóticas se seleccionan entre Bax y Bak.

La presente invención también proporciona un método para generar una célula o línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, el método comprendiendo: proporcionar una célula o línea celular que expresa un gen de interés que contiene un codón selector, y que comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt); introducir en la línea celular una molécula de ácido nucleico capaz de inactivar uno o más sitios o regiones diana en la célula o línea celular, en donde el uno o más sitios o regiones diana es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak; opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona entre las SEQ ID NO: 1-6, y además opcionalmente proporcionar un aminoácido no natural a la célula o línea celular.

La presente invención también proporciona una célula o línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, en donde la célula expresa un gen de interés que contiene un codón selector, en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt); y en donde la célula comprende uno o más sitios o regiones diana inactivados, en donde el uno o más sitios o regiones diana inactivados es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak.

En una realización, la célula o línea celular es eucariota. En otras realizaciones, la célula o línea celular se selecciona entre COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa o HEK293. En otra realización, la célula o línea celular es transitoria, una población celular estable o una línea celular clonal estable. En otra realización, la célula es una célula aislada. La célula aislada sirve para obtener una proteína que incorpora un aminoácido no natural.

En otras realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora específicamente al sitio. En otra realización el aminoácido no natural es para-acetil fenilalanina, p-nitrofenilalanina, p-sulfotirosina, p-carboxifenilalanina, o-nitrofenilalanina, m-nitrofenilalanina, p-boronilfenilalanina, o-boronilfenilalanina, m-boronilfenilalanina, p-aminofenilalanina, o-aminofenilalanina, m-aminofenilalanina, p-acilfenilalanina, o-acilfenilalanina, m-acilfenilalanina, p-OMe fenilalanina, o-OMe fenilalanina, m-OMe fenilalanina, p-sulfofenilalanina, o-sulfofenilalanina, m-sulfofenilalanina, 5-nitro His, 3-nitro Tyr, 2-nitro Tyr, Leu sustituido con nitro, His sustituido con nitro, De sustituido con nitro, Trp sustituido con nitro, 2-nitro Trp, 4-nitro Trp, 5-nitro Trp, 6-nitro Trp, 7-nitro Trp, 3-aminotirosina, 2-aminotirosina, O-sulfotirosina, 2-sulfooxifenilalanina, 3-sulfooxifenilalanina, o-carboxifenilalanina, m-carboxifenilalanina, una p-acetil-L-fenilalanina, p-propargil-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-yodo-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina o p-propargiloxifenilalanina. En algunas realizaciones de la presente invención, el aminoácido no natural se selecciona entre O-metil-L-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, p-propargiloxi-L-fenilalanina, tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-yodo-fenilalanina, p-bromo-fenilalanina, p-amino-L-fenilalanina o isopropil-L-fenilalanina.

También se describe en la presente un gen de interés o un gen de interés que contiene un codón selector. El codón selector es un codón sin sentido, un codón raro o un codón de cuatro bases. En otra realización, el codón selector comprende un codón ocre, un codón ópalo o un codón ámbar. En ciertas realizaciones, el codón selector es un codón ámbar.

En realizaciones de la invención, el gen de interés o el gen de interés que contiene el codón selector es un gen o producto bioterapéutico que incluye una vacuna o un anticuerpo. El gen de interés o gen de interés que contiene el codón selector es un anticuerpo, scFv, proteínas de fusión scFv, proteínas de fusión Fc, Factor VII, Factor VIII o Factor IV. En otras realizaciones, el gen de interés o el gen de interés que contiene el codón selector es una citoquina, interleucina, interferón, quimiocina, factor de crecimiento, hormona y sus receptores, análogos, biespecíficos o fragmentos de los mismos. En otra realización, el gen de interés es HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3,

IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptina, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulina, TNFR1, TRAIL, EPO, y análogos, biospecíficos o fragmentos de los mismos. En otras realizaciones, el gen de interés o el gen de interés que contiene el codón selector se selecciona del grupo que consiste en: una citoquina, un factor de crecimiento, un receptor de factor de crecimiento, un interferón, una interleucina, una molécula inflamatoria, un producto oncogénico, una hormona peptídica, una molécula de transducción de señales, un receptor de hormona esteroidea, eritropoyetina (EPO), insulina, hormona de crecimiento humano, una alfa-1 antitripsina, una angiostatina, un factor antihemolítico, un anticuerpo, una apolipoproteína, una apoproteína, un factor natriurético auricular, un polipéptido natriurético auricular, un péptido auricular, una quimiocina C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, un Gro-a, un Gro-b, un Gro-c, un IP-10, un GCP-2, un NAP-4, un SDF-1, un PF4, un MIG, una Calcitonina, un ligando c-kit, una citoquina, una quimioquina CC, una proteína quimioatrayente de monocitos 1, una proteína quimioatrayente de monocitos 2, una proteína quimioatrayente de monocitos 3, una proteína inflamatoria de monocitos 1 alfa, una proteína inflamatoria de monocitos 1 beta, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, un CD40, un ligando de CD40, un ligando de C-kit, un Colágeno, un Factor estimulante de colonias (CSF), un factor 5a del Complemento, un inhibidor del Complemento, un receptor 1 del Complemento, una citoquina, DHFR, un Péptido Activador de Neutrófilos epitelial-78, un GRO α /MGSA, un GRO β , un GRO γ un MIP-1 α , un MIP-1 β , un MCP-1, un Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), un Péptido Activador de Neutrófilos epitelial, una Eritropoyetina (EPO), una. Toxina exfoliante, un Factor IX, un Factor VII, un Factor VIII, un Factor X, un Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un Fibrinógeno, una Fibronectina, un G-CSF, un GM-CSF, una Glucocerebrosidasa, una Gonadotropina, un factor de crecimiento, un receptor de factor de crecimiento, una proteína Hedgehog, una hemoglobina, un factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), una hirudina, una albúmina sérica humana, una ICAM-1, un receptor de ICAM-1, un LFA-1, un receptor de LFA-1, una insulina, un factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), un IGF-I, un IGF-II, un interferón, un IFN- α , un IFN- β , un IFN- γ , una interleucina, una IL-1, una IL-2, una IL-3, una IL-4, una IL-5, una IL-6, una IL-7, una IL-8, una IL-9, una IL-10, una IL-11, una IL-12, un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), una lactoferrina, un factor inhibidor de la leucemia, una luciferasa, una neurturina, un factor inhibidor de neutrófilos (NIF), una oncostatina M, una proteína osteogénica, un producto oncogénico, una hormona paratiroidea, un PD-ECSF, un PDGF, una hormona peptídica, una hormona de crecimiento humano, una pleiotropina, una proteína A, una proteína G, exotoxinas pirogénicas A, B o C, una relaxina, una renina, un SCF, un receptor soluble del complemento I, un I-CAM 1 soluble, un receptor de interleucina soluble, un Receptor de TNF soluble, una somatomedina, una Somatostatina, una Somatotropina, una Estreptoquinasa, un Superantígeno, unas enterotoxinas estafilocócicas, un SEA, un SEB, un SEC1, un SEC2, un SEC3, un SED, un SEE, un receptor de hormonas esteroideas, una superóxido dismutasa (SOD), una Toxina del síndrome de shock tóxico, una Timosina alfa 1, un activador tisular del plasminógeno, un factor de crecimiento tumoral (TGF), un TGF- α , un TGF- β , un factor de necrosis tumoral, un factor de necrosis tumoral alfa, un factor de necrosis tumoral beta, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), una proteína VLA-4, una proteína VCAM-1, un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGEF), una uroquinasa, un Mos, un Ras, un Raf, un Met, un p53, un Tat, un Fos, un Myc, un Jun, un Myb, un Rel, un receptor de estrógenos, un receptor de progesterona, un receptor de testosterona, un receptor de aldosterona, un receptor de LDL, un SCF/c-Kit, un CD40L/CD40, un VLA-41VCAM-1, un ICAM-1/LFA-1, una hialurina/CD44 y una corticosterona.

El sitio o la región dirigida para inactivación es Bax o Bak. En otras realizaciones, el sitio o región objetivo de la inactivación está total o parcialmente inactivado. Un sitio o región parcialmente inactivado, interrumpido, desactivado o extirpado puede incluir un sitio o región que está un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, inactivado, interrumpido, desactivado o extirpado.

En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se selecciona de las SEQ. ID NO: 1-6. En otra realización, el uno o más sitios o regiones objetivo de la inactivación, seleccionados de Bax y Bak, es el mismo o es diferente.

En otra realización, la invención proporciona un método como se ha mencionado anteriormente para optimizar el rendimiento de una proteína o polipéptido que incorpora un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, la célula o línea celular de la invención o como se usa en los métodos de la invención es una línea celular transitoria, una población de línea celular estable o una línea celular clonal estable. En otra realización la invención proporciona un método para optimizar el rendimiento de una proteína o polipéptido que tiene un aminoácido no natural incorporado específicamente en el sitio.

En otras realizaciones, la población de células o líneas celulares estable es una célula o línea celular de plataforma o de producción.

En ciertas realizaciones del método de la invención el rendimiento de la proteína que contiene el aminoácido no natural es por lo menos 0,5 veces o más que en ausencia de inactivación de uno o más sitios o regiones objetivo para la inactivación en una célula.

En una realización de la invención, se introducen una o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas en la línea celular. La una o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas. En otras realizaciones, la una o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas proceden del mismo sitio o región diana de unos diferentes. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos manipuladas pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas del mismo sitio o región diana en una célula. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos manipuladas pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ácidos nucleicos manipuladas de un sitio o región diana diferente.

En otras realizaciones, un polinucleótido que reconoce uno o más sitios o regiones diana para inactivación, ablación, desactivación o interrupción en una célula puede incluir un polinucleótido que reconoce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios o regiones.

En ciertas realizaciones, se proporciona una línea celular de producción estable. En otras realizaciones, la célula o línea celular es una célula o línea celular eucariota. En otras realizaciones, la célula o línea celular eucariota puede incluir cualquiera de, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de planta, una célula de insecto, pero sin estar limitada a ellas. En algunas realizaciones, la célula o línea celular eucariota es una célula o línea celular de vertebrado. En algunas realizaciones, la célula o línea celular eucariota es una célula o línea celular de mamífero o humana. En otras realizaciones, la célula o línea celular puede incluir una COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, o HEK293 (por ejemplo, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), pero sin estar limitada a las mismas. En otras realizaciones, la célula o línea celular es una célula o línea celular CHO incluyendo, por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV. En otras realizaciones, la célula o línea celular es una célula o línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. En ciertas realizaciones, la célula o línea celular es una célula o línea celular CHO-K1.

En otras realizaciones, optimizar, o potenciar, o aumentar, o mejorar el rendimiento de un polipéptido o proteína que contiene aminoácidos no naturales puede incluir optimizar, o potenciar, o aumentar, o mejorar el rendimiento por lo menos 0,5 veces, por lo menos 1 vez, por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 6 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 8 veces, por lo menos 9 veces, o por lo menos 10 veces o más que en ausencia de una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que reconoce uno o más sitios o regiones diana para inactivación, ablación, interrupción o desactivación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1, paneles A y B. Una estrategia para utilizar líneas celulares de plataforma en la industria y en las empresas farmacéuticas para producir proteínas que contienen aminoácidos no naturales. La Figura 1 representa las funciones importantes del uso de una línea celular de plataforma en la industria (FIG. 1A) y en las empresas farmacéuticas (FIG. 1B).

FIG. 2. Un procedimiento general de utilización de una línea celular de plataforma en el desarrollo de una línea celular de alta producción.

FIG. 3, paneles A-C. Estrategias para optimizar el desarrollo de líneas celulares de alta producción. La FIG. 3 representa la optimización del desarrollo de líneas celulares de alta producción desde varios aspectos, como el depósito de células individuales dependiente de FACS (FIG. 3A), la desactivación de CRISPR (FIG. 3B) y la optimización del proceso de desarrollo de líneas celulares (FIG. 3C).

FIG. 4, paneles A y B. Observación de la apoptosis en las células de la línea celular de plataforma 4E2. Se usó el ensayo de anexina V para evaluar la viabilidad de las células CHO-S (FIG. 4A) y de la línea celular de plataforma 4E2 (FIG. 4B) que contenían el par ortogonal genéticamente incorporado ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa que incorporaba específicamente para-acetil-L-fenilalanina. Como se muestra en la Figura 4, en comparación con las células CHO-S (la viabilidad es del 96%), las 4E2 mostraron una apoptosis excesiva (la viabilidad es del 85%).

FIG. 5. Diseño del ARNg CRISPR del gen BAX diana en células CHO. La Figura 5 representa la secuencia de ADN genómico del gen BAX en células CHO en las que se han anotado tres secuencias de ARNg. La secuencia de ADN genómico del gen BAX, el exón 1 y el exón 2 se muestran en sombra gris. La otra secuencia de BAX se muestra en texto plano. Los cebadores usados en la PCR y la secuenciación se muestran al principio y al final de la secuencia como cebador directo y cebador inverso respectivamente.

FIG. 6. Diseño de ARNg CRISPR del gen BAK diana en células CHO. La Figura 6 representa la secuencia de ADN genómico del gen BAK en células CHO en las que se han anotado dos secuencias de ARNg. La secuencia de ADN genómico del gen BAK, el exón 2 y el exón 3 se muestran en sombreado gris. La otra secuencia de BAK se muestra en texto plano. Los cebadores usados en la PCR y la secuenciación se muestran al principio y al final de la secuencia como cebador directo y cebador inverso respectivamente.

FIG. 7. Constructos CRISPR de BAX o BAK. La Figura 7 representa el diseño de los plásmidos CRISPR usados en los experimentos de desactivación de BAX o BAK. El vector de nucleasas de CRISPR Geneart (pGCNV) es un vector comercialmente disponible de Thermo Fisher scientific, (San Diego, CA). La forma completa del plásmido pGCNV se prepara insertando un oligodúplex en el vector pGCNV abierto con corte que contiene una ranura para el oligodúplex diseñado con secuencias específicas de ARNg de 19 nucleótidos de longitud para dirigirse al sitio

génico de manera individual (consultar la Tabla 1 en otra parte de la presente).

FIG. 8. Representa las estructuras de aminoácidos no naturales representativos de la presente invención.

FIG. 9. Ensayo Surveyor de poblaciones celulares que expresan anti-HER2 en las que se desactivó BAX o BAK usando CRISPR. La Figura 9 representa el análisis del ensayo Surveyor de la eficacia de desactivación durante la desactivación de BAX o BAK usando CRISPR. La disminución de la banda superior y la aparición de las nuevas bandas inferiores indican la eficiencia que puede cuantificarse mediante el análisis de densitometría de la imagen escaneada con el software Image J. La relación entre la banda original antes y después de la desactivación de CRISPR (KO) se usó para medir la eficiencia de desactivación. La eficiencia de desactivación para BAX y BAK fue del 30% y del 70% respectivamente, lo que resulta en una eficiencia de desactivación doble calculada de aproximadamente el 21%.

FIG. 10. Análisis del ADN de clones unicelulares que expresan anti-HER2 con los genes BAX y BAK desactivados usando CRISPR. La Figura 10 representa los resultados de la secuenciación del ADN de veinte clones unicelulares después de la desactivación de BAK usando CRISPR. La secuencia de ADN superior (Bak-CHO-ADNg1) es la secuencia de ADN de la región genómica del gen BAK original. Sólo el clon 'ZA_112_K32_BakI-II' tiene una secuencia idéntica a la del gen BAK original. Los demás genes mostrados en la figura tienen delecciones o inserciones en sus secuencias.

FIG. 11. Análisis por transferencia Western de la confirmación de la desactivación de BAX en clones de desactivación de BAX que expresan anti-HER2 usando CRISPR. BAX es una proteína de 21 KD que se muestra como una banda en las células L082 que no tienen desactivación génica y expresan proteína BAX de tipo salvaje. Los otros clones no mostraron expresión detectable de la proteína BAX excepto el clon UBB3 que muestra expresión residual de BAX.

FIG. 12, paneles A y B. Análisis de apoptosis de líneas celulares de desactivación de BAX/BAK que expresan anti-HER2. La Figura 12 representa el análisis de apoptosis con Anexina V de la línea celular original L082 (FIG. 12A) y de las líneas celulares con doble desactivación de BAX/BAK BB15 (FIG. 12B). Como se muestra en la tabla, la viabilidad celular mejora del 40% al 80% después de la desactivación de BAX y BAK. Simultáneamente, las células apoptóticas disminuyen del 53% al 17%.

FIG. 13, paneles A-D. Promoción de la producción de anticuerpos anti-HER2 en líneas celulares de desactivación de BAX/BAK en cultivo por lotes. La Figura 13 representa los cambios en la producción de proteínas en líneas celulares con doble desactivación de BAX/BAK. Las producciones de proteínas se analizan durante la producción por lotes. Densidad de células viables (VCD, FIG. 13A). Viabilidad celular (FIG. 13B). Durante la producción por lotes (día 7), la línea celular de desactivación doble BAX/BAK mostró un aumento del título de 150 mg/l a 270 mg/l (FIG. 13C). Productividad específica (Qp) (FIG. 13D).

FIG. 14, paneles A-D. Promoción de la producción de anticuerpos anti-HER2 en líneas celulares de desactivación de BAX/BAK en cultivo alimentado por lotes. La Figura 14 representa los cambios en la producción de proteínas en líneas celulares con doble desactivación de BAX/BAK. Las producciones de proteínas se analizan durante la producción de lotes alimentados. Densidad de células viables (VCD, FIG. 14A). Viabilidad celular (FIG. 14B). Durante la producción de lotes alimentados (día 14), la línea celular con doble desactivación BAX/BAK muestra un aumento del título de 450 mg/l a 1500 mg/l (FIG. 14C). Productividad específica (Qp) (FIG. 14D).

FIG. 15. Ensayo Surveyor de poblaciones celulares que expresan anti-PSMA en las que se desactivó BAX o BAK usando CRISPR. La Figura 15 representa el análisis de la eficacia de la desactivación durante la desactivación de BAX o BAK usando CRISPR. La relación de la banda original antes y después de la desactivación (KO) de CRISPR se cuantificó mediante análisis de densitometría de la imagen escaneada con el software Image J y se usó para medir la eficiencia de la desactivación. La eficiencia de desactivación para BAX y BAK fue del 42% y 53% respectivamente, lo que resultó en una eficiencia de desactivación doble calculada de aproximadamente el 20%.

FIG. 16, paneles A y B. Análisis de transferencia Western de confirmación de desactivación de BAX y BAK en clones que expresan anti-PSMA. Confirmación de la desactivación de BAX en clones que expresan anti-PSMA usando CRISPR (FIG. 16A). Confirmación de la desactivación de BAK en clones que expresan anti-PSMA (FIG. 16B). Los controles son células L082 que expresan la proteína BAX de tipo salvaje, banda a 21-KD y células BB15 que expresan anti-HER2 - doble desactivación de BAX/BAK.

FIG. 17. Análisis de apoptosis de líneas celulares que expresan anti-PSMA desactivación de BAX/BAK. La Figura 17 representa el análisis de apoptosis con Anexina V de las líneas celulares con doble desactivación de BAX/BAK PSMA-192 y PSMA 719 con una viabilidad celular de aproximadamente el 85% en comparación con aproximadamente el 35-37% en clones con KO sencilla (PSMA-882) o clones sin desactivación (PSMA-484).

FIG. 18, paneles A-C. Promoción de la producción de anticuerpos anti-PSMA en líneas celulares con desactivación de BAX/BAK en cultivo alimentado por lotes. La Figura 18 representa los cambios en la producción de proteínas en líneas celulares con doble desactivación de BAX/BAK (por ejemplo, se muestra la línea celular PSMA-BBKO-192). Las producciones de proteínas se analizan durante la producción de lotes alimentados. Densidad de células viables (VCD, FIG. 18A). Viabilidad celular (FIG. 18B). Durante la producción de lotes alimentados (día 14), la línea celular con doble desactivación BAX/BAK mostró un aumento del título de 500 mg/l a 1400 mg/l (FIG. 18C).

FIG. 19. Ensayo Surveyor de poblaciones celulares que expresan anti-CD70 en las que se desactivó BAX o BAK usando CRISPR. La Figura 19 representa el análisis del ensayo Surveyor de la eficacia de la desactivación durante la desactivación de BAX o BAK usando CRISPR. La relación de la banda original antes y después de la desactivación (KO) de CRISPR se cuantificó mediante análisis de densitometría de la imagen escaneada con el software Image J y se usó para medir la eficiencia de desactivación. La eficiencia de desactivación para BAX y BAK fue del 51% y del 23% respectivamente, lo que resultó en una eficiencia de desactivación doble calculada de

aproximadamente el 10%.

FIG. 20, paneles A y B. Análisis por transferencia Western de la confirmación de la desactivación de BAX y BAK en clones que expresan anti-CD70. Confirmación de la desactivación de BAX en clones que expresan anti-CD70 (FIG. 20A). Confirmación de la desactivación de BAK en clones que expresan anti-CD70 (FIG. 20B). Células L082 de control que expresan proteína BAX de tipo salvaje, banda a 21 KD, y proteína BAK de tipo salvaje, banda a 24 KD.

FIG. 21. Análisis de apoptosis de líneas celulares que expresan anti-CD70 con desactivación de BAX/BAK. La Figura 21 representa el análisis de apoptosis con Anexina V de la línea celular CD70-BBKO-563 con doble desactivación de BAX/BAK, por ejemplo, con una viabilidad celular del 60% en comparación con la línea celular original CD70-MW-108 con una viabilidad celular del 18%. Las células apoptóticas disminuyeron del 80% al 40%.

FIG. 22, paneles A-C. Promoción de la producción de anticuerpos anti-CD70 en líneas celulares con desactivación de BAX/BAK en cultivo alimentado por lotes. La Figura 22 representa los perfiles de producción de líneas celulares que expresan anti-CD70 con desactivación doble de BAX/BAK en matraz agitado y biorreactor de sobremesa. Densidad celular viable (VCD, FIG. 22A). Viabilidad celular (FIG. 22B). Como ejemplo, la línea celular con doble desactivación de BAX/BAK, CD70-BBKO-563, mostró un título elevado de 1000 mg/l (FIG. 22C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células y similares.

Definiciones

El término "ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o de cadena doble. A modo de ejemplo solamente, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las de un ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN usados en la tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares); (iii) variantes de los mismos modificadas de manera conservadora (que incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de codones degeneradas) y secuencias complementarias y secuencia explícitamente indicada. A modo de ejemplo, las sustituciones de codones degeneradas pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica de igual manera a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican tanto a polímeros de aminoácidos naturales como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido no natural. Además, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los residuos de aminoácidos están enlazados por enlaces peptídicos covalentes.

Como se usa en la presente, el término "ortogonal" se refiere a una molécula (por ejemplo, un ARNt ortogonal (O-ARNt) y/o una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (O-RS)) que funciona con componentes endógenos de una célula con eficiencia reducida en comparación con una molécula correspondiente que es endógena a la célula o al sistema de traducción, o que no funciona con componentes endógenos de la célula. En el contexto de los ARNt y las aminoacil-ARNt sintetetasas, ortogonal se refiere a una incapacidad o eficiencia reducida, por ejemplo, menos del 20% eficiente, menos del 10% eficiente, menos del 5% eficiente, o menos del 1% eficiente, de un ARNt ortogonal para funcionar con una ARNt sintetasa endógena en comparación con un ARNt endógeno para funcionar con la ARNt sintetasa endógena, o de una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal para funcionar con un ARNt endógeno en comparación con una ARNt sintetasa endógena para funcionar con el ARNt endógeno. La molécula ortogonal carece de una molécula complementaria endógena funcional en la célula. Por ejemplo, un ARNt ortogonal en una célula es aminoacilado por cualquier RS endógeno de la célula con eficacia reducida o incluso nula, en comparación con la aminoacilación de un ARNt endógeno por el RS endógeno. En otro ejemplo, un RS ortogonal aminoacila cualquier ARNt endógeno en una célula de interés con una eficacia reducida o incluso nula, en comparación con la aminoacilación del ARNt endógeno por un RS endógeno. Puede introducirse en la célula una segunda molécula ortogonal que funcione con la primera molécula ortogonal. Por ejemplo, un par ARNt/RS ortogonal incluye componentes complementarios introducidos que funcionan juntos en la célula con una eficiencia (por ejemplo, 50% de eficiencia, 60% de eficiencia, 70% de eficiencia, 75% de eficiencia, 80% de eficiencia, 90% de eficiencia, 95% de eficiencia, o 99% o más de eficiencia) a la de un par de ARNt/RS endógeno correspondiente.

El término "codón selector" se refiere a los codones reconocidos por el O-ARNt en el proceso de traducción

y no reconocidos por un ARNt endógeno. El giro anticodón del O-ARNt reconoce el codón selector en el ARNm e incorpora su aminoácido, por ejemplo, un aminoácido no natural, en este sitio en el polipéptido. Los codones selectores pueden incluir, por ejemplo, codones sin sentido, como codones de parada, por ejemplo, codones ámbar, ocre y ópalo; codones de cuatro o más bases; codones raros; codones derivados de pares de bases naturales o no naturales y/o similares.

El término "ARNt supresor" es un ARNt que interrumpe la lectura de un ARN mensajero (ARNm) en un sistema de traducción dado, por ejemplo, proporcionando un mecanismo para incorporar un aminoácido a una cadena polipeptídica en respuesta a un codón selector. Por ejemplo, un ARNt supresor puede leer a través de, por ejemplo, un codón de parada, un codón de cuatro bases, un codón raro, y/o similares.

El término "sistema de traducción" se refiere al conjunto colectivo de componentes que incorporan un aminoácido de origen natural en una cadena polipeptídica en crecimiento (proteína). Los componentes de un sistema de traducción pueden incluir, por ejemplo, ribosomas, ARNt, sintetasas, ARNm, aminoácidos y similares. Los componentes de la invención (por ejemplo, ORS, OARNt, aminoácidos no naturales, etc.) pueden añadirse a un sistema de traducción in vitro o in vivo, por ejemplo, una célula eucariota, una célula de vertebrado, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de alga, una célula de hongo, una célula de insecto, y/o similares.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y aminoácidos no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y la pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a modo de ejemplo solamente, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o pueden tener estructuras principales peptídicas modificados, pero conservando la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Ejemplos no limitativos de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metilsulfonio.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de aminoácidos naturales y no naturales en la secuencia codificada es una "variante conservadoramente modificada" cuando la interrupción da como resultado la deleción de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido natural y no natural por un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de manera conservadora se añaden y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos de los métodos y composiciones descritos en la presente.

Los expertos en la técnica conocen las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M); (consultar, por ejemplo, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2ª edición (diciembre de 1993).

Como se usa en la presente, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirolisina o selenocisteína. Otros términos que pueden usarse como sinónimos del término "aminoácido no natural" son "aminoácido codificado de manera no natural", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural" y sus varias versiones con y sin guiones. El término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se producen de manera natural por modificación de un aminoácido codificado de manera natural (incluyendo, pero no limitado a, los 20 aminoácidos comunes o pirolisina y selenocisteína) pero que no son incorporados por sí mismos a una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de traducción. Ejemplos de aminoácidos de origen natural que no están codificados de manera natural incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina. Además, el término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que no se producen de manera natural y pueden obtenerse sintéticamente o pueden obtenerse por modificación de aminoácidos no naturales. Cabe señalar que los grupos reactivos de los aminoácidos no naturales no están disponibles a partir de grupos funcionales presentes en los 20 aminoácidos canónicos. Por consiguiente, estos grupos reactivos pueden usarse para modificar sitios de polipéptidos de manera específica y homogénea.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye, pero no se limita a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se

unen y reconocen específicamente un analito (antígeno). Los ejemplos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de cadena sencilla, y similares. Como se usa en la presente también se incluyen en el término "anticuerpo" los fragmentos de inmunoglobulinas, incluyendo los fragmentos Fab y los fragmentos producidos por una biblioteca de expresión, incluyendo la presentación en fagos. Consultar, por ejemplo, Paul, *Fundamental Immunology*, 4ª ed., 1999, Raven Press, Nueva York, para la estructura y terminología de los anticuerpos. Fragmento de anticuerpo se refiere a cualquier forma de un anticuerpo distinta de la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos incluyen en la presente anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que se han manipulado. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras y regiones variables, y moléculas de andamiaje alternativas que no son anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y similares (Maynard & Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402). Otra subestructura funcional es un Fv de cadena sencilla (scFv), compuesto por las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina, conectadas covalentemente por un conector peptídico (S-z Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas proteínas pequeñas (Mr 25.000) conservan generalmente la especificidad y afinidad por el antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes, específicas de antígeno. A menos que se indique específicamente lo contrario, las afirmaciones y reivindicaciones que usan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a separar y extraer una célula o clon de una población celular homogénea o heterogénea. En realizaciones de la presente invención, el término aislado incluye una célula aislada o única que se ha obtenido a partir de un cultivo celular o población de células. Una célula o clon puede seleccionarse sobre otras poblaciones celulares o poblaciones clonales cultivando en un medio que proporcione alguna ventaja selectiva a la célula o clon de interés deseado. Por ejemplo, en un cultivo celular rutinario, puede enriquecerse un tipo celular concreto añadiendo factores de crecimiento y citoquinas específicos. Esto puede incluir enriquecer poblaciones de un determinado linaje y etapa de diferenciación para conseguir la célula o clon deseado, el uso de medios selectivos que permiten el crecimiento de células específicas e inhiben otras mediante antibióticos o inhibidores específicos del crecimiento, o una combinación de tales estrategias de selección bien conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, a menudo se usan medios selectivos para aislar células transfectadas. Los antibióticos comunes usados para la selección de células de mamíferos incluyen bleomicina, puromicina e higromicina, pero no se limitan a ellos. El término "aislado", como se usa en la presente, también se refiere a la separación y eliminación de un componente de interés de los componentes que no son de interés. Las sustancias aisladas pueden estar en estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo pero no limitado a una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede formar parte de una composición farmacéutica que comprenda portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse usando técnicas de química analítica que incluyen, entre otras, la electroforesis en gel de poliácridamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, cuando se aísla un componente de interés y es la especie predominante presente en una preparación, el componente se describe en la presente como sustancialmente purificado. El término "purificado", como se usa en la presente, puede referirse a un componente de interés que tiene una pureza de por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos el 99% o más. A modo de ejemplo solamente, los ácidos nucleicos, polipéptidos o proteínas están "aislados" cuando dichos ácidos nucleicos, polipéptidos o proteínas están libres de por lo menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en estado natural, o que el ácido nucleico, polipéptidos o proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción in vivo o in vitro. Además, a modo de ejemplo, un gen está aislado cuando está separado de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican un polipéptido o proteína distinta del gen de interés.

Como se usa en la presente, el término "eucariota" se refiere a organismos pertenecientes al dominio filogenético Eucarya, incluyendo pero no limitados a animales (incluyendo pero no limitándose mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo pero no limitados a monocotiledóneas, dicotiledóneas y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios y protistas. Los términos "vertebrado" y "eucariota" pueden usarse indistintamente en la presente.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan una línea celular de plataforma generada a partir de CHOK1 que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína en células CHO, en donde la células expresa un gen de interés que contiene un codón selector, en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt); y en donde la célula comprende uno o más sitios o regiones diana inactivados, en donde el uno o más sitios o regiones diana inactivados es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona de Bax y Bak (consultar, por ejemplo, Tian F, et al., 2014). Pueden generarse líneas celulares de producción para producir proteínas incorporadas de aminoácidos no naturales transfectando un codón ámbar sin sentido que contenga un gen de interés en el sistema de expresión GS (glutamina sintetasa) en el huésped de la línea celular de plataforma. El sistema de expresión GS usa la glutamina sintetasa como gen marcador seleccionable para la selección de la integración estable del gen del producto enlazado en el genoma de la célula huésped durante el desarrollo de la línea celular estable para

generar la línea celular de fabricación. La línea celular de plataforma ha sido bien caracterizada y desarrollada con una eficiencia mejorada de incorporación de aminoácidos no naturales y eficiencia de selección de clones. La línea celular de plataforma se preadaptó al crecimiento en suspensión para su rápida progresión en biorreactores.

Desde el punto de vista de la industria, la línea celular de plataforma puede usarse para proporcionar material apropiado para la etapa para apoyar cada etapa del desarrollo de fármacos, pero también para generar líneas celulares de producción estables y bien caracterizadas antes de la introducción del producto en las clínicas y su comercialización. Por lo tanto, en las empresas farmacéuticas, la línea celular y el grupo de cultivo celular participan estrechamente en actividades de funciones cruzadas. Por ejemplo, el equipo de descubrimiento identifica dianas y genera moléculas candidatas. La transfección transitoria y la generación de grupos estables en líneas celulares huésped de plataforma se llevan a cabo para evaluar la expresión de moléculas candidatas y proporcionar material para estudios de desarrollo (purificación, conjugación y desarrollo de métodos analíticos) y ensayos funcionales para identificar una molécula líder. Una vez seleccionada la molécula líder, se generan luego las líneas celulares estables para producir un producto de alto rendimiento con los atributos de calidad deseables. En la selección del clon principal intervienen la línea celular, el desarrollo del proceso y las funciones analíticas para identificar una línea celular de producción estable y bien caracterizada, escalable a la fabricación estándar de la industria para apoyar el ensayo clínico y la comercialización. El desarrollo de procesos de cultivo celular comienza con la generación y selección de líneas celulares, seguido de la optimización de procesos y medios en sistemas a pequeña escala, incluyendo placas de 96 pocillos, matraces agitados y biorreactores de sobremesa, con propósitos de selección de alto rendimiento. Una vez definidas las condiciones, el proceso se transfiere a mano a una escala piloto para probar la escalabilidad y producir material para estudios toxicológicos preclínicos, y después a la fabricación a gran escala para la producción de material clínico conforme a la normativa vigente sobre buenas prácticas de fabricación (cGMP). Una vez completado el desarrollo del proceso de cultivo celular comercial para la producción de un producto biológico a escala de laboratorio y piloto, comienza el proceso de comercialización con la caracterización del proceso, el escalado, la transferencia de tecnología y la validación del proceso de fabricación. La mayoría de estos métodos para el desarrollo de líneas celulares, el desarrollo y la fabricación de procesos de cultivo celular o alternativas de este tipo son bien conocidos en la técnica. Consultar, por ejemplo, Weishou Hu y otros, *Cell Culture Process Engineering* (2013).

En la presente invención, se ha implementado una estrategia de desarrollo de líneas celulares estables para obtener líneas celulares de producción con 5-10 PCD en 3-4 meses y 20-30 PCD en 6 meses usando la línea celular de plataforma como células originales. Consultar también los Ejemplos del presente documento. Las líneas celulares de producción superaron el estudio de estabilidad durante por lo menos 8 semanas permitiendo una escala de fabricación de biorreactores de hasta 12.000 l. Se eligió un clon usado para el banco celular maestro (MCB) basándose en el crecimiento, la productividad y la calidad del producto. La manipulación adicional de las líneas celulares usando la tecnología de edición del genoma CRISPR/Cas9 en la línea celular de producción que produce 0,5 g/l o 500 mg/l demostró mejorar el crecimiento celular y aumentar el título volumétrico hasta 1,5 g/l o 1500 mg/l. Un proceso de alimentación por lotes desarrollado para la línea celular de producción demostró escalabilidad a escala de biorreactor de un solo uso (SUB) de 2000 l para la preparación de material clínico. Por tanto, en otras realizaciones, la presente invención proporciona la optimización del desarrollo de líneas celulares de alta producción. Dicha optimización del desarrollo de líneas celulares de alta producción puede lograrse mediante métodos y técnicas bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados al depósito de células individuales dependiente de FACS, el procedimiento de desactivación de CRISPR y el escalado de producción.

Metodología y técnicas

La presente invención emplea una serie de técnicas convencionales de biología molecular, cultivo celular, bioquímica y similares, bien conocidas en la técnica. Los métodos y técnicas para el desarrollo de líneas celulares, el desarrollo y la fabricación de procesos de cultivo celular están bien descritos, por ejemplo, en Weishou Hu et al., *Cell Culture Process Engineering* (2013). Los textos generales que describen técnicas de biología molecular incluyen Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") y *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementado hasta 1999) ("Ausubel"). Estos textos describen el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados, por ejemplo, con la generación de genes que incluyen codones selectores para la producción de proteínas que incluyen aminoácidos no naturales, ARNt ortogonales, sintetasas ortogonales y pares de las mismas.

Otros procedimientos pueden encontrarse en las siguientes publicaciones y las referencias citadas en las mismas: Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, *In vitro mutagenesis*, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462(1985); Botstein & Shortie, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, *Science* 229:1193-1201(1985); Carter, *Site-directed mutagenesis*, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific*

mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, *Science* 242:240-245 (1988); *Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor et al., *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., *Point Mismatch Repair*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al., *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakamar and Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundström et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001). W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); and, I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995). Detalles adicionales sobre muchos de los métodos anteriores pueden encontrarse en *Methods in Enzymology Volumen 154*, que también describe controles útiles para solucionar problemas con varios métodos de mutagénesis.

En esa técnica se conocen una variedad de técnicas y metodologías para la purificación y detección de polipéptidos y proteínas. Estas técnicas y metodologías pueden aplicarse a la detección y purificación de proteínas que comprenden aminoácidos no naturales como se indica en la presente. En general, los anticuerpos son reactivos útiles para ELISA, transferencia western, inmunquímica, métodos de cromatografía de afinidad, resonancia de plasmones superficiales (SPR), Anexina V, FACS y muchos otros métodos. Las referencias de la presente proporcionan detalles sobre cómo realizar ensayos ELISA, transferencias western, SPR y similares. Otras técnicas y metodologías de la invención pueden incluir la espectrometría de masas (MS) intacta y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La espectrometría de masas intacta proporciona información sobre la masa exacta de la proteína y la abundancia relativa de sus isoformas. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), también conocida en la técnica como cromatografía de tamiz molecular, es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan por su tamaño y, en algunos casos, por su peso molecular.

Tecnología de edición del genoma

Como se usan en la presente, los términos "diana", "diana para", "dirigido" o "dirigido para" desactivación, ablación, inactivación o interrupción se refieren a un sitio o región en una célula o gen que se extirpa, inactiva, interrumpe o desactiva. Pueden usarse varias herramientas de edición de genes para modificar con precisión un gen mediante la inducción de roturas de cadena doble (DSB) en el ADN. Tales herramientas de edición de genes, bien conocidas en la técnica, pueden incluir, pero no se limitan a, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) y meganucleasas (MN) también conocidas en la técnica como endonucleasas homing (HE) (Gaj et al, 2013; Guha et al, 2017), y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparciadas (CRISPR). Pueden usarse herramientas de edición de genes para diseñar constructos que reconozcan sitios o regiones diana en una célula que exprese un gen de interés o una célula de producción y hacer roturas de cadena doble en el gen diana después de la transfección.

Las ZFN son proteínas de fusión artificiales de un dominio de unión al ADN de un dedo de zinc y un dominio

de escisión del ADN no específico de la endonucleasa de restricción FokI. El dominio de dedos de zin cpuede manipularse para que sea capaz de reconocer secuencias de ADN específicas, de tal manera que pueda lograrse la edición de genes. Los TALEN también son proteínas de fusión artificiales que consisten en un dominio de unión al ADN de las proteínas TALE y un dominio no específico de escisión del ADN de la endonucleasa de restricción FokI.

Los TALE (Efectores similares al Activador de la Transcripción) son proteínas de la bacteria *Xanthomonas* y su dominio de unión al ADN puede manipularse para que se una a secuencias de ADN específicas. De manera similar a las ZFN, los TALEN pueden inducir DSB de tal manera que puede lograrse la inactivación de los genes. Las MN, también conocidas en la técnica como endonucleasas homing, son endonucleasas altamente específicas del sitio para generar ADN de cadena doble. Las MN tienen un sitio grande de reconocimiento específico que puede reconocer 18-44 pares de bases de ADN. Entre los miembros de la familia de las MN, LAGLIDADG es la más ampliamente investigada y manipulada en aplicaciones de edición genómica. La tecnología de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespariadas agrupadas (CRISPR) es una tecnología reciente de edición genómica que usa nucleasas guiadas por ARN (Cas9 es la nucleasa de tipo II más usada) para formar roturas de cadena doble (DSB) en el ADN. Durante el proceso de autoreparación de las DSB en la célula, a menudo se producen delecciones e inserciones de nucleótidos que dan como resultado el desplazamiento de las secuencias genómicas correspondientes de la región codificante de las proteínas diana y, finalmente, su pérdida de función. Aunque el CRISPR se descubrió inicialmente como un sistema inmunitario de las células procariotas en la defensa contra la invasión vírica, su aplicación en células eucariotas como una herramienta de edición del genoma se ha desarrollado con éxito (Consultar, por ejemplo, Cong, et al, 2013; Hsu, et al, 2014; Jinek, et al., 2012; Ran, et al., 2013). En comparación con otras tecnologías de edición del genoma, como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN), y las meganucleasas (MN) que usan dominios específicos de unión al ADN para inducir la formación de DSB (por ejemplo, USPN 8,597,912), la tecnología CRISPR cataliza la rotura del ADN con la ayuda de ARN guiados (ARNg) que usan el emparejamiento de bases Watson-Crick con secuencias de ADN específicas.

Aunque con la presente invención puede usarse cualquiera de las herramientas de edición de genes descritas en la presente, se ejemplifica la tecnología CRISPR, ya que proporciona una tecnología más eficiente y altamente específica que puede aplicarse en una variedad de células y organismos (Hsu, et al, 2014). Como se ejemplifica en los Ejemplos de la presente, los sitios o regiones de direccionamiento de ARNg para desactivación, ablación, inactivación o interrupción en una célula que expresa un gen de interés pueden diseñarse usando una herramienta de diseño de ARNg de CRISPR en línea específica para el genoma CHO-K1 (consultar en la world wide web en staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy/). En la Tabla 1 siguiente se proporcionan ejemplos de sitios o regiones diana que pueden ser desactivados, extirpados inactivados o interrumpidos en una célula.

Tabla 1. Secuencias de ARNg usadas en constructos CRISPR

SEQ ID NO.	Nombre del gen	Secuencia de ARNg	Locus genómico
1	Sitio I de BAX	AGGCACTCGCTCAACTTCT	Exón 2
2	Sitio BAX-II	TGAGTGTGACCGGCTGTTG	Exón 1
3	Sitio BAX-III	TTTCATCCAGTATCGAGCT	Exón 2
4	BAK-I	GAACAAATTGTCCATCTCG	Exón 2
5	BAK-II	ATGCTGTAAGAACGGGAGT	Exón 3
6	BAK-III	GAAGCCGGTCAAACCACGT	Exón 3
7	UPF1-I	TCATGGATTGGCCAGTAAC	Exón 3
8	UPF1-II	CCACTGGGCGAGACGGTGC	Exón 4
9	UPF1-III	GAAGCACCGGTCCTGGATC	Exón 5
10	Smg1-I	AGCTCTGTAGGTGGCGCAC	Exón 6
11	Smg1-II	TGACATATGCCTCGGTAAT	Exón 10
12	Sing1 -III	TAATCGGTGGACCCCGAAT	Exón 10
13	GS-I	AACAGGAGTATACTCTTTG	Exón 1
14	GS-II	CGCCAGACAAAGCCTATCGCA	Exón 1
15	GS-III	AGCCTACGATCCCAAGGGGG	Exón 1
16	isoGS-I	GCCTCCTCGATGTGCCTGG	Exón 1
17	isoGS-II	CATTGTCCAGGTCCCCCTT	Exón 1
18	isoGS-III	ACAATGCCCGTCGTCTGAC	Exón 2
19	Zeocin-I	TGACCCTGTTTCATCAGCGC	Exón 1
20	Zeocin-II	TCAGCGCGGTCCAGGACCA	Exón 1
21	Zeocin-III	TCCAGGACCAGGTGGTGCC	Exón 1
22	Higromicina-I	TCGATGAGCTGATGCTTTG	Exón 1
23	Higromicina-II	AGCTGATGCTTTGGGCCGA	Exón 1
24	Higromicina-III	GAGGACTGCCCGGAAGTCC	Exón 1
25	Puromicina-I	GGCGGTGTTCCCGAGATC	Exón 1

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre del gen	Secuencia de ARNg	Locus genómico
26	Puromicina-II	CCGAGATCGGCCCCGCGCAT	Exón 1
27	Puromicina-III	GCGCATGGCCGAGTTGAGC	Exón 1
28	IGFBP4-I	CAGGGCCTCGGCCGAGCCT	Exón 1
29	IGFBP4-II	CCCGCTGCCGCCCTGT	Exón 1
30	IGFBP4-III	GGCTTGGGGATGCCCTGCG	Exón 1
31	AQP1 -I	TACATCATCGCCCAGTGTG	Exón 1
32	AQP1 -II	AGCTTCTTCTTGAATTCGC	Exón 1
33	AQP1-III	ATGAAGACGAAGGGTCA	Exón 1
34	Maf1-1	AGATGCCCATTATTATTGGC	Exón 1
35	Maf1-2	ATCTGGACTCAGACCCCTT	Exón 5
36	Maf1-3	GCAGGCAATGCATTGGACT	Exón 6
37	eRF1-1	CTCTTTTTGGCACGCTCCA	Exón 3
38	eRF1-2	ATCCACAGTGAATTTGTGC	Exón 3
39	eRF1-3	CGTTTTGCCCGTTTAAGAA	Exón 4
40	FUT8-I	GCAGATATGTTATTCTCCGC	Exón 4
41	FUT8-II	GATCCGTCCACAACCTTGGC	Exón 4
42	FUT8-III	GATAAACTGCAATCTGGTTG	Exón 9

- 25 Pueden sintetizarse y usarse oligonucleótidos para amplificar el locus de ADN genómico de los ARNg divulgados en la Tabla anterior, como se representa en la Tabla 2 a continuación. Estas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Consultar, por ejemplo, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas.

Tabla 2. secuencias de oligo usadas para amplificar locus de ADN genómico

SEQ ID NO.	Nombre del gen	Secuencia de oligo	ID de oligo
43	BAX	AGGGTTATGAGCCTCCCTAG	X-F
44	BAX	GGCTACCATGTAAAGAGACC	X-R
45	BAK	CAGACAGCCTTCTTGCT	K-I-II-F
46	BAK	AGAGCTCCTGAGGCATGA	K-I-II-R
47	BAK	TTTCACGCTGTGACACCCA	K-III-F
48	BAK	CAGAACCACCAAGAATTG	K-III-R
49	UPF1	TGTTTAGGACCTTCGGTTTC	U-I-F
50	UPF1	ATGTCAAGGGCACTATAGAC	U-I-R
51	UPF1	CCCAACGCAAGAGACCTTC	U-II-III-F
52	UPF1	AGAGTGAACCTCAGCGCACG	U-II-III-R
53	Smg1	AGTGAAAGAGAGGAGAGG	S-I-F
54	Smg1	GATGAAGTGAAGTTGCTCTACC	S-I-R
55	Smg1	CTACGCAAGGCACGAGGTTTC	S-II-III-F
56	Smg1	ATAAGCCTGCTACTCCAG	S-II-III-R
57	GS	CACTTGAACAAAGGCATCAAG	G-F
58	GS	TCTCATTGAGAAGGCATGTGC	G-R
59	isoGS	GGGAATTCCAAATAGGACCC	isoG-F
60	isoGS	CTGCTCGGGAAGGTTATGTT	isoG-R
61	Zeocin	ATGGCCAAGTTGACCAAGTGCC	Z-F
62	Zeocin	TCAGTCCTGCTCCTCGGCCAC	Z-R
63	Higromicina	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC	H-F
64	Higromicina	TCATTCTCTGCCCTCGGACG	H-R
65	Puromicina	ATGACCGAGTACAAGCCCACG	P-F
66	Puromicina	AGTCCGTGGCCCGAACGCCCA	P-R
67	IGFBP4	GGCAGCGCTCAGCCCCCTGC	I-F
68	IGFBP4	TCAGTGCCAGTTTTCTTGGCT	I-R
69	AQP1	GCTGAGGGGGCAGCAAGCTGC	A-F
70	AQP1	CTGCCCAGCCCCGAGGAGGCAG	A-R

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre del gen	Secuencia de oligo	ID de oligo
71	Maf1	ATGAAGCTACTCGAGAACTCC	M-I-F
72	Maf1	TTTCATCCTCACCACCCTGGC	M-I-R
73	Maf1	CAGGTGGGCTCACATCTTTGC	M-II-III-F
74	Maf1	TCACATACAGATCACTGGAAC	M-II-III-R
75	eRF1	TCATACTGTGTTGAGTGGGAC	RF-F
76	eRF1	CCACACTAGAGCCCACAAC	RF-R
77	FUT8	ATGCCATCATATATCGTGAGCATC	FUT-I-F
78	FUT8	AAACAAGCTTGTTCCCTAACTAG	FUT-I-R
79	FUT8	AGGAGTGTAGTGTAGTGATGAT	FUT-II-F
80	FUT8	ATTTGCTCTGCTGCCCTAACT	FUT-II-R
81	FUT8	TGACAGCAATGGACTGTTCTC	FUT-III-F
82	FUT8	CAGCTTCAGGATATGTAGGGTA	FUT-III-R

Dianas de la edición genética

El término diana para gen de desactivación dirigida, gen extirpado diana o dirigido, gen inactivado diana o dirigido, gen interrumpido diana o dirigido, como se usa en la presente, se refiere a un gen que es el objetivo para desactivación, ablación o inactivación mediante edición génica. En la invención, el sitio o región diana u dirigido está implicado en las vías apoptóticas. La diana para desactivación, interrupción, ablación o inactivación es BAX y/o BAK. En otras realizaciones, el gen de desactivación, interrupción, ablación o inactivación dirigidas está total o parcialmente desactivado, extirpado o inactivado. Un gen parcialmente inactivado, interrumpido, desactivado o extirpado puede incluir un gen que está un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, inactivado, interrumpido, desactivado o extirpado.

Genes bioterapéuticos

Un gen de interés puede expresarse en una línea celular de plataforma. Tales genes de interés pueden ser un bioterapéutico incluyendo, pero no limitado a, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, interferones, interleucinas, otros péptidos reguladores y proteínas y anticuerpos. Los bioterapéuticos pueden incluir cualquier producto biológico procedente de bacterias, levaduras, hongos o células manipuladas genéticamente. Los bioterapéuticos incluyen ADN, ARN, ADN recombinante, proteínas, polipéptidos. En algunas realizaciones el bioterapéutico es una vacuna, la vacuna obtenida mediante cualquier método o célula de la invención.

En ciertas realizaciones, las células o líneas celulares de plataforma expresan un gen de interés que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, Alfa-1 antitripsina, Angiostatina, Factor antihemolítico, anticuerpos, Apolipoproteína, Apoproteína, Factor natriurético auricular, Polipéptido natriurético auricular, péptidos auriculares, calcitonina, ligando CD40, ligando C-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor 5a del complemento, inhibidor del complemento, receptor 1 del complemento, citoquinas, (por ejemplo, péptido activador de neutrófilos epiteliales-78, GRO α /MGSA, GRO β , GRO γ , MIP-1 α , MIP-1 δ , MCP-1), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina ("EPO"), toxinas exfoliantes A y B, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Fibrinógeno, Fibronectina, G-CSF, GM-CSF, CD116, M-CSF, CSF-1R, Glucocerebrosidasa, Gonadotropina, factores de crecimiento, Proteínas Hedgehog (por ejemplo, Sonic, Indian, Desert), Hemoglobina, Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), Hirudina, Albúmina sérica humana, Insulina, Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), Interferones (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Lactoferrina, factor inhibidor de la leucemia, Luciferasa, Neurturina, Factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, Proteína osteogénica, Hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, Hormonas peptídicas (por ejemplo Hormona del crecimiento humano), pleiotropina, proteína A, proteína G, exotoxinas pirogénicas A, B y C, relaxina, renina, SCF, receptor soluble del complemento I, I-CAM 1 soluble, Receptores solubles de interleucina (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), receptor soluble de TNF, Somatomedina, Somatostatina, Somatotropina, Estreptoquinasa, Superantígenos, es decir, enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), superóxido dismutasa (SOD), toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1), timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, TGF beta y MIF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa y similares.

En otras realizaciones, el gen de interés puede incluir interleucinas como, pero no limitadas a, IL-1 y CD121a, IL-2 y CD25/CD122/CD137, IL-3 y CD123, IL-4 y CD124, IL-5 y CD125, IL-6 y CD126, IL-7 y CD127/CD132, IL-9 y IL-9R, IL-10 y CRF2-4, IL-11 y IL-11R, IL-12 y IL-12R β 1c/IL-12R β 2, IL-13 y IL-13R, IL-15 y CD122/CD132, IL-16 y CD4,

IL-17 y CD217, IL-18 y IL-1Rrp, IL-19 y IL-20R α /IL-10R β c, IL-21 y IL-21R/CD132, IL-22 y IL-22R α /IL-10R β c, IL-23 y IL-23R, IL-24 y IL-22R α /IL-10R β c, IL-25 y IL-17BR, IL-26 y IL-20R α /IL-10R β c, IL-27 y WSX-1/CD130c, IL-28 y IL-28R α /IL-10R β c, IL-29 y IL-28R α /IL-10R β c, IL-30 y WSX-1/CD130c, IL-31 y IL31A/OSMR, IL-32, IL-33 y ST2/IL1RAP, IL-34 y CSF-1R, IL-35 y IL-12RB2, IL-36 y IL-1Rrp2, IL-37 y IL-18R α , TSLP y TSLPR, LIF y LIFR, OSM y OSMR y similares.

En algunos aspectos de la invención un gen de interés puede incluir factor de necrosis tumoral TNF) incluyendo, pero no limitado a, factor de necrosis tumoral beta (TNF beta), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y p55/p75, LT- α y p55/p75, LT- β y p55/p75, CD40L y CD40, FasL y CD95, CD27L y CD27, CD30L y CD30, 4-1BBL y 4-1BB, Trail y DR4, RANK-L y RANK, APRIL y TAC1, LIGHT y HVEM, TWEAK y TWEAKR, BAFF y TAC1, y similares.

El gen de interés puede incluir quimiocinas C-X-C (por ejemplo, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), incluyendo CXCL1 y CXCR2, CXCL2 y CXCR2, CXCL3 y CXCR2, CXCL4 y CXCR3B, CXCL5 y CXCR2, CXCL6 y CXCR2, CXCL7 y CXCR1/CXCR2, CXCL8 y CXCR1/CXCR2, CXCL9 y CXCR3A/3B, CXCL10 y CXCR3A/3B, CXCL11 y CXCR3A/3B/CXCR7, CXCL12 y CXCR4/CXCR7, CXCL13 y CXCR5, CXCL14, CXCL15, CXCL16 y CXCR6 y similares. El gen de interés también puede incluir quimiocinas CC (por ejemplo, proteína quimioatrayente de monocitos 1, proteína quimioatrayente de monocitos 2, proteína quimioatrayente de monocitos 3, proteína inflamatoria de monocitos 1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos 1 beta, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), incluidos CCL1 y CCR6, CCL2 y CCR2, CCL3 y CCR1/5, CCL4 y CCR5, CCL5 y CCR1/CCR3, CCR5, CCL6 y CCR1, CCL7 y CCR1/CCR2/CCR3/CCR5, CCL8 y CCR1/CCR2/CCR5, CCL9 y CCR1, CCL11 y CCR3, CCL12 y CCR2, CCL13 y CCR2/3, CCL14 y CCR1/3/5, CCL15 y CCR1/3, CCL16 y CCR1/2/5/8, CCL17 y CCR4, CCL18 y PITPNM3, CCL19 y CCR7, CCL20 y CCR6, CCL21 y CCR7, CCL22 y CCR4, CCL23 y CCR1/FPRL-1, CCL24 y CCR3, CCL25 y CCR9, CCL26 y CCR3, CCL27 y CCR10, CCL28 y CCR10, e incluyendo XCL1 y XCR1, XCL2 y XCR1, CX3CL1 y CX3CR1 y similares.

Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritos en la presente no se limitan a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. De hecho, prácticamente cualquier polipéptido puede diseñarse o modificarse para que incluya por lo menos un aminoácido no natural "modificado o no modificado" descrito en la presente. A modo de ejemplo solamente, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína bioterapéutica o terapéutica descrita en la presente. Los polipéptidos o proteínas con por lo menos un aminoácido no natural pueden producirse usando las composiciones y métodos de la invención. También puede estar presente con la proteína un excipiente (por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable).

Al producir proteínas o polipéptidos de interés con por lo menos un aminoácido no natural incorporado en células de vertebrado, las proteínas o polipéptidos incluirán típicamente modificaciones postraduccionales de vertebrados. En ciertas realizaciones, una proteína incluye por lo menos un aminoácido no natural y por lo menos una modificación postraduccional que es realizada in vivo por una célula de vertebrado, donde la modificación postraduccional no es realizada por una célula procariota. Por ejemplo, la modificación postraduccional incluye, por ejemplo, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace glicolipídico, glicosilación y similares.

El gen de interés puede incluir una proteína o polipéptido terapéutico, genes implicados en el crecimiento celular, diferenciación, regulación, inflamación, oncogenes y similares, pero sin limitarse a los mismos. En otras realizaciones, la invención incluye un gen de anticuerpo que contiene un codón selector. En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo de interés, incluyendo pero no limitado a un anti-Her2, anti CD-70, anti-PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, Interleuquinas (incluyendo 2, 3, 10 pero no limitado a tales), GPC3, DLL3, ROR1, leptina, la familia FGF incluyendo FGF-21 y FGF-23, HGH, FcR, insulina, TNFR1, TRAIL, eritropoyetina, y análogos, biespecíficos y fragmentos de los mismos y similares, pero no limitados a los mismos. En algunas realizaciones, la invención incluye un gen de anticuerpo que contiene un codón selector. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, o similares. Los anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, MAbs específicos de tumor que detienen el crecimiento tumoral dirigiéndose a las células tumorales para su destrucción por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) o lisis mediada por complemento (CML) (estos tipos generales de Abs se denominan a veces "balas mágicas"). Un ejemplo es Rituxan, un MAb anti-CD20 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin (Scott (1998) *Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma* Cancer Pract 6: 195-7); Anticuerpos que interfieren con un componente crítico del crecimiento tumoral. El Herceptin es un anticuerpo monoclonal anti-HER-2 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, y constituye un ejemplo de anticuerpo con este mecanismo de acción (Baselga et al. (1998) *Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts* [errata publicada aparece en Cancer Res (1999) 59(8):2020], Cancer Res 58: 2825-31). Otro ejemplo se refiere a anticuerpos para la administración de compuestos citotóxicos (toxinas, radionucleidos, etc.) directamente a un tumor u otro sitio de interés. Por ejemplo, un Mab de aplicación es CYT-356, un anticuerpo enlazado a 90Y que dirige la radiación directamente a las células tumorales de próstata (Deb et al. (1996) *Treatment of hormone-refractory prostate cancer with 90Y-CYT-356 monoclonal antibody*

Clin Cancer Res 2: 1289-97). Otros ejemplos pueden incluir la terapia con profármacos enzimáticos dirigida por anticuerpos, en la que una enzima colocalizada en un tumor activa un profármaco administrado sistémicamente en las cercanías del tumor. Por ejemplo, se está desarrollando un anticuerpo anti-Ep-CAM1 enlazado a la carboxipeptidasa A para el tratamiento del cáncer colorrectal (Wolfe et al. (1999) *Antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1: in vitro and in vivo studies with prodrugs of methotrexate and the thymidylate synthase inhibitors GW1031 and GW1843* Bioconjug Chem 10: 38-48). Pueden incluirse otros anticuerpos (por ejemplo, antagonistas) diseñados para inhibir específicamente las funciones celulares normales para beneficios terapéuticos. Un ejemplo es Orthoclone OKT3, un MAb anti-CD3 ofrecido por Johnson and Johnson para reducir el rechazo agudo de trasplantes de órganos (Strate et al. (1990) *Orthoclone OKT3 as first-line therapy in acute renal allograft rejection* Transplant Proc 22: 219-20). Otra clase de anticuerpos pueden incluir los que son agonistas. Estos Mab están diseñados para potenciar específicamente las funciones celulares normales para beneficio terapéutico. Por ejemplo, se están desarrollando agonistas de receptores de acetilcolina basados en Mab para neuroterapia (Xie et al. (1997) *Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv* Nat. Biotechnol. 15: 768-71. Cualquiera de estos anticuerpos puede modificarse para que incluya uno o más aminoácidos no naturales para mejorar una o más propiedades terapéuticas (especificidad, avidez, vida media en suero, etc.). Otro ejemplo pueden ser los anticuerpos catalíticos, como las secuencias de Ig que se han diseñado para imitar las capacidades catalíticas de las enzimas (Wentworth y Janda (1998) *Catalytic antibodies* Curr Opin Chem Biol 2: 138-44). Los anticuerpos catalíticos también pueden modificarse para que incluyan uno o más aminoácidos no naturales para mejorar una o más propiedades de interés.

Los codones selectores expanden el marco genético de codones de la maquinaria biosintética de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, por ejemplo, un codón único de tres bases, un codón sin sentido, como un codón de parada, por ejemplo, un codón ámbar (UAG), un codón ópalo (UGA), un codón no natural, por lo menos un codón de cuatro bases, un codón raro, o similares. En un gen deseado puede introducirse un número de codones selectores, por ejemplo, uno o más, dos o más, más de tres, etc. Un gen puede incluir múltiples copias de un codón selector dado, o puede incluir múltiples codones selectores diferentes, o cualquier combinación de los mismos. Los métodos de la invención implican el uso de un gen que contiene un codón selector o gen de interés. En una realización, los métodos de la invención implican el uso de un anticuerpo que contiene un codón selector en donde el codón selector puede estar en la cadena pesada, en la cadena ligera o en ambas. Por tanto, un codón selector incluye un codón de parada para la incorporación de aminoácidos no naturales in vivo en una célula eucariota.

Células de producción

En algunas realizaciones, la invención proporciona células, líneas celulares de producción y clones generados a partir de ellas que expresan un gen de interés. Dichas células o líneas celulares de producción incluyen, pero no se limitan a, poblaciones celulares transfectadas transitoriamente, poblaciones celulares masivas estables (por ejemplo, mezclas o grupos de células), poblaciones minicelulares estables (por ejemplo, miniagrupaciones o poblaciones de pocillos maestros) y líneas celulares clonales estables (por ejemplo, derivadas de una única célula). Las poblaciones celulares transfectadas transitoriamente usadas en la presente se refieren a un grupo de células en las que se introduce un gen de interés y que pueden no estar integradas de forma estable en el genoma. Célula estable o línea celular de producción estable se refiere a una célula en la que se introduce un gen de interés y se integra de forma estable en el genoma. Una población de minicélulas estables puede tener menos heterogeneidad que una población de células masivas estables.

Con un estímulo apropiado, Bax y/o Bak pueden inducir o acelerar la apoptosis. La familia de proteínas Bcl-2 comparte una importante homología estructural y de secuencia. Esta familia de proteínas se caracteriza por tener hasta cuatro regiones de homología de secuencia, conocidas como dominios de homología Bcl-2. Por ejemplo, la proteína Bax comparte dominios altamente conservados con Bcl-2. Algunos de estos dominios están implicados en la formación del heterodímero Bax/Bcl-2, que se considera importante para la supervivencia celular o la muerte celular en respuesta a señales apoptóticas. Tras su activación, Bax se transloca a la membrana mitocondrial externa, donde se oligomeriza, hace permeable la membrana y libera varios factores promotores de la muerte, como el citocromo C (Scorrano et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:437-444). Bax puede volverse inactivo en células normales mediante la interacción con la proteína Ku70, que secuestra a Bax de las mitocondrias (Sawada et al. (2003) *Nat. Cell Biol.* 5:320-329). Al igual que Bax, el producto génico Bak potencia la muerte celular apoptótica en presencia de un estímulo adecuado. Bak también promueve la muerte celular y contrarresta la protección apoptótica de Bcl-2. El Bak es un potente inductor de apoptosis conocido en varios tipos celulares. Por tanto, la invención, proporciona métodos para la generación de líneas celulares productoras con inactivación parcial o completa de uno o más de un gen BAX y/o un gen BAX en una célula o línea celular que expresa un gen de interés y un aminoácido no natural incorporado. La inactivación de BAX y/o BAK en una célula que expresa un gen de interés puede usarse para generar líneas celulares que sean resistentes a la apoptosis y mejorar la producción de proteínas recombinantes incluyendo, pero no limitadas a, por ejemplo, anticuerpos, vectores virales recombinantes y en la fabricación de vacunas.

Las líneas celulares de la presente invención pueden utilizarse para la producción de proteínas recombinantes. La proteína recombinante incluye, pero no se limita a, anticuerpos, antígenos, proteínas terapéuticas como se divulga en otra parte de la presente. En algunas realizaciones, la invención implica células o líneas celulares

eucariotas o de vertebrado, incluyendo pero no limitadas a mamíferos, insectos, reptiles, aves y similares o ciliados, plantas (incluyendo pero no limitadas a monocotiledóneas, dicotiledóneas y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios y protistas. Las células eucariotas pueden usarse para la incorporación in vivo de un aminoácido no natural. Las células pueden usarse para la manipulación genética (por ejemplo, transformadas, transducidas o transfectadas) con los polinucleótidos o constructos que incluyen un polinucleótido, por ejemplo, un vector, que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos mediante métodos estándar, incluyendo la electroporación (From et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985), infección por vectores virales, penetración balística de alta velocidad por partículas pequeñas con el ácido nucleico o dentro de la matriz de perlas pequeñas o partículas, o en la superficie (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)).

Existen varios métodos bien conocidos para introducir ácidos nucleicos en las células, cualquiera de los cuales puede usarse en la invención. Estos incluyen: la fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contengan el ADN, la electroporación, el bombardeo con proyectiles y la infección con vectores virales (que se analizan adicionalmente a continuación), etc. Para amplificar el número de plásmidos que contienen constructos divulgados en la presente pueden usarse células bacterianas. Las bacterias se cultivan hasta la fase logarítmica y los plásmidos dentro de las bacterias pueden aislarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (consultar, por ejemplo, Sambrook). Además, hay una plétora de kits disponibles comercialmente para la purificación de plásmidos de bacterias (consultar, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™, de Stratagene; y QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan posteriormente para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan a vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, y promotores útiles para la regular de la expresión del ácido nucleico concreto de interés. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen por lo menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas, procariotas o ambos (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas procariotas y vertebrados. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas, o preferiblemente ambos. Consultar, Giliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et al., Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., et al., Protein Expr. Purif. 6:435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos supra). El ATCC proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para la clonación, por ejemplo, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds) publicado por el ATCC. También pueden encontrarse procedimientos básicos adicionales para la secuenciación, clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes en Watson et al. (1992) Recombinant DNA Segunda Edición Scientific American Books, NY. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y virtualmente cualquier ácido nucleico marcado, ya sea estándar o no estándar) puede pedirse a medida o estándar a cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX mrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA disponible en la World Wide Web en genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL disponible en la World Wide Web en expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras.

Las células o líneas celulares de la invención pueden cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para actividades como, por ejemplo, pasos de selección, activación de promotores o selección de transformantes. Estas células pueden cultivarse opcionalmente en organismos transgénicos. Otras referencias útiles, por ejemplo, para el aislamiento y cultivo de células (por ejemplo, para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en el mismo, Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

El medio o medios convencionales, como se usan en la presente, se refieren a cualquier medio de cultivo usado para cultivar y cosechar células y/o productos expresados y/o secretados por dichas células. Dicho "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, solución, soportes sólidos, semisólidos o rígidos que pueden soportar o contener cualquier célula huésped, incluyendo, a modo de ejemplo, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células huésped vegetales, células huésped eucariotas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procariotas, células huésped de E. coli o Pseudomonas, y contenidos celulares. Dicho "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, el medio o los medios en los que se ha cultivado la célula huésped en la que se ha secretado un polipéptido, incluyendo el medio antes o después de un paso de proliferación. Dicho "medio" o "medios" también incluyen, pero no se limitan a, tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, a modo de ejemplo, un polipéptido producido intracelularmente y las células huésped se lisan o alteran para liberar el polipéptido. En otras realizaciones de la presente invención, el medio puede ser un medio de cultivo celular completo, un medio de cultivo celular tradicional o un medio químicamente definido. Un medio de cultivo celular completo tiene a menudo dos categorías principales de componentes: medio basal y suplementos de crecimiento. El medio basal es la mezcla de nutrientes que consiste en los componentes de pequeño peso molecular que incluyen azúcar, aminoácidos, vitaminas, varias sales, etc. El medio basal no sólo proporciona una fuente

nutricional para obtener energía y fabricar nueva masa y producto celular, sino que también proporciona concentraciones equilibradas de sales y osmolaridad para permitir el crecimiento celular. Sin embargo, la mayoría de las células no crecerán si sólo se les proporciona medio basal, ya que éste no contiene factores de crecimiento ni otros factores necesarios para unas condiciones de crecimiento "óptimas". Los suplementos de crecimiento que pueden añadirse al medio basal incluyen factores de crecimiento, fosfolípidos, hidrolizado de soja, suero, etc. Estos suplementos pueden promover el crecimiento celular proporcionando componentes constituyentes para vías de señalización específicas o pueden suplir necesidades nutricionales especiales (como aportar colesterol) y pueden dirigir la diferenciación celular. El medio de cultivo celular tradicional contiene hasta un 15% de suero animal además del medio basal. El suero es un fluido muy complejo en cuanto a su composición química. Tal medio, que contiene una composición química en gran medida indefinida, se denomina medio complejo. Muchos suplementos usados comúnmente en los procesos industriales, como los hidrolizados vegetales o los fosfolípidos de soja, también entran en esta categoría. Su uso hace que la composición química del medio sea indefinida. Un medio químicamente definido contiene sólo componentes cuya composición química es conocida y caracterizada y tiene todas sus especies químicas especificadas. No contiene ninguna mezcla de componentes de composición desconocida o indefinida. Por ejemplo, "lípidos" o "fosfolípidos" no son compuestos bien definidos, sino mezclas de suero animal y no están químicamente especificados. Un medio químicamente definido a menudo contiene factores de crecimiento, citoquinas y proteínas portadoras. Por tanto, un medio químicamente definido no está necesariamente libre de proteínas.

En las realizaciones de la presente invención se utilizan la producción por lotes y la producción por lotes alimentados. Los métodos estándar para la producción por lotes y por lotes alimentados son bien conocidos en la técnica. En un proceso por lotes, la restricción de la osmolaridad limita la cantidad de nutrientes que pueden añadirse inicialmente. Este bajo nivel de nutrientes impide que el cultivo alcance concentraciones altas de células y productos. En los cultivos por lotes alimentados, se añade medio durante el cultivo para evitar el agotamiento de nutrientes, prolongando así la fase de crecimiento y, en última instancia, aumentando las concentraciones de células y productos. En las instalaciones de producción actuales se utilizan una variedad de operaciones por lotes alimentados, que varían desde las más sencillas hasta las más complejas y altamente automatizadas. Los medios usados tanto en lotes como en lotes alimentados pueden estar disponibles comercialmente o ser medios propios desarrollados internamente. El tipo de medio puede ser un medio complejo que contenga una composición química en gran parte indefinida, o un medio químicamente definido que comprenda componentes que tengan una composición o composiciones químicas conocidas y caracterizadas y que tengan todas sus especies químicas especificadas. En algunas realizaciones, el medio químicamente definido comprende sólo componentes cuya composición química es conocida y está caracterizada y tiene todas sus especies químicas especificadas. En otras realizaciones, el tipo de medio utilizado puede ser una mezcla que contenga composición química indefinida y composición químicamente definida. En otra realización, la composición química indefinida y la composición químicamente definida pueden estar en una combinación del 99%-90% y del 1%-10% respectivamente, o del 89%-80% y del 11%-20% respectivamente, o del 79%-70% y del 21%-30% respectivamente, o del 69%-60% y del 31%-40% respectivamente, o del 59%-50% y del 41%-50% respectivamente; o en cualquiera de las combinaciones del 1%-10% y del 99%-90% respectivamente, o del 11%-20% y del 89%-80% respectivamente, o del 21%-30% y del 79%-70% respectivamente, o del 31%-40% y del 69%-60% respectivamente, o del 41%-50% y del 59%-50% respectivamente. La mayoría de tales métodos o métodos alternativos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Consultar, por ejemplo, Weishou Hu y otros, Cell Culture Process Engineering (2013).

Los métodos de la presente invención proporcionan células o líneas celulares eucariotas altamente productoras para la generación de proteínas o polipéptidos que contienen o comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. En un aspecto, la composición incluye opcionalmente, por ejemplo, por lo menos 10 microgramos, por lo menos 50 microgramos, por lo menos 75 microgramos, por lo menos 100 microgramos, por lo menos 200 microgramos, por lo menos 250 microgramos, por lo menos 500 microgramos, por lo menos 1 miligramo, por lo menos 10 miligramos o más del polipéptido de proteína que comprende un aminoácido no natural, o una cantidad que puede conseguirse con métodos de producción de proteínas in vivo. En otro aspecto, la proteína está opcionalmente presente en la composición a una concentración de, por ejemplo por lo menos 10 microgramos de proteína por litro, por lo menos 50 microgramos de proteína por litro, por lo menos 75 microgramos de proteína por litro, por lo menos 100 microgramos de proteína por litro, por lo menos 200 microgramos de proteína por litro, por lo menos 250 microgramos de proteína por litro, por lo menos 500 microgramos de proteína por litro, por lo menos 1 miligramo de proteína por litro, o por lo menos 10 miligramos de proteína por litro o más, en, por ejemplo, un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (por ejemplo, en un volumen de, por ejemplo, aproximadamente 1 nl a aproximadamente 100 l). La producción de grandes cantidades (por ejemplo, mayores que las típicamente posibles con otros métodos, por ejemplo, traducción in vitro) de una proteína en una célula eucariota o de vertebrado que incluya por lo menos un aminoácido no natural es una característica de la invención.

En algunas realizaciones, una célula de la presente invención es una célula huésped manipulada o recombinante o una célula de plataforma, también denominada "célula huésped". Dicha célula huésped de plataforma, manipulada o recombinante, o célula huésped, se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en donde los métodos usados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, pero no se limitan a, la captación directa, la transducción, el apareamiento f u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped

recombinantes. A modo de ejemplo solamente, dicho polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, incluyendo pero no limitados a un plásmido, o puede integrarse en el genoma huésped. En otros aspectos de la invención, el gen de interés puede transfectarse en una célula huésped de plataforma, manipulada o recombinante para generar una línea celular de producción para generar o fabricar un bioterapéutico, incluyendo pero no limitado a un anticuerpo. En otra realización de la invención, una línea celular de producción es una línea celular que tiene un gen de interés silenciado o desactivado, extirpado, inactivado o interrumpido que puede convertirse en una línea celular de plataforma. En algunos aspectos de la invención, una célula de plataforma puede ser una línea celular que comprende un sistema ARN/RS ortogonal sin tener un gen de interés.

Las composiciones pueden estar sustancialmente purificadas. El término "sustancialmente purificado", como se usa en la presente, se refiere a un componente de interés que puede estar sustancial o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interactúan con el componente de interés antes de la purificación. A modo de ejemplo solamente, un componente de interés puede estar "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 25%, menos de aproximadamente un 20%, menos de aproximadamente un 15%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 4%, menos de aproximadamente un 3%, menos de aproximadamente un 2% o menos de aproximadamente un 1% de componentes contaminantes. Por tanto, un componente de interés "sustancialmente purificado" puede tener un nivel de pureza de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más. A modo de ejemplo solamente, un polipéptido de aminoácidos naturales o un polipéptido de aminoácidos no naturales puede purificarse a partir de una célula nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales producidos recombinantemente. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácido natural o de un polipéptido de aminoácido no natural puede estar "sustancialmente purificada" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácidos naturales o un polipéptido de aminoácidos no naturales se produce recombinantemente mediante células huésped, el polipéptido de aminoácidos naturales o el polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar presente en aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácidos naturales o un polipéptido de aminoácidos no naturales se produce recombinantemente por células huésped, el polipéptido de aminoácidos naturales o el polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar presente en el medio de cultivo en aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 10 mg/l, o aproximadamente 1 mg/l o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos naturales o los polipéptidos de aminoácidos no naturales "sustancialmente purificados" pueden tener un nivel de pureza de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o más, según se determine mediante métodos apropiados incluyendo, entre otros, análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar. El polipéptido o proteína puede incluir un excipiente (por ejemplo, tampón, agua, excipiente farmacéuticamente aceptable, pero no limitado a ellos).

Los métodos de la invención pueden incluir agentes, sustancias y marcadores para el cribado o selección de un gen, polipéptido o proteína. Un agente de selección o cribado, como se usa en la presente, se refiere a un agente que, cuando está presente, permite una selección/cribado de ciertos componentes de una población. Por ejemplo, un agente de selección o cribado incluye, pero no se limita a, por ejemplo, un nutriente, un antibiótico, una longitud de onda de luz, un anticuerpo, un polinucleótido expresado (por ejemplo, una proteína moduladora transcripcional), o similares. El agente de selección puede variar, por ejemplo, en concentración, intensidad, etc. En otras realizaciones, los métodos de la invención incluyen una sustancia detectable. También pueden usarse sustancias detectables. El término "sustancia detectable", como se usa en la presente, se refiere a un agente que, cuando se activa, altera, expresa o similar, permite la selección/cribado de ciertos componentes de una población. Por ejemplo, la sustancia detectable puede ser un agente químico, por ejemplo, ácido 5-fluorouracilo (5-FOA), que bajo ciertas condiciones, por ejemplo, la expresión de un informador URA3, se vuelve detectable, por ejemplo, un producto tóxico que mata las células que expresan el informador URA3. Además, los métodos, células o líneas celulares de la invención pueden incluir un marcador de selección o cribado positivo y/o negativo. Como se usa en la presente, el término "marcador positivo de selección o cribado" se refiere a un marcador que cuando está presente, por ejemplo, expresado, activado o similar, da como resultado la identificación de una célula con el marcador de selección positivo de aquellas sin el marcador de selección positivo. Como se usa en la presente, el término "marcador negativo de selección o cribado" se refiere a un marcador que, cuando está presente, por ejemplo, expresado, activado o similar, permite la

identificación de una célula que no posee la propiedad deseada (por ejemplo, en comparación con una célula que sí posee la propiedad deseada).

ARNt ortogonal y aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una línea celular de producción estable que comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt) y un gen de interés que contiene un codón selector (por ejemplo, bioterapéuticos incluyendo anticuerpos). La capacidad de modificar genéticamente las estructuras de las proteínas directamente en las células eucariotas, más allá de las restricciones químicas impuestas por el código genético, proporciona una potente herramienta molecular para sondear y manipular los procesos celulares.

Un par ortogonal se compone de un O-ARNt, por ejemplo, un ARNt supresor, un ARNt de cambio de marco o similar, y un O-RS. El O-ARNt no está acilado por sintetasas endógenas y es capaz de mediar la incorporación de un aminoácido no natural en una proteína codificada por un polinucleótido que comprende un codón selector que es reconocido por el O-ARNt in vivo. El O-RS reconoce el O-tRNA y aminoacila preferentemente el O-ARNt con un aminoácido no natural en una célula de vertebrado. Los métodos para producir pares ortogonales junto con los pares ortogonales producidos por tales métodos y composiciones de pares ortogonales para su uso en células de vertebrados se divulgan en la solicitud de patente internacional WO 2002/086075, titulada "Methods and compositions for the production of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase pairs". Consultar también, Forster et al., (2003) *Programming peptidomimetic synthetases by translating genetic codes designed de novo* PNAS 100(11):6353-6357; y, Feng et al., (2003), *Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change*, PNAS 100(10): 5676-5681. El desarrollo de múltiples pares ortogonales de ARNt/sintetasa puede permitir la incorporación simultánea de múltiples aminoácidos no naturales usando diferentes codones en una célula de vertebrado.

En la técnica se conocen los ARNt ortogonales y los aminoacil-ARNt ortogonales. Consultar, por ejemplo, WO 2008/030612, WO 2008/030614, WO 2008/030613, WO 2006/068802, WO 2007/021297, WO 2007/070659, USPN 8,420,792, USPN 9,133,495; USPN 7,736,872; USPN 7,846,689; USPN 7,883,866; USPN 7,838,265; USPN 7,829,310; USPN 7,858,344; USPN 7,632,823; y USPN 9,586,988. Detalles adicionales para producir O-RS pueden encontrarse en la WO 2002/086075 titulada "Methods and compositions for the production of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase pairs". Consultar también, Hamano-Takaku et al, (2000) *A mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine*, Journal of Biological Chemistry, 275(51):40324-40328; Kiga et al, (2002), *An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in vertebrate translation and its application in a wheat germ cell-free system*, PNAS 99(15): 9715-9723; y, Francklyn et al., (2002), *Aminoacyl-tRNA synthetases; Versatile players in the changing theater of translation*; RNA, 8:1363-1372.

Un par ortogonal O-tRNA/O-RS en una célula de vertebrado puede producirse importando un par, por ejemplo, un par supresor de sinsentido, de un organismo diferente con aminoacilación ineficiente entre especies. El O-ARNt y el O-RS se expresan y procesan eficientemente en la célula de vertebrado y el O-ARNt se exporta eficientemente del núcleo al citoplasma. Por ejemplo, uno de estos pares es el par tirosil-ARNt sintetasa/ARNt_{CUA} de *E. coli* (consultar, por ejemplo, H. M. Goodman, et al., (1968), *Nature* 217:1019-24; y, D. G. Barker, et al., (1982), *FEBS Letters* 150:419-23). La tirosil-ARN-t-sintetasa de *E. coli* aminoacila eficientemente su ARNt_{CUA} de *E. coli* afin cuando ambos se expresan en el citoplasma de *S. cerevisiae*, pero no aminoacila el ARNt de *S. cerevisiae*. Consultar, por ejemplo, H. Edwards, & P. Schimmel, (1990), *Molecular & Cellular Biology* 10:1633-41; y, H. Edwards, et al., (1991), *PNAS United States of America* 88:1153-6. Además, el tirosil ARNt_{CUA} de *E. coli* es un sustrato pobre para las aminoacil-ARNt sintetasas de *S. cerevisiae* (consultar, por ejemplo, V. Trezeguet, et al., (1991), *Molecular & Cellular Biology* 11:2744-51), pero funciona eficazmente en la traducción de proteínas en *S. cerevisiae*. Consultar, por ejemplo, H. Edwards, & P. Schimmel, (1990) *Molecular & Cellular Biology* 10:1633-41; H. Edwards, et al., (1991), *PNAS United States of America* 88:1153-6; y, V. Trezeguet, et al., (1991), *Molecular & Cellular Biology* 11:2744-51. Además, el TyrRS de *E. coli* no dispone de un mecanismo de edición para corregir un aminoácido no natural ligado al ARNt.

Aminoácidos no naturales

La incorporación de un aminoácido no natural o innatural puede hacerse para, adaptar cambios en la estructura y/o función de la proteína, incluyendo para cambiar el tamaño, la acidez, la nucleofilia, los enlaces de hidrógeno, la hidrofobicidad, la accesibilidad de los sitios diana de la proteasa, dirigirse a una fracción (por ejemplo, para un conjunto de proteínas), y similares. Las proteínas que incluyen un aminoácido no natural pueden tener propiedades catalíticas o físicas mejoradas o incluso completamente nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente mediante la inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, capacidad catalítica, semivida (por ejemplo, semivida en suero), capacidad de reaccionar con otras moléculas, por ejemplo, covalente o no covalentemente, y similares. Las composiciones que incluyen proteínas que incluyen por lo menos un aminoácido no natural son útiles para, por ejemplo, nuevas terapias, diagnósticos, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (por ejemplo, anticuerpos) y, por ejemplo, el estudio de la estructura y función

de las proteínas. Consultar, por ejemplo, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652.

Los aminoácidos no naturales usados en los métodos y composiciones descritos en la presente tienen por lo menos una de las cuatro propiedades siguientes: (1) por lo menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural tiene por lo menos una característica y/o actividad y/o reactividad ortogonal a la reactividad química de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), o por lo menos ortogonal a la reactividad química de los aminoácidos de origen natural presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes químicamente frente a los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de forma estable en un polipéptido, preferiblemente con la estabilidad acorde con la de los aminoácidos de origen natural o en condiciones fisiológicas típicas, y además preferiblemente dicha incorporación puede producirse mediante un sistema in vivo; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima reaccionando con un reactivo, preferiblemente en condiciones que no destruyan las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido no natural (a menos, por supuesto, que tal destrucción de las propiedades biológicas sea el propósito de la modificación/transformación), o cuando la transformación pueda producirse en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o cuando el sitio reactivo en el aminoácido no natural sea un sitio electrófilo. Puede introducirse cualquier número de aminoácidos no naturales en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima tras la desprotección del grupo protegido o el desenmascaramiento del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que pueden transformarse en un grupo carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección del grupo protegido o el desenmascaramiento del grupo enmascarado y, por lo tanto, están disponibles para reaccionar con hidroxilaminas u oximas para formar grupos oxima.

Los aminoácidos no naturales que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente incluyen, entre otros, aminoácidos que comprenden aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan de covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos glucosilados como una serina sustituida por azúcar, otros aminoácidos modificados por carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen aldehídos, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos por átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales incluyendo, entre otros, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga incluyendo, entre otros, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcares enlazados con carbono, aminoácidos redox-activos, aminoácidos que contienen aminoácidos tioácidos y aminoácidos que contienen una o más moléculas tóxicas.

En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales comprenden una fracción de sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen la N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, la N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, la N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, la N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y la O-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N- u O- natural entre el aminoácido y el sacárido se sustituye por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluyendo, entre otros, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural, como la 2-deoxiglucosa, la 2-deoxigalactosa y similares.

Ejemplos específicos de aminoácidos no naturales incluyen, entre otros, una p-acetil-L-fenilalanina, una p-propargiloxifenilalanina, O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromo-fenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina y una isopropil-L-fenilalanina, y similares.

Las fracciones químicas incorporadas en los polipéptidos mediante la incorporación de aminoácidos no naturales en dichos polipéptidos ofrecen una serie de ventajas y manipulaciones de los polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo funcional ceto- o aldehído-) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de una serie de reactivos que contienen hidracina o hidroxilamina in vivo e in vitro. Un aminoácido no natural de átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para ajuste de fase de datos de estructuras de rayos X. La introducción de átomos pesados en sitios específicos mediante aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de posiciones para los átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluidos, entre otros, los aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluida, entre otras, la fenilazida)), por ejemplo, permiten la fotorreticulación eficaz in vivo e in vitro de polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, entre otros, la p-azido-fenilalanina y la p-benzoil-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede

entonces reticularse a voluntad mediante la excitación del grupo fotorreactivo, lo que proporciona un control temporal. En un ejemplo no limitativo, el grupo metilo de un aminoácido no natural puede ser sustituido con un grupo isotópicamente marcado, incluyendo pero no limitado a, con un grupo metilo, como una sonda de la estructura y la dinámica locales, incluyendo pero no limitado a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

La captación de aminoácidos no naturales por una célula eucariota es una cuestión que se tiene típicamente en cuenta a la hora de diseñar y seleccionar aminoácidos no naturales, incluyendo pero no limitado a, para su incorporación en un polipéptido o proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales son absorbidos en la célula eucariota a través de una serie de sistemas de transporte basados en proteínas. Puede realizarse un cribado rápido que evalúe qué aminoácidos no naturales, si los hay, son absorbidos por las células. Consultar, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/198637 titulada "Protein Arrays", y Liu, D. R. & Schultz, P. G. (1999) *Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96:4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con varios ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales susceptibles de vías de captación celular es proporcionar vías biosintéticas para crear aminoácidos in vivo.

Típicamente, el aminoácido no natural producido a través de la captación celular como se describe en la presente se produce en una concentración suficiente para la biosíntesis eficiente de proteínas, incluyendo pero no limitado a, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal como para afectar a la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM.

Ya existen muchas vías biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque un método biosintético para un aminoácido no natural concreto puede no existir en la naturaleza, incluyendo, pero no limitado a, en una célula, los métodos y composiciones descritos en la presente proporcionan tales métodos. Por ejemplo, las vías biosintéticas para aminoácidos no naturales pueden generarse en la célula huésped añadiendo nuevas enzimas o modificando las vías existentes en la célula huésped. Las nuevas enzimas adicionales incluyen enzimas de origen natural o enzimas evolucionadas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de la p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en la WO 2002/085923 titulada "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes de estas enzimas pueden introducirse en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que contenga los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una vía enzimática para sintetizar el compuesto deseado. En la presente se proporcionan ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente. Pueden encontrarse secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en Genbank. Las enzimas desarrolladas artificialmente pueden añadirse a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria y los recursos celulares de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

Hay disponibles una variedad de métodos para producir nuevas enzimas para su uso en vías biosintéticas o para la evolución de vías existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, incluyendo, pero no limitada a, la desarrollada por Maxygen, Inc. (disponible en la red mundial en maxygen.com), puede usarse para desarrollar nuevas enzimas y vías. Consultar, por ejemplo, Stemmer (1994), *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, Nature 370(4):389-391; y, Stemmer, (1994), *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. De manera similar, se usa opcionalmente DesignPPPath™, desarrollado por Genencor (disponible en la red mundial en genencor.com) para la manipulación de vías metabólicas, incluyendo, entre otras cosas, la manipulación de una vía para crear un aminoácido no natural en una célula. Esta tecnología reconstruye las vías existentes en los organismos huéspedes usando una combinación de nuevos genes, incluyendo, entre otros, los identificados a través de la genómica funcional, la evolución molecular y el diseño. Diversa Corporation (disponible en la web mundial diversa.com) también proporciona tecnología para el cribado rápido de bibliotecas de genes y vías génicas, incluyendo pero no limitado a, para crear nuevas vías de producción biosintética de aminoácidos no naturales.

Típicamente, el aminoácido no natural producido con una vía biosintética manipulada como se describe en la presente se produce en una concentración suficiente para la biosíntesis eficiente de proteínas, incluyendo pero no limitado a, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal como para afectar a la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas in vivo de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que comprende los genes usados para producir las enzimas deseadas para una vía específica y se genera un aminoácido no natural, se usan opcionalmente selecciones in vivo para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural tanto para la síntesis de proteínas ribosómicas como para el crecimiento celular. Los aminoácidos no naturales descritos en la presente pueden sintetizarse usando metodologías descritas en la técnica o usando las técnicas descritas en la presente o mediante una combinación de las mismas.

Caracterización del producto

La caracterización exhaustiva de los productos bioterapéuticos es necesaria para satisfacer las normas de seguridad establecidas por los agencias reguladoras y para ayudar a garantizar la eficacia de los fármacos proteicos. La caracterización biofarmacéutica es necesaria en todas las fases del desarrollo y la fabricación de fármacos. Por lo tanto, es primordial monitorizar la calidad del producto durante cada etapa del desarrollo de la línea celular, la manipulación y el desarrollo del proceso de cultivo celular para garantizar que se selecciona el clon correcto, ya que la calidad y la productividad del producto dependen a menudo tanto del clon como de las condiciones del cultivo celular. Durante los procesos de selección de clones, se hace hincapié en los parámetros de calidad del producto que probablemente sean específicos del clon. Estos parámetros incluyen, por ejemplo, procesos enzimáticos, como la glicosilación y el recorte proteolítico, y aspectos genéticos, como mutaciones, cambios de marco y cortes y empalmes, pero no se limitan a ellos. También se hace hincapié en los parámetros moleculares que se sabe que contribuyen a la actividad biológica. Por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) depende de la fucosilación, y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) depende de la galactosilación. Las diferencias observadas entre clones en el grado de modificaciones químicas, como la oxidación o la desamidación, pueden reducirse o eliminarse mediante la optimización del proceso de purificación o el ajuste de los parámetros del proceso de cultivo celular y serán menos significativas (Lewis et al, 2010).

Puede examinarse el impacto de la edición del genoma CRISPR-Cas9 y la clonación unicelular sobre la calidad del producto de una célula o línea celular que expresa un bioterapéutico. Los atributos de calidad del producto evaluados durante la selección de clones de células manipuladas con CRISPR-Cas9 pueden incluir la integridad de la molécula, la agregación, la glicosilación y la heterogeneidad de la carga, pero no se limitan a ellos. La integridad de la molécula depende del clon y puede deberse a problemas genéticos o al recorte proteolítico. Para evaluar la integridad de la molécula con el criterio de evitar la mutación de la secuencia de aminoácidos o los anticuerpos truncados, pueden usarse varias metodologías, técnicas y ensayos, todos ellos bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales metodologías, técnicas y ensayos pueden incluir, entre otros, secuenciación de ADNc, mapeo de péptidos, CE-SDS o SDS-PAGE. La agregación puede medirse usando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El criterio para este análisis es evitar un alto nivel de agregación que pueda ser inmunogénico. Algunos niveles de agregación pueden reducirse mediante la optimización del proceso de cultivo celular o eliminarse mediante la optimización del proceso de purificación. La glicosilación es otro atributo molecular y postraducciona importante que depende en gran medida de la línea celular. Para la evaluación de la glicosilación en la etapa de selección de clones se usan comúnmente ensayos de glicosilación basados en HPLC o CE, bien conocidos en la técnica, con el objetivo de evitar altos niveles de formas de glicosilación inusuales. La heterogeneidad de carga, que puede producirse debido a modificaciones químicas, depende en gran medida de los procesos de cultivo celular y, por lo tanto, tiene un papel menos significativo durante la etapa de selección de clones.

La espectrometría de masas (MS) intacta proporciona información sobre la masa exacta de la proteína y la abundancia relativa de sus isoformas. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), también conocida como cromatografía de tamiz molecular, es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan por su tamaño y, en algunos casos, por su peso molecular. En la presente invención, la MS se utilizó para demostrar que para los clones manipulados y las líneas celulares originales generadas, la secuencia primaria de aminoácidos es la misma que la deducida de la secuencia del ADNc, confirmando así la identificación del mAb. También se modificó y utilizó la SEC para determinar la pureza y la consistencia de fabricación de los anticuerpos monoclonales (mAb) generados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estrategia de utilización de la manipulación de líneas celulares de plataforma en la industria de desarrollo de fármacos: del descubrimiento a la fabricación

Desde la perspectiva de la industria, el desarrollo de líneas celulares de plataforma no sólo respalda todas las etapas del desarrollo de fármacos proporcionando el material adecuado para cada etapa, sino que también genera líneas celulares de producción estables y bien caracterizadas antes de la introducción del producto en las clínicas y su comercialización (FIG. 1). Para apoyar cada etapa del desarrollo de fármacos de manera eficiente, se desarrollaron múltiples formas de proporcionar material, incluyendo el transitorio, la reserva estable a granel y la línea celular estable, como se ilustra en la FIG. 1. Para la selección de moléculas candidatas a anticuerpos, se utilizó la expresión transitoria para proporcionar rápidamente pequeñas cantidades de producto. La reserva estable a granel es una alternativa para proporcionar una gran cantidad de material para el estudio de desarrollabilidad (purificación, formulación, desarrollo de métodos analíticos) hasta el estudio toxicológico IND (100-200 g) en 8 semanas. Una vez se hubo determinado la molécula líder, la línea celular estable se generó en 6 meses con títulos de hasta 1,5 g/l. Esto proporciona apoyo para el ensayo clínico y la posible comercialización.

Ejemplo 2: Procedimiento general de utilización de una línea celular de plataforma en el desarrollo de una línea celular de alta producción

La Figura 2 representa un diagrama de flujo para el desarrollo de líneas celulares estables. Los inventores

emplearon esta estrategia para generar líneas celulares de producción de alta producción, estables y bien caracterizadas, escalables a la fabricación estándar de la industria, para apoyar el ensayo clínico y la comercialización, a la vez que se mantenían los perfiles deseados de seguridad y eficacia de los agentes terapéuticos. Se transfectó un vector de expresión de mamíferos que portaba un gen de interés (GOI) y marcador o marcadores seleccionables en una línea celular de plataforma CHO manipulada para generar una miniagrupación (MP) en 96 pocillos. Después de la selección y el cribado, los mejores MP se sembraron en placas como células individuales por pocillo usando FACS seguido de imagenología de alta resolución para derivar líneas celulares clonales. Se seleccionaron las líneas celulares derivadas de una sola célula y los mejores clones se transfirieron al grupo de cultivo celular para el desarrollo del proceso. La selección final de clones para la fabricación de material clínico se basó en el crecimiento, la productividad y la PQ. El proceso completo de CLD dura 6 meses y la productividad específica de la célula fue de 20-30 picogramos por célula y día. Estable durante más de 10 semanas para apoyar la fabricación de biorreactores de 12.000 l, la línea celular y el proceso de lotes alimentados pueden ampliarse hasta 2000 l hasta el momento para apoyar el ensayo clínico en curso.

Ejemplo 3: Optimización del desarrollo de líneas celulares de alta producción

La optimización del desarrollo de líneas celulares de alta producción puede lograrse desde varios aspectos, como el depósito de células individuales dependiente de FACS (FIG. 3A), el procedimiento de desactivación de CRISPR (FIG. 3B) y la optimización del proceso de desarrollo de líneas celulares (FIG. 3C).

La guía reguladora (ICH Q5D) instruye la clonación del sustrato celular "a partir de un progenitor de una única célula" durante el desarrollo de la línea celular. En los últimos años, la FDA y la industria han establecido la expectativa de proporcionar una alta garantía de clonalidad (Kennett, 2014; Novak, 2017; Welch, 2017). La FDA ha recomendado que dos rondas de clonación por dilución limitante (LDC) a densidades de sembrado suficientemente bajas (<0,5 células/pocillo) proporcionan una probabilidad aceptable de que una línea celular sea clonal. Más recientemente, una sola ronda de clonación mediante FACS o LDC con suficiente justificación, como el uso de tecnología de imagenología, ha proporcionado una garantía aceptable de clonalidad cuando se usan métodos validados. Por tanto, los inventores modificaron y validaron el depósito de células individuales FACS (FACS SCD) junto con la imagenología de alta resolución como paso de una ronda de clonación en el proceso de desarrollo de líneas celulares para acortar los plazos y satisfacer los requisitos reglamentarios de garantía de clonalidad.

Como se muestra aquí (FIG. 3A), en comparación con la clonación por dilución limitante (LDC) tradicional, la FACS SCD generó una tasa de depósito y crecimiento comparable. Sin embargo, la eficiencia del aislamiento del crecimiento monoclonal (proporción del número de pocillos que contienen colonias derivadas de una única célula dividido por el número total de pocillos) usando el enfoque FACS es 1,5 veces mayor que usando LDC (49% frente a 32%), ahorrando tiempo y recursos significativos en la imagenología y el cribado. Para validar el método se llevó a cabo una amplia optimización de la instrumentación FACS y de la variación de la fuerza g de centrifugación, junto con un análisis exhaustivo de las imágenes de cada pocillo. Se observó que la probabilidad de monoclonalidad de la colonia derivada de células individuales era >99,5%.

Se ha probado la manipulación genética de la línea celular de producción usando la tecnología de edición del genoma CRISPR-cas9 para dirigirse a un panel de genes para mejorar el crecimiento celular y la productividad, a la vez que se mantiene la calidad deseada del producto. En la FIG. 3B se ilustra el procedimiento de desactivación CRISPR. Se usó una herramienta web de búsqueda de dianas, CRISPy, para identificar rápidamente las secuencias diana de los ARNg, preferiblemente en los primeros exones, con cero fuera de diana en las células CHO-K1. Los ARNg se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pGNCV coexpresado con la versión de codón optimizado de CHO de Cas9. La línea celular de producción se transfectó con el vector pGNCV para generar grupos de células, seguido de clonación para identificar aislados de células individuales con desactivación de genes. La frecuencia de indeles (inserción/delección) a partir de los resultados compuestos de múltiples proyectos fue del 30-90% y del 50-80% para el grupo de células y los aislados unicelulares, respectivamente. La transferencia Western reconfirmó la eficacia de la desactivación en un 50-90% para los aislados de células individuales con desactivación verificados por secuenciación del ADN. Los clones de células individuales con desactivación se sometieron a una evaluación adicional de la productividad, el crecimiento, el ensayo de apoptosis y la calidad del producto para seleccionar un clon de producción para la fabricación cGMP. Las dianas validadas usadas para la desactivación se probaron usando la línea celular de producción. Esto resultó beneficioso para evaluar la productividad y el crecimiento y fue aplicable a la alteración en el huésped de la línea celular de plataforma usando CRISPR para aumentar la eficiencia del aislamiento de la línea celular de alta producción para el futuro gen de interés.

El proceso de desarrollo de la línea celular también se ha optimizado junto con la evolución de la línea celular de plataforma. Usando la primera línea celular de plataforma como huésped, se necesitan de tres a cuatro pasos (o de 9 meses a 12 meses) para generar una línea celular de producción que produzca títulos de 0,5-1 g/l (Fig. 3C). El proceso actual de desarrollo de líneas celulares se ha acortado a dos pasos o 6 meses, gracias a la mejora de la línea celular de plataforma y a la clonación en un solo paso, como se ilustra en la (FIG. 2).

Ejemplo 4: La línea celular de la plataforma muestra una apoptosis excesiva en el cultivo

Se usó el ensayo de anexina V para evaluar la viabilidad de las células CHO-S y de una línea celular de plataforma 4E2 que contiene incorporado genéticamente un par ortogonal de ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específico para la para-acetil-L-fenilalanina. Como se muestra en la FIG. 4, en comparación con las células CHO-S (la viabilidad es del 96%), las 4E2 mostraron una apoptosis excesiva (la viabilidad es del 85%). Las observaciones muestran que las células 4E2 que han incorporado la ARNt sintetasa y el par ARNt (específico para, por ejemplo, el aminoácido no natural para-acetilalanina, pAF) mostraron una apoptosis excesiva que sus contrapartidas de células, las células CHO-S.

Ejemplo 5: Diseño y preparación de constructos BAX- y BAK-CRISPR

Los constructos de CRISPR se diseñaron para reconocer sitios diana en el gen BAX o BAK y realizar roturas de cadena doble en células CHO después de la transfección. En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran diseños ejemplares.

La desactivación de un gen puede realizarse usando un procedimiento secuencial o simultáneo. La desactivación doble de BAX y BAK también puede conseguirse mediante un procedimiento de desactivación secuencial. En general, el primer paso consiste en aplicar tres constructos de ARNg dirigidos a BAX en una línea celular que exprese anti-HER2. Después de un proceso similar al usado en el procedimiento de desactivación simultánea, se aísla una línea celular con desactivación de BAX. Usando esta línea celular, se aplican dos constructos de ARNg dirigidos a BAK para lograr la desactivación de BAK. Después de la verificación mediante secuenciación del ADN genómico, se confirma que la línea celular de desactivación doble de BAX y BAK se ha conseguido mediante dicho procedimiento secuencial.

En la FIG. 5 se ilustra el diseño del ARNg de CRISPR dirigido al gen BAX en células CHO. Como se muestra, se diseñaron tres sitios de ARNg dirigidos al gen BAX en células CHO usando una herramienta de diseño de ARNg de CRISPR en línea específica para el genoma CHO-K1 (consultar en la red mundial en staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy/). La secuencia de ADN genómico del gen BAX, exón 1 y exón 2 se muestran en sombreado gris. La otra secuencia de BAX se muestra en texto plano. Los cebadores usados en la secuenciación PCR se muestran al principio y al final de la secuencia como cebador directo y cebador inverso respectivamente. Como se muestra en la Tabla 1, los tres sitios BAX (cada uno tiene una secuencia de 19 nucleótidos de longitud, la secuencia -NGG PAM (motivo adyacente al protoespaciador) se omite durante el diseño debido a la naturaleza del plásmido pGCNV que es de corte abierto y tiene dos extremos pegajosos, como se muestra en la FIG. 7) son los siguientes: sitio-I (SEQ ID NO: 1) (AGGCACTCGCTCAACTTCG), sitio-II (SEQ ID NO: 2) (TGAGTGTGACCGGCTGTTG) y sitio-III (SEQ ID NO: 3) (TTTCATCCATGTATCGAGCT).

Como se muestra en la FIG. 6, se usó CRISPR para diseñar el ARNg del gen BAK objetivo en células CHO. La Figura 6 representa la secuencia de ADN genómico del gen BAK en células CHO en las que se han anotado dos secuencias de ARNg. La secuencia de ADN genómico del gen BAK, el exón 2 y el exón 3 se muestran en sombreado gris. La otra secuencia de BAK se muestra en texto plano. Los cebadores usados en la secuenciación PCR se muestran al principio y al final de la secuencia como cebador directo y cebador inverso respectivamente. Los tres sitios BAK mostrados en la Tabla 1, son los siguientes: (SEQ ID NO: 4) BAK-IGAACAATTGTCCATCTCG Exón 2, (SEQ ID NO: 5) BAK-IIATGCTGTGAAGAACGGGAGT Exón 3, (SEQ ID NO: 6) BAK-IIIAGAAGCCGGTCAACCACGT Exón 3.

Los plásmidos CRISPR usados en los experimentos de desactivación de BAX o BAK también se diseñaron como se muestra en la FIG. 7 usando un vector disponible comercialmente, vector de nucleasas de CRISPR Geneart (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). La forma completa del plásmido pGCNV se preparó insertando un oligo-dúplex en el vector pGCNV cortado que contenía una ranura para el oligo-dúplex y diseñado con secuencias específicas de ARNg de 19 nucleótidos de longitud para dirigirse a un sitio génico individualmente (consultar la Tabla 1 en otra parte de la presente).

Para formar un dúplex de oligos que pueda insertarse en pGCNV, se sintetizaron cinco (5) pares de oligos como se divulga en la Tabla 3 a continuación

Tabla 3: Secuencias oligo usadas para preparar constructos CRISPR con desactivación de BAX y BAK

SEQ ID	Nombre	Secuencia de oligo
83	BAX-I-F	AGGCACTCGCTCAACTTCGGTTTT
84	BAX-I-R	CGAAGTTGAGCGAGTGCCTCGGTG
85	BAX-II-F	TGAGTGTGACCGGCTGTTGGTTTT
86	BAX-II-R	CAACAGCGCCTCACACTCACCGGTG
87	BAX-III-F	TTTCATCCATGTATCGAGCTGTTTT
88	BAX-III-R	AGCTCGATACTGGATGAAGACGGTG
89	BAK-I-F	GAACAATTGTCCATCTCGGTTTT
90	BAK-I-R	CGAGATGGACAATTTGTTCCGGTG

(continuación)

SEQ ID	Nombre	Secuencia de oligo
91	BAK-II-F	ATGCTGTAAGAACGGGAGTGTTTT
92	BAK-II-R	CACTCCCGTTCTTACAGCATCGGTG

Para generar oligonucleótidos de cadena doble, cada par de oligos se incubó a una concentración final de 50 uM en tampón de apareamiento de oligonucleótidos a 95°C durante 4 minutos antes de enfriar a 25°C durante 5-10 minutos. Tras una dilución 10 de veces (5 uM), el dúplex de oligonucleótidos puede usarse en el procedimiento de ligación. La ligación puede realizarse con el kit de ligación rápida de Roche (Roche). En una reacción de 21 ul que contiene 3 ul de vector pGCNV, 1 ul de oligodúplex, 2 ul de tampón de dilución de ADN, 4 ul de agua, 10 ul de tampón T4 ADN ligasa y 1 ul de T4 ligasa. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pueden usarse 3 ul de la mezcla de ligación para la transformación de *E. coli* para el cribado de clones positivos.

Ejemplo 6: Ejemplos de aminoácidos no naturales usados en la presente invención

La invención implica la incorporación específica del sitio de aminoácidos no canónicos o no naturales en un gen de interés usando un par aminoacil-ARNt sintetasa/ARNt de transferencia ortogonal analizado en otra parte de la presente. La Figura 8 proporciona un número representativo de aminoácidos no naturales que pueden usarse. De manera ejemplar, uno de tales aminoácidos no naturales para-acetil-L-fenilalanina (pAF) se añadió en el medio de cultivo para iniciar la producción del gen de interés completamente ensamblado, por ejemplo bioterapéuticos que incluyen anticuerpos monoclonales, con incorporación sitio-específica de pAF.

Ejemplo 7: Generación y análisis de líneas celulares que expresan anti-HER2 deficientes en BAX/BAK

La ablación simultánea de BAX y BAK se llevó a cabo usando la tecnología CRISPR. La transfección transitoria se realizó usando tres constructos de ARNg dirigidos a BAX y dos constructos de ARNg dirigidos a BAK en la línea celular L082 que expresa anti-HER2. La transfección de plásmidos se realizó mediante electroporación. Durante la electroporación, se mezclaron 6 millones de células con 2 ug de plásmido de ADN en 100 ul de solución de electroporación. Las células se transfectaron en un Amaxa Nucleofector II (Lonza) usando el programa U-023 y se recuperaron en 0,5 ml de medio caliente. El Surveyor se realizó en el grupo de células transfectadas para medir la eficacia de la desactivación como se describe en el Ejemplo 3, FIG. 3B. Siete días después de ser transfectadas con tres constructos de ARNg dirigidos a BAX junto con dos constructos de ARNg dirigidos a BAK simultáneamente, las células se subclonaron a una densidad de sembrado de 0,5 células/pocillo en placas de 96 pocillos en clones únicos usando el método de dilución limitante. Cada célula individual de la placa de 96 pocillos se cultivó durante aproximadamente 2-3 semanas para generar un número suficiente de células que se utilizarían para análisis genéticos adicionales. Los clones derivados de células individuales se seleccionaron y examinaron en placas de 96 pocillos, 24 pocillos y 24 pocillos profundos para determinar su productividad, crecimiento y genotipado mediante secuenciación dirigida del ADN.

Ejemplo 8: Análisis del ADN de clones que expresan anti-HER2 deficientes en BAX y BAK

Se generaron células CHO inactivadas BAX y BAK y se analizaron a nivel genético. Se cotransfectaron tres plásmidos que codifican tres secuencias diferentes de ARNg dirigidos a sitios BAK en líneas celulares estables derivadas de células CHO que han sido manipuladas para tener pAF-RS y pAF-ARNt más gen anti-HER2 o fragmento del mismo 72 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico y se amplificó una porción del locus BAK por PCR usando los oligos K-I-II-F y K-I-II-R (Tabla 2; 5'-CAGACAGCCTTCTCTTGCT-3' (SEQ ID NO: 45) y 5'-AGAGCTCCTGAGAGGCATGA-3' (SEQ ID NO: 46)). La PCR se realizó usando la mezcla maestra Phusion High-Fidelity PCR (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las condiciones fueron las siguientes: después de una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, se realizaron 30 ciclos de PCR con una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, seguido de un paso de apareamiento de 30 segundos a 60°C, seguido de una extensión de 1 minuto a 72°C. Después de los 30 ciclos, la reacción se incubó a 72°C durante 5 minutos y después a 4°C indefinidamente. Los productos de la PCR se usaron en el análisis del ensayo Surveyor para evaluar la eficacia de la desactivación. La detección del ensayo Surveyor se realizó usando el kit de detección de mutaciones Surveyor de IDT (Integrated DNA Technology, San Diego, CA). El heterodúplex se formó usando un termociclador para imitar el procedimiento de enfriamiento natural de una mezcla oligo calentada. Se usó el siguiente procedimiento para formar el heterodúplex: 95°C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento de 95°C a 85°C (-2,0°C/s), incubación a 85°C durante 1 minuto; enfriamiento de 85°C a 75°C (-0,3°C/s), incubación a 75°C durante 1 minuto; enfriamiento de 75°C a 65°C (-0,3°C/s), incubación a 65°C durante 1 minuto; enfriamiento de 65°C a 55°C (-0,3°C/s), incubación a 55°C durante 1 minuto; enfriamiento de 55°C a 45°C (-0,3°C/s), incubación a 45°C durante 1 minuto; enfriamiento de 45°C a 35°C (-0,3°C/s), incubación a 35°C durante 1 minuto; enfriamiento de 35°C a 25°C (-0,3°C/s), incubación a 25°C durante 1 minuto; y después a 4°C indefinidamente. El ADN heterodúplex (20 ul) se incubó con 1 ul de Potenciador S de Surveyor (2 ul) y Nucleasa S de Surveyor (1 ul) a 42°C durante 60 minutos. Se ejecutaron 10 ul de muestra digerida en un gel de agarosa al 1% lado a lado con 10 ul de muestra no digerida. Como se muestra en la FIG. 9, se realizó un ensayo Surveyor en el grupo de células transfectadas para medir la eficacia de la desactivación como se describe en

el Ejemplo 3, FIG. 3B. El análisis de la eficacia de desactivación se realizó en poblaciones de células que expresan anti-HER2. La disminución de la banda superior y la aparición de las nuevas bandas inferiores es indicativa de la eficiencia que puede cuantificarse mediante análisis de densitometría de la imagen escaneada con el software Image J. Se usó la proporción entre la banda original antes y después de CRISPR KO para medir la eficiencia de la desactivación. La eficiencia de desactivación para BAX y BAK fue del 30% y 70% respectivamente, lo que resulta en una eficiencia de desactivación doble calculada del 21%.

Para realizar el aislamiento del ADN genómico y la secuenciación del ADN se usaron placas duplicadas de 96 pocillos que contenían células individuales. En el aislamiento de alto rendimiento del ADN genómico se usó la solución QuickExtract. Se retiraron 150 µl de sobrenadante del cultivo celular antes de añadir 150 µl de solución QuickExtract. Después de lisarlos a temperatura ambiente durante 10 minutos, los lisados celulares se transfirieron a microtubos frescos para calentarlos en bloque térmico a 65°C durante 6 minutos seguido de 98°C durante 2 minutos.

Se usó el extracto de ADN genómico para la amplificación por PCR. A continuación se purificaron los productos de la PCR y se secuenciaron. Los resultados de la secuenciación se analizaron usando herramientas de alineación del paquete de software Vector NTT. Se usó la secuencia genómica de los genes (en este caso, el gen BAK) obtenida de la red mundial en CHOgenome.org como secuencia de tipo salvaje durante el análisis de alineación. La FIG. 10 representa los resultados de la secuenciación del ADN de veinte clones de células individuales tras el desactivación de BAK mediante CRISPR. La secuencia de ADN superior (Bak-CHO-gDNA1) es la secuencia de ADN de la región genómica del gen BAK original. Sólo el clon 'ZA_112_K32_BakI-II' tiene una secuencia idéntica a la del gen BAK original. Los demás genes mostrados presentan delecciones o inserciones en sus secuencias. Se observaron observaciones similares con BAX (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Análisis proteico de desactivación de BAX y BAK en clones que expresan Anti-HER2

En las líneas celulares derivadas de células individuales que expresan anti-HER2 con desactivación de BAX y BAK se comprobó la expresión de la proteína BAX mediante análisis de transferencia Western (FIG. 11). Se prepararon lisados de 6 millones de líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK volviéndolos a suspender en 100 µl de tampón RIPA (Abcam) más inhibidores de proteasas (comprimidos Sigma, Sigma). Los lisados se incubaron en hielo durante 1 hora antes de centrifugarlos a 12.000 rpm durante 20 minutos. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit BCA (Pierce). Para la transferencia Western se usaron 20 µg de proteína. Los extractos de proteínas de diferentes líneas celulares se analizaron con el anticuerpo anti-BAX (Abcam). Como se muestra en la FIG. 11, las líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK como BB15, BB12 y BBS19 no expresaron proteínas BAX detectables. Por el contrario, como línea celular de control positivo, L082, mostró expresión de BAX de longitud completa, una proteína de 21-KD. Cabe señalar que la línea celular UBB3 expresó BAX residual, aunque se caracterizó por ser genéticamente deficiente en BAX mediante secuenciación génica. Se observaron observaciones similares con BAK (datos no mostrados).

Ejemplo 10: Se evita la apoptosis en líneas celulares que expresan anti-HER2 deficientes en BAX/BAK

Se comprobó la resistencia a la apoptosis de las líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK. La propiedad de resistencia a la apoptosis se evaluó durante el procedimiento de lotes alimentados. Se realizó un análisis de citometría de flujo de la tinción de Anexina V del día 12 de las células en lotes alimentados. Se siguió el protocolo estándar usando el kit de detección de apoptosis FITC de Anexina V de BD Biosciences en las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células pueden dividirse en cuatro etapas y/o poblaciones durante el ensayo de apoptosis: etapa de células viables normales (cuadrante 3, Q3), etapa temprana de apoptosis (cuadrante 4, Q4), etapa tardía de apoptosis (cuadrante 2, Q2), y etapa de células muertas (cuadrante 1, Q1). Como se muestra en la FIG. 12A, las células L082 normales (control) que no tienen desactivaciones mostraron apoptosis grave como se representa en Q4 (11,8%) y Q2 (41,8%). Por el contrario, la línea celular con doble desactivación de BAX/BAK (BB15) mostró una viabilidad mucho mayor (Q3, 80,9%) y resistencia a la apoptosis (Q4, 13,2%; Q2, 3,5%), como se muestra en la FIG. 12B. Por lo tanto, se observó que las células apoptóticas disminuyeron del 53% al 17%.

Ejemplo 11: La producción de proteína recombinante se aumenta en líneas celulares que expresan anti-HER2 deficientes en BAX/BAK

Las producciones de anticuerpos se evaluaron tanto en procedimientos por lotes como por lotes alimentados (FIGS. 13 y 14 respectivamente). En condiciones de cultivo por lotes, se añadió el aminoácido no natural pAF en el medio de cultivo el día 3 para iniciar la producción de anticuerpo anti-HER2 completamente ensamblado con incorporación específica del sitio de pAF. Como era de esperar para la manipulación antiapoptosis, la densidad celular pico medida por la densidad celular viable (VCD) de las células de desactivación (FIG. 13A) es un 25% mayor que el de las células originales y el tiempo de producción (FIG. 13B) se extendió hasta 10 días desde los 7 días de las células originales. Sorprendentemente, el Qp diario del día 7 de las células desactivadas (FIG. 13D) mejoró en un 50% con respecto a las células originales, posiblemente debido al mantenimiento de la actividad celular resultante de la manipulación antiapoptosis. Las líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK mostraron un aumento del título de 1,8 veces (270 mg/l frente a 150 mg/l) en comparación con las células originales (FIG. 13C) en el día 7 de producción.

Se observó una tendencia similar en condiciones de cultivo por lotes alimentados (FIG. 14), la combinación de la mejora en el crecimiento basada en la densidad celular máxima (VCD) como se muestra en la FIG. 14A, el tiempo de producción (FIG. 14B) y la productividad específica de la célula (FIG. 14D) llevan a un aumento de 3,3 veces en el título para las líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK (FIG. 14C) mostrando el clon BB15 con un título de 1500 mg/l en comparación con la línea celular original (L082,450 mg/l).

Ejemplo 12: Calidad del producto de líneas celulares que expresan anti-HER2 deficientes en BAX/BAK

La calidad del producto se analizó mediante espectrometría de masas (MS) intacta y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando muestras obtenidas por producción por lotes alimentados a partir de una línea celular original que expresaba anti-HER2 y de una línea celular anti-HER2 con doble desactivación BAX/BAK (Tabla 4). Se observó por MS que la secuencia primaria de aminoácidos del clon diseñado y de la línea celular original es la misma que la deducida de la secuencia de ADNc, lo que confirma la identificación del mAb (datos no mostrados).

Tabla 4: Análisis de calidad de productos de líneas celulares que expresan anti-HER2

	SEC			Masa intacta (% Glicoforma)				
	HMW	Principal	LMW	Man5	G0	G0F	G1F	G2F
HER2-BB15	4.4%	92.6%	3.1%	0%	1%	77%	21%	2%
HER2-L082	6.0%	89.0%	5.0%	2.4%	3.2%	64.4%	25.4%	4.5%

Como se representa en la Tabla 4, la calidad del producto se analizó usando muestras obtenidas por producción por lotes alimentados a partir de líneas celulares originales que expresan anti-HER2 y con doble desactivación BAX/BAK. Los perfiles de glicoformas evaluados por MS fueron comparables antes, (HER2-L082), y después del desactivación, (HER2-BB15), y dentro del intervalo de distribución normal para mAb en la etapa de selección de clones. La SEC mostró que el porcentaje de agregados de alto peso molecular (HMW) y de especies degradadas de bajo peso molecular (LMW) era en ambos menor del 5% y comparable antes y después de la manipulación, lo que indica que el procedimiento de desactivación y clonación de células individuales no tuvo un impacto negativo sobre la pureza del producto.

Ejemplo 13: Generación de una línea celular que expresa anti-PSMA deficiente en BAX/BAK

Se llevó a cabo la ablación simultánea de BAX y BAK usando la tecnología CRISPR mediante la transfección de tres constructos de ARNg dirigidos a BAX y dos constructos de ARNg dirigidos a BAK en la línea celular KO183 que expresa anti-PSMA. Los constructos BAX y BAK usados en este experimento se diseñaron y prepararon como se ha descrito en los Ejemplos anteriores y se ilustra en las FIGS. 5-7 y en las Tablas 1-3. Los plásmidos de CRISPR usados en los experimentos de desactivación relacionados con anti-PSMA también se diseñaron como se muestra en la FIG. 7 usando un vector disponible comercialmente, Vector de nucleasas de CRISPR Geneart (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). El oligodúplex insertado en pGCNV, comprendía cinco (5) pares de oligos sintetizados de la SEQ ID NO: 83 a la SEQ ID No:92.

Se cotransfectaron tres plásmidos que codifican tres secuencias diferentes de ARNg dirigidas a sitios BAX y dos plásmidos que codifican dos secuencias diferentes de ARNg dirigidas a sitios BAK en líneas celulares estables derivadas de células CHO que se han manipulado para que tengan pAF-RS y pAF-ARNt más gen anti-PSMA o fragmento del mismo. 72 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico y se amplificó por PCR una porción del locus BAK usando oligos de la SEQ ID NO: 45 y 46 como se describe en el Ejemplo 8. El locus BAX se amplificó por PCR usando oligos de la SEQ ID NO: 43 y 44 en su lugar. El análisis de ADN de los clones que expresan anti-PSMA deficientes en BAX y BAK se llevó a cabo como se describe en los Ejemplos anteriores. Como se muestra en la FIG. 15, se realizó un ensayo Surveyor para determinar la eficiencia de desactivación en poblaciones celulares que expresan anti-PSMA basadas en la tecnología de edición CRISPR. Se usó la proporción de la banda original antes y después de CRISPR KO para medir la eficiencia de desactivación. La eficiencia de desactivación para Bax y Bak fue del 42% y del 53% respectivamente, lo que dio como resultado una eficiencia de desactivación doble calculada en aproximadamente un 20%.

Siete días después, se subclonó el grupo de células transfectadas a una densidad de sembrado de 1 célula/pocillo en 40 placas usando FACS. Se seleccionaron aproximadamente 1.000 clones derivados de una célula individual, confirmados por imagen, y se seleccionaron en placas de 96 pocillos, 24 pocillos y 24 pocillos profundos para comprobar su productividad, crecimiento y genotipado mediante secuenciación dirigida del ADN.

El análisis del ADN de los clones que expresan anti-PSMA deficientes en BAX y BAK se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8 (datos no mostrados). Se seleccionaron los mejores clones KO183 BAX/BAK doble KO (KO183 BB KO) para una evaluación adicional del crecimiento y la productividad mediante un estudio de estabilidad de 2 meses y para la confirmación del estado de desactivación mediante transferencia western.

Como se muestra en la FIG. 16, el análisis proteico de la desactivación de BAX y BAK en clones que expresan anti-PSMA se evaluó mediante transferencia Western. Se prepararon lisados de 6 millones de líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK volviéndolos a suspender en 100 µl de tampón RIPA (Abcam) más inhibidores de proteasas (comprimidos Sigma; Sigma). Los lisados se incubaron en hielo durante 1 hora antes de centrifugarlos a 12.000 rpm durante 20 minutos. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit BCA (Pierce). Se usaron 20 µg de proteína para la transferencia Western. Los extractos de proteínas de diferentes líneas celulares se analizaron con el anticuerpo anti-BAX (Abcam).

La FIG. 16A muestra la desactivación de BAX en clones que expresan anti-PSMA manipulados usando CRISPR. La FIG. 16B muestra la desactivación de BAK en clones que expresan anti-PSMA manipulados usando CRISPR. De los 15 clones principales representados, 5 eran desactivaciones dobles de BAX/BAK. L082 es una línea celular de control positivo que expresa BAX de tipo salvaje o de longitud completa, una proteína de 21KD y BAK de tipo salvaje, una proteína de 24KD. Como control de desactivación doble se usaron células BB15 que expresaban anti-HER2.

Además, se realizó un análisis de la apoptosis en clones que expresaban anti-PSMA mediante un ensayo de apoptosis de unión a Anexina-V. Como se representa en la FIG. 17, los clones de doble desactivación BAX/BAK, por ejemplo PSMA-192 y PSMA-719, mostraron una viabilidad celular de aproximadamente el 85%, en comparación con aproximadamente el 35-37% observado en clones con desactivación única, por ejemplo PSMA-882 y clones sin desactivación, por ejemplo PSMA-484.

Ejemplo 14: La producción de proteína recombinante aumenta en clones que expresan anti-PSMA deficientes en BAX/BAK

Basándose en el análisis de los clones anti-PSMA que expresan BAX y BAK mediante transferencia western y análisis de Anexina V, se seleccionaron varios clones estables para su optimización adicional. Se seleccionaron tres (3) clones estables 192, 719 (ambos con desactivación BAX/BAK) y 882 (desactivación BAK) para la optimización del proceso para mejorar el título sobre la base de la alta productividad, el crecimiento robusto y la estabilidad de 2 meses observada para cada uno.

La producción del anticuerpo se evaluó en el proceso de lotes alimentados como se muestra en la FIG. 18. En condiciones de cultivo por lotes alimentados, la línea celular de doble desactivación BAX/BAK (PSMA-BBKO-192) mostró un aumento de 3 veces en el título (1400 mg/l frente a 500 mg/l), (FIG. 18C) en el día 10 de producción. Simultáneamente, la viabilidad también mejoró significativamente (FIG. 18B) en más del 90%. Como control se usó la línea celular no manipulada PSMA-S-164.

Ejemplo 15: La calidad del Producto de líneas celulares que expresan anti-PSMA deficientes en BAX/BAK se analizó mediante espectrometría de masas (MS) intacta y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando muestras obtenidas por producción por lotes alimentados a partir de la línea celular de control que expresa anti-PSMA (PSMA-S-164), y la línea celular que expresa anti-PSMA con doble desactivación BAX/BAK (PSMA-BBKO-192), como se divulga en la Tabla 5. Se observó por MS que la secuencia primaria de aminoácidos del clon manipulado y de la línea celular original es la misma que la deducida de la secuencia de ADNc, lo que confirma la identificación del mAb (datos no mostrados).

Tabla 5. Análisis de calidad de producto de líneas celulares que expresan anti-PSMA

	SEC			nrCE-SDS			Masa intacta (% Glicoforma)					
	HMW	Principal	LMW	Principal	Frag.	HMW	mAB	Man5	G0	G0F	G1F	G2F
PSMA-BBKO-192	3.2%	94.7%	2.1%	96.5%	3.5%	0%	0.2%	0%	1%	77%	21%	2%
PSMA-S-164	2.4%	97.6%	0%	96.1%	3.8%	0%	0.5%	1%	1%	64%	29%	5%

Como se muestra en la Tabla 5, los perfiles de glicoformas evaluados por MS eran comparables entre la línea celular no manipulada (PSMA-S-164) y la línea celular con desactivación doble de BAX/BAK (PSMA-BBKO-192) y se encontraban dentro del intervalo de distribución normal para mAb en la etapa de selección de clones. La SEC midió el porcentaje de agregados de alto peso molecular (HMW) y la nrCE-SDS midió el porcentaje de especies degradadas de bajo peso molecular (LMW). Tanto los agregados de alto peso molecular como las especies degradadas de bajo peso molecular fueron inferiores al 5% y comparables entre las líneas celulares que expresaban anti-PSMA y las que no lo hacían. Estos perfiles de calidad indican que la manipulación CRISPR-Cas9 y la posterior clonación de células individuales no han afectado negativamente a la calidad del producto de las líneas celulares que expresan anti-PSMA.

Ejemplo 16: Generación de una línea celular que expresa anti-CD70 deficiente en BAX/BAK

La ablación simultánea de BAX y BAK usando la tecnología de edición CRISPR-Cas9 se llevó a cabo mediante la transfección de tres constructos de ARNg dirigidos a BAX y dos constructos de ARNg dirigidos a BAK en una población celular de minigrupos que expresan anti-CD70 (CD70-MW-108). Los constructos BAX y BAK usados

en este experimento se diseñaron y prepararon tal como se describe en los Ejemplos anteriores y se ilustra en las FIGS. 5-7 y las Tablas 1-3. Los plásmidos CRISPR usados en los experimentos de desactivación relacionados con anti-CD70 también se diseñaron como se muestra en la FIG. 7 usando un vector disponible comercialmente, vector de nucleasas de CRISPR Geneart (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). El oligodúplex insertado en pGCNV, comprendía cinco (5) pares de oligos sintetizados de la SEQ ID NO: 83 a la SEQ ID NO:92.

Se cotransfectaron Tres plásmidos que codifican tres secuencias diferentes de ARNg dirigidas a sitios BAX y dos plásmidos que codifican dos secuencias diferentes de ARNg dirigidas a sitios BAK en líneas celulares estables derivadas de células CHO que se han diseñado para que tengan pAF-RS y pAF-ARNt más gen anti-PSMA o fragmento del mismo. 72 horas después de la transfección, se aisló ADN genómico y se amplificó por PCR una porción del locus BAK usando oligos de la SEQ ID NO: 45 y 46 como se describe en el Ejemplo 5. El locus BAX se amplificó por PCR usando oligos de la SEQ ID NO: 43 y 44 en su lugar. Como se muestra en la FIG. 19, se realizó un ensayo Surveyor para determinar la eficacia de desactivación en poblaciones celulares que expresan anti-CD70 sobre la base de la tecnología de edición CRISPR. La proporción de la banda original antes y después de CRISPR KO se cuantificó mediante análisis de densitometría de la imagen escaneada por el software Image J y se usó para medir la eficiencia de desactivación. La eficiencia de desactivación para BAX y BAK fue del 51% y del 23% respectivamente, lo que dio como resultado una eficiencia de desactivación doble calculada de aproximadamente el 10%. En este ensayo se observó una banda inespecífica. Se cree que esta banda puede deberse a la naturaleza de minigrupo de la población celular.

Siete días después, el grupo de células transfectadas se subclonó a una densidad de sembrado de 1 célula/pocillo en 40 placas usando FACS. Se seleccionaron aproximadamente 1.000 clones derivados de células individuales, confirmados por imagen, y se examinaron a través de 96 pocillos, 24 pocillos y 24 pocillos profundos para comprobar su productividad, crecimiento y genotipado mediante secuenciación dirigida del ADN. El análisis del ADN de los clones que expresan anti-CD70 deficientes en BAX y BAK se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8 (datos no mostrados). Del número de clones que expresaban anti-CD70 generados, se seleccionaron los clones con doble desactivación de BAX/BAK para una evaluación adicional del crecimiento y la productividad mediante un estudio de estabilidad de 2 meses y para la confirmación del estado de desactivación mediante transferencia western.

Como se muestra en la FIG. 20, el análisis de proteínas de clones que expresan anti-CD70 con desactivación de BAX y BAK se evaluó mediante transferencia Western. Se prepararon lisados de 6 millones de líneas celulares de doble desactivación BAX/BAK volviéndolos a suspender en 100 ul de tampón RIPA (Abcam) más inhibidores de proteasas (comprimidos Sigma; Sigma). Los lisados se incubaron en hielo durante 1 hora antes de centrifugarlos a 12.000 rpm durante 20 minutos. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit BCA (Pierce). Para la transferencia Western se usaron 20 ug de proteína. Los extractos de proteínas de diferentes líneas celulares se analizaron con el anticuerpo anti-BAX (Abcam). La FIG. 20A muestra la desactivación de BAX en clones que expresan anti-CD70 manipulados usando CRISPR. Como se muestra en la FIG. 20B, se observó en varios clones la desactivación de BAK en clones que expresan anti-CD70 manipulados usando CRISPR. De los 13 clones principales representados, 8 eran desactivaciones dobles de BAX/BAK. Cabe señalar que la línea celular original del clon 108 conservó la expresión residual de la proteína BAK. L082 es una línea celular de control positivo que expresa BAX de tipo salvaje o de longitud completa, una proteína de 21 KD y la proteína BAK de tipo salvaje, banda a 24 KD.

Además, se realizó un análisis de apoptosis en clones que expresaban anti-CD70 mediante un ensayo de apoptosis de unión a Anexina-V. Como se representa en la FIG. 21, los clones con doble desactivación de BAX/BAK, por ejemplo CD70-BBKO-563, mostraron una viabilidad celular de aproximadamente el 60%, en comparación con aproximadamente el 18% observado en la línea celular original CD70-MW-108. Simultáneamente, las células apoptóticas disminuyeron del 80% al 40%, como se observó a partir de Q2 y Q4 para cada línea celular.

Ejemplo 17: La producción de proteína recombinante aumenta en clones que expresan anti-CD70 deficientes en BAX/BAK

Basándose en el análisis de los clones anti-CD70 que expresan BAX y BAK mediante transferencia western y análisis de Anexina V, se seleccionaron varios clones estables para su optimización adicional. Como se muestra en la FIG. 21, se seleccionaron nueve (9) de los clones estables con ambas desactivaciones BAX/BAK, para la optimización del proceso para mejorar el título basado en la alta productividad, el crecimiento robusto y la estabilidad de 2 meses observada para cada uno.

La producción de anticuerpos se evaluó en el proceso de lotes alimentados como se muestra en la FIG. 22. En condiciones de cultivo por lotes alimentados, la línea celular con doble desactivación BAX/BAK que expresa anti-CD70 (CD70-BBKO-563) mostró un título de 1000 mg/l tanto en condiciones de matraz agitador como de biorreactor de sobremesa, (FIG. 22C) en el día 14 de producción. La viabilidad celular tanto en condiciones de matraz agitador como de biorreactor de sobremesa (FIG. 22B) fue de aproximadamente el 90%. En general, el perfil de producción, la VCD, la viabilidad y el título en condiciones de matraz agitador y de biorreactor fueron comparables y confirman que el proceso es escalable. Se realizaron estudios adicionales en las condiciones y procesos del biorreactor sobre la base de la productividad comparable y el perfil de crecimiento analizados (datos no mostrados). Este estudio apoya la

realización de la presente invención para controlar los factores estresantes apoptóticos que afectan al crecimiento celular en las condiciones de un biorreactor usando la tecnología CRISPR para desactivar genes que controlan o regulan la apoptosis.

- 5 Ejemplo 18: La calidad del producto de líneas celulares que expresan anti-CD70 deficientes en BAX/BAK se analizó la calidad del producto mediante espectrometría de masas (MS) intacta y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando muestras producidas por producción por lotes alimentados a partir de líneas celulares de doble desactivación de BAX/BAK que expresan anti-CD70 en condiciones de biorreactor y matraz agitador, como se indica en la Tabla 6.

10 Tabla 6. Análisis de calidad del producto de líneas celulares que expresan anti-CD70

	SEC			Masa intacta (% Glicoforma)				
	HMW	Principal	LMW	Man5	G0	G0F	G1F	G2F
15 Matraz agitador	7.7%	90.7%	1.6%	1.5%	1.7%	68.7%	22.8%	5.4%
Biorreactor	6.9%	92.1%	1.1%	1.8%	2.3%	63.3%	28.7%	%

20 Como se muestra en la Tabla 5, los perfiles de glicoformas evaluados por MS fueron comparables entre las condiciones del matraz agitador y del biorreactor y se encontraban dentro del intervalo de distribución normal para mAb en la etapa de selección de clones. La SEC midió el porcentaje de agregados de alto peso molecular (HMW) y el porcentaje de especies degradadas de bajo peso molecular (LMW). Tanto los agregados HMW como las especies degradadas LMW se encontraban dentro del intervalo normal en la etapa de selección de clones. Se observó que el HMW ligeramente superior al 5% se redujo al 2-3% después de la purificación (datos no mostrados). Estos perfiles de calidad indican que CRISPR y la posterior clonación de células individuales no han impactado negativamente en la calidad del producto de las líneas celulares que expresan anti-CD70. También se observó que los atributos de calidad del producto, (agregados, integridad y glicoformas), en las condiciones del biorreactor coincidían con las contrapartidas en condiciones de matraz agitador, lo que demuestra que el proceso es escalable.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, el método comprendiendo inactivar uno o más sitios o regiones diana en una célula, en donde el uno o más sitios o regiones diana es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak, en donde la célula expresa un gen de interés que contiene un codón selector, y en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt).
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar una molécula de ácido nucleico capaz de inactivar el uno o más sitios o regiones diana en la célula, e introducir la molécula de ácido nucleico en la célula, en donde la molécula de ácido nucleico inactiva el uno o más sitios o regiones diana, opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona de las SEQ ID NO: 1-6.
3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde:
 - a) la línea celular
 - (i) es una línea celular eucariota; y/o
 - (ii) se selecciona entre una línea celular transitoria, una población de líneas celulares estables o una línea celular clonal estable, opcionalmente en donde la población de líneas celulares estables es una línea celular de plataforma o de producción; o
 - b) la línea celular se selecciona entre COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa o HEK293.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
 - a) el aminoácido no natural se selecciona de para-acetil fenilalanina, p-nitrofenilalanina, p-sulfotirosina, p-carboxifenilalanina, o-nitrofenilalanina, m-nitrofenilalanina, p-boronil fenilalanina, o-boronilfenilalanina, m-boronilfenilalanina, p-aminofenilalanina, o-aminofenilalanina, m-aminofenilalanina, p-acilfenilalanina, o-acilfenilalanina, m-acilfenilalanina, p-OMe fenilalanina, o-OMe fenilalanina, m-OMe fenilalanina, p-sulfofenilalanina, o-sulfofenilalanina, m-sulfofenilalanina, 5-nitro His, 3-nitro Tyr, 2-nitro Tyr, Leu sustituido por nitro, His sustituido por nitro, De sustituido por nitro, Trp sustituido por nitro, 2-nitro Trp, 4-nitro Trp, 5-nitro Trp, 6-nitro Trp, 7-nitro Trp, 3-aminotirosina, 2-aminotirosina, O-sulfotirosina, 2-sulfooxifenilalanina, 3-sulfooxifenilalanina, o-carboxifenilalanina, m-carboxifenilalanina, p-acetil-L-fenilalanina, p-propargil-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfotirosina, p-yodo-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina y p-propargiloxi-L-fenilalanina; y/o
 - b) el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio a dicha proteína.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el gen de interés es un gen o producto bioterapéutico, opcionalmente en donde el gen o producto bioterapéutico es una vacuna.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el gen de interés codifica:
 - a) un anticuerpo, scFv, proteína de fusión scFv, proteína de fusión Fc, Factor VII, Factor VIII o Factor IV;
 - b) una citoquina, interleucina, interferón, quimiocina, factor de crecimiento, hormona, o un receptor, análogo, biespecífico o fragmento de los mismos; o
 - c) HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptina, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulina, TNFR1, TRAIL, EPO, o un análogo, biespecífico o fragmento de los mismos.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:
 - a) el uno o más sitios o regiones diana están total o parcialmente inactivados;
 - b) el uno o más sitios o regiones diana son iguales o diferentes;
 - c) el codón selector es un codón sin sentido, un codón raro, un codón de cuatro bases; y/o
 - d) el codón selector es un codón ocre, un codón ópalo o un codón ámbar.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para optimizar el rendimiento de una proteína que contiene aminoácidos no naturales en la línea celular, opcionalmente en donde el rendimiento de la proteína que contiene aminoácidos no naturales es por lo menos 0,5 veces o mayor que en ausencia de inactivación del uno o más sitios o regiones diana.
9. Un método para disminuir o reducir la apoptosis en una célula, en donde la célula expresa un gen de interés que

contiene un codón selector, y en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt), el método comprendiendo la inactivación de uno o más sitios o regiones diana proapoptóticas en la célula, en donde el uno o más sitios o regiones diana proapoptóticas se seleccionan entre Bax y Bak.

- 5
10. Un método para generar una célula o línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, el método comprendiendo: proporcionar una célula o línea celular que exprese un gen de interés que contenga un codón selector, y que comprenda una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt); introducir en la línea celular una molécula de ácido nucleico capaz de inactivar uno o
- 10 más sitios o regiones diana en la célula o línea celular, en donde el uno o más sitios o regiones diana es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak; opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona de las SEQ ID NO: 1-6, y además opcionalmente proporcionar un aminoácido no natural a la célula o línea celular.
- 15 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende inactivar tanto Bax como Bak, y en donde el gen de interés codifica un anticuerpo.
- 20 12. Una célula o línea celular que tiene apoptosis reducida para incorporar un aminoácido no natural en una proteína, en donde la célula expresa un gen de interés que contiene un codón selector, en donde la célula comprende una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS), y un ARNt supresor ortogonal (O-ARNt); y en donde la célula comprende uno o más sitios o regiones diana inactivadas, en donde el uno o más sitios o regiones diana inactivados es un gen proapoptótico implicado en una vía apoptótica, en donde el gen proapoptótico se selecciona entre Bax y Bak
- 25 13. La célula o línea celular de la reivindicación 12, que comprende una molécula de ácido nucleico capaz de inactivar el uno o más sitios o regiones diana en la célula, opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona de las SEQ ID NO: 1-6.
14. La célula o línea celular de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en donde:
- 30 a) la célula o línea celular:
- (i) es una línea celular eucariota; y/o
- (ii) se selecciona entre una línea celular transitoria, una población de líneas celulares estables o una línea celular clonal estable, opcionalmente en donde la población de líneas celulares estables es una línea celular de plataforma o de producción; o
- 35 b) la célula o línea celular se selecciona de COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa o HEK293; y/o
- 40 c) el codón selector es:
- (i) un codón sin sentido, un codón raro, un codón de cuatro bases; o
- (ii) un codón ocre, un codón ópalo o un codón ámbar.
- 45 15. La célula o línea celular de cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que el gen de interés es un gen o producto bioterapéutico, opcionalmente en la que el gen o producto bioterapéutico es una vacuna.
16. La célula o línea celular de cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde el gen de interés codifica:
- 50 a) un anticuerpo, scFv, proteína de fusión scFv, proteína de fusión Fc, Factor VII, Factor VIII o Factor IV;
- b) una citoquina, interleucina, interferón, quimiocina, factor de crecimiento, hormona, o un receptor, análogo, biespecífico o fragmento de los mismos; o
- c) HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptina, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulina, TNFR1, TRAIL, EPO, o un análogo, biespecífico o fragmento de los mismos.
- 55 17. La célula o línea celular de cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en donde tanto Bax como Bak están inactivados, y en donde el gen de interés codifica un anticuerpo.

A.**Línea celular & desarrollo del proceso**

- Generación de huésped/vector/línea celular
- Prueba, almacenamiento y caracterización de líneas celulares
- Desarrollo del proceso
- Producción de planta piloto
- Desarrollo del ensayo
- Formulación

Fabricación

- Producción de cGMP
- Escalar a >2000L
- Gramos a kilogramos

**Descubrimiento de anticuerpos**

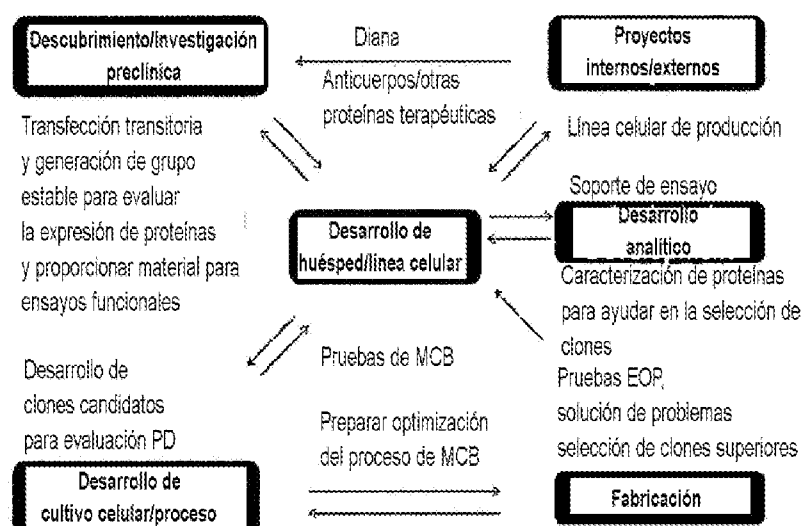
- Manipulación de Ab
- Humanización de AB
- Desarrollo del ensayo
- Biología funcional

Desarrollo**Preclínico**

- Ensayos in vitro
- Modelos in vivo
- Tox habilitante de IND

Desarrollo clínico**y Asuntos reguladores**

- Fase I
- Fase II
- Fase III

B.**FIG. 1**

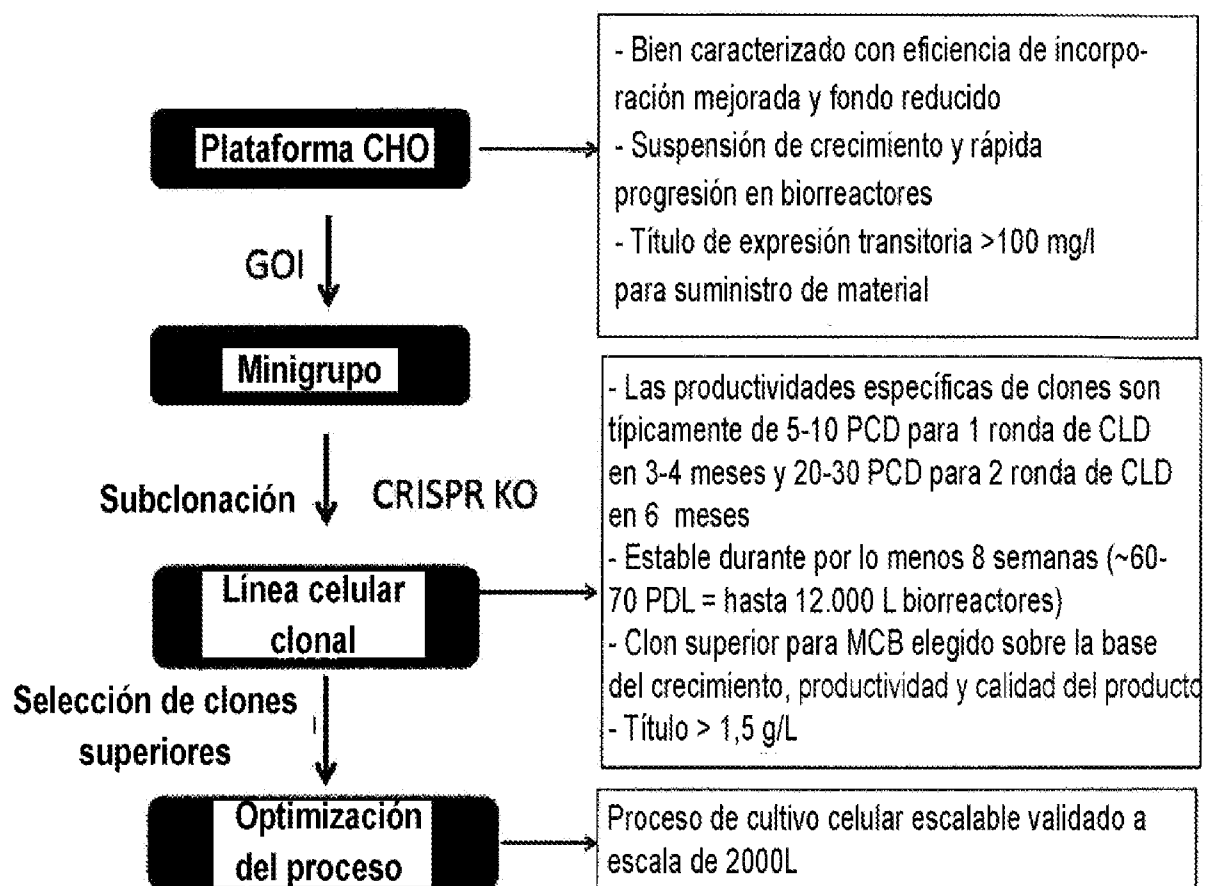


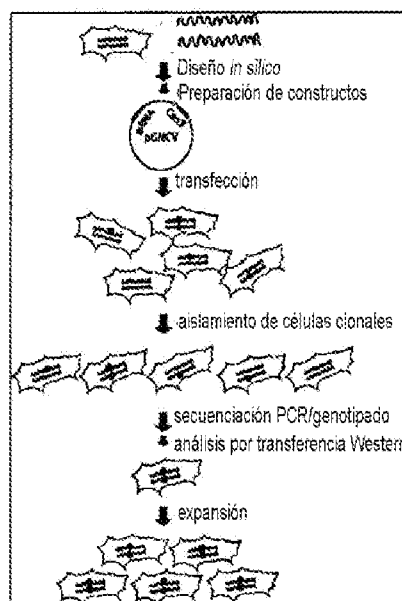
FIG. 2

FACS SCD proporciona 3 veces de crecimientos monoclonales que la LDC tradicional

A.

	Densidad de sembrado	Tasa de depósito	Tasa de crecimiento	Tasa de crecimiento monoclonal
FACS SCD	1 célula/pocillo	63%	53%	49%
LDC	0,5 célula/pocillo	72%	65%	32%

B.



Programa CRISPy (específico de CHO)

- Cero secuencias de ARNg fuera de diana
- Exones tempranos

Ensayo Surveyor de células agrupadas

- 30-90% de eficiencia de KO

Selección y Caracterización

1. Secuenciación de ADN dirigido a HT
50-80% de eficiencia de KO

2. Análisis por transferencia Western
50-90% de eficiencia de KO

3. Ensayo funcional

C.

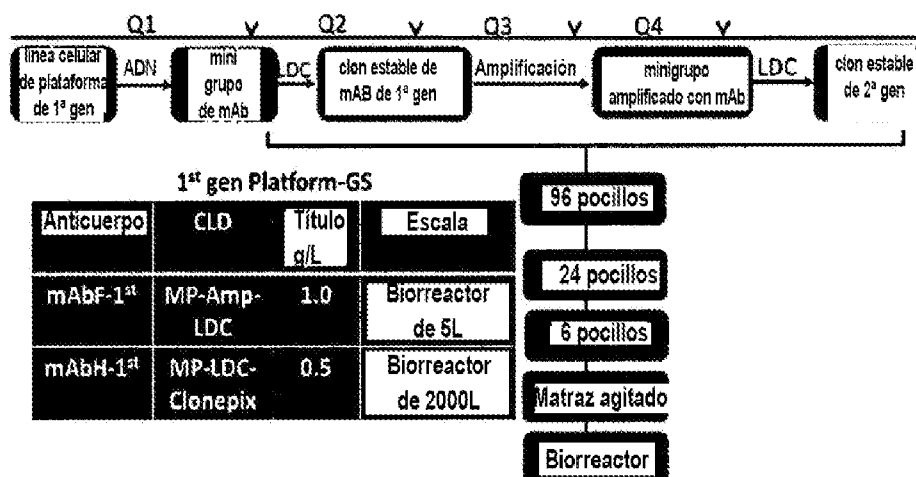
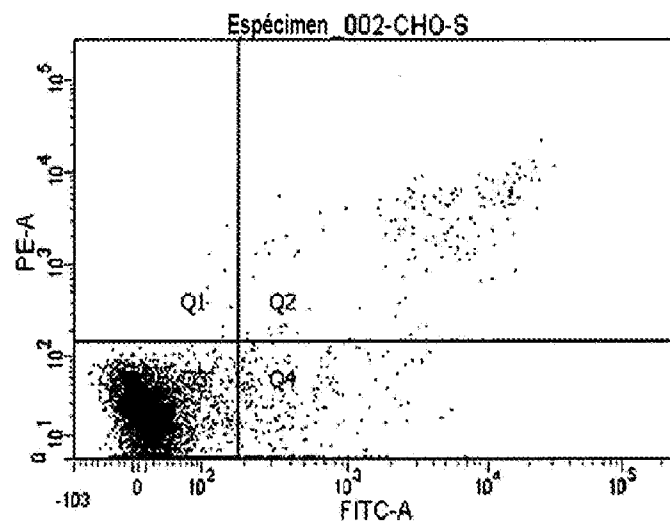
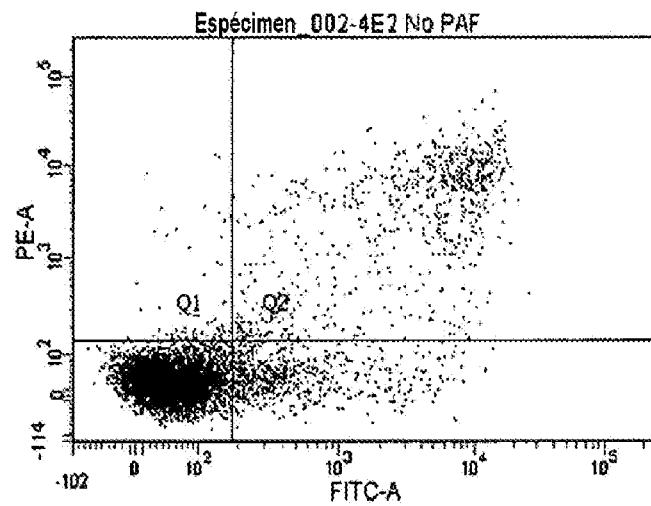


FIG. 3

A.



B.



Línea celular	Célula viable (Q3)	Célula apoptótica temprana (Q4)	Células apoptóticas tardías (Q2)	Células muertas (Q1)
CHO-S	96 %	2.4 %	1.5 %	0.1 %
4E2	85 %	6.7 %	7.4 %	0.7 %

FIG. 4

Cebador directo X-F

1 GGGTTATGAG CCTCCCTAGC CCCCTGGCTC TTCCCGGAAC CTAGAGTCC AGGACTCCT TCCCTCCTCT CTCCACCAGG
 CCCAATACTC GGAGGGATCG GGGGAGGAG AAGGGCCTTG GATCCTCAGG TCCGTGAGGA AGGAGGAGA GAGGTGGTCC

Sitio de ARNg II

90 GCCCACCAGC TCTGAGCAGA TCATGAAGAC AGGGCCCTTT TTGCTACAGG GGTGAGTGTG AGGCGCTGTT GTGGTGGGGT
CGGTGGTCTG AGACTCGTCT AGTACTTCTG TCCCCGGAAA AACGATGTCC GCATCAGAC TCCGCGACAA CACCACCCCA
 Sitio de ARNg III

Exon 1

176 GGGCTTCAGG AGCAAGGCTC AGTTCCCACT CTGCGCCTCC GTCCCCCGGC TTCCATTCAC ATCTAGTTTC ATCCAGTATC
 CCCGAAGTCC TCGTTCCGAG TCAAGGGTGA GACGCGGAGG CAGGGGGGCG AAGGTAACTG TAGATCAAG TAGGTCAATAG

Exon 2

250 GAGCTCGGAG GATGGCCCGG GATACACCTG AGCTGACCTT GGACAGCCA CCCCAGGATC CGACCAACAA GAAGTIGAGC
CTCGACCTC CTACCGGCC CTATGTGGAC TCGACTGGAA CCTCGTCGCT GGGTCTCTAG GCTGGTGGT CTTCACCTCG
 Sitio de ARNg I

330 GAGTGCCTCA GGGGAATTGG AGATGAGCTG GACAGCAACA TGGAGCTGCA GAGGTGTGGT TCCTGGGTCC TGGGGTCCAT
CTCAGGGAGT CCGCTTAACC TCTACTCGAC CTGTCTGTGT ACCTCGAGCT CTCCACACCA AGGACCCAGG ACCCCAGGTA

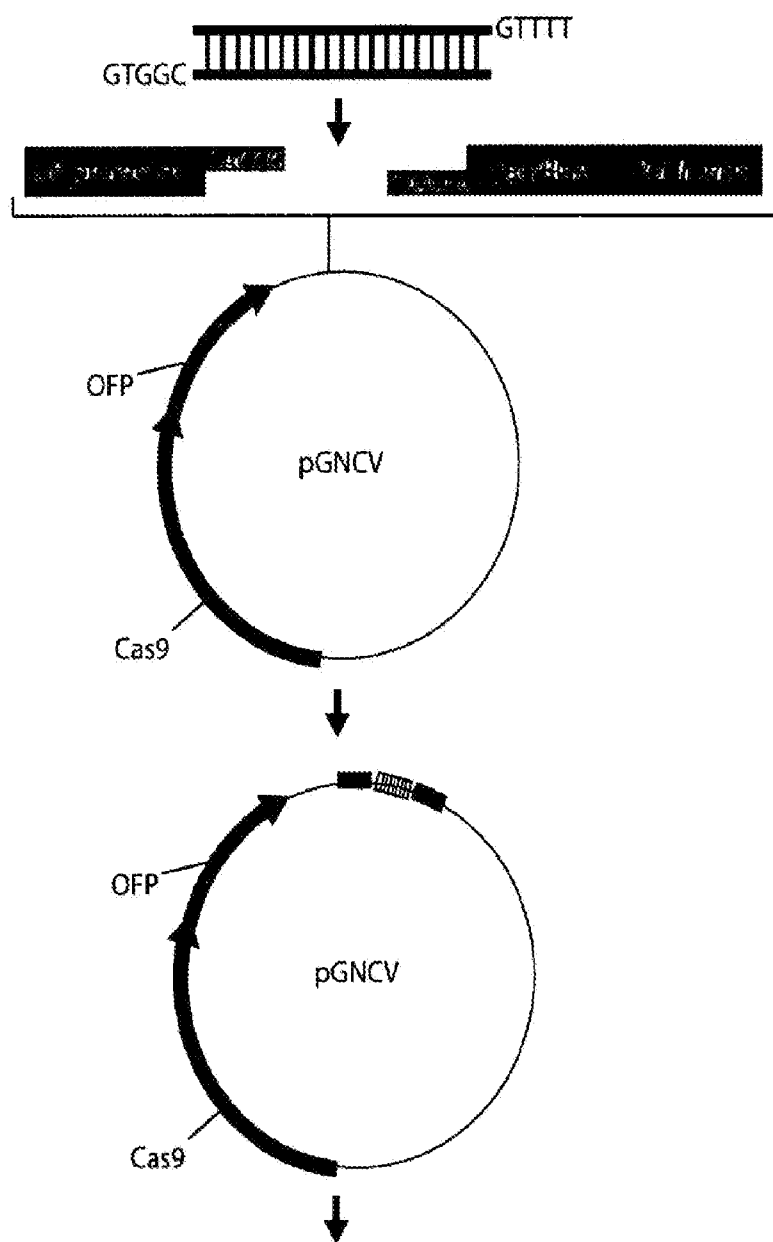
410 CCGGGGATTT CGTGTACCT CAAGAACTCA GGCATCGTAC ACTCTTGTCC TCCCAGGGA CCAGGTGTTT CACCCTTCA
 GGGCCCTAAA GCACAATGGA GTTCTTGAGT CCGTAGCATG TGAGAACAGG AGGTTCCCT GGTCACAAAG GTGGTGAAGT

490 GATATTCCGT GCTGGGCATA GAATCCAGG TCTCTTTACA TGGTAGCC
CTATAAGCA CGACCCGTAT CTTAGGTCCC AGAGAAATGT ACCATCGG
 Cebador inverso X-R

FIG. 5

Cebador directo K-F :	
1	CAGACAGCCT TCTCTTGCTG ACTCCACGCT CTGACCCGAG AACAGCAGGT GGCCGAGSAC ACAGAGGAGG TCTTTCGAGG
81	GTCTGTGCGA AGAGAACGAC TGAGGGGTGSA GACTGGGGTC TTGTGTGTCG CCGGGTCTG TGCTCTCTCC AGAAGGCTTC
	CTATGTTTTC CATCTCCACC ATCAGGAACA AGAGACCCAG GGGGGGGCTG CCCCTGCGAA CCGGAGATG GACATTTGG
	GATACAAAAG GTAGAGGTGG TACTCCTTGT TCTCTGGGTC CCCCCTGHC GGGGACGCTT GGGGCTCTAC CTGTTAAACG
Exon 2	
161	TCCTAGAAC CAACAGGTAA GCTCCAGCCC CAGGGGGACA GGTCOCGGGG GGAGGGGGAC TGGACTATC TCTGTCTATCT
241	AGGATCTTGG GTGTCTCATT CGAGGTGCGG GTCCCTCTGT CCAGGGCCCC CTTCCCTCTG ACCTGAATAG AGACAGTAGA
321	CTCTCCCTTC TCAATCTGGT CCCCCCCCCA TGTGAGTCC TATACTCCTT TCAGGACATG CCGGTCTCTT CTTAGGCACA
401	GAGAGGGAAG AGTTAGACCA GGGGGGGGGT AGAGTCTAGG ATATGAGGAA AGTCTCTTAC GGGCAGGACA GGAATCGTGT
	GCCCTCCTGG CCACTGTGGA GGACGTTGGC GGTCGGGGT AAGTCTGCT CCTACCCCCA CCCCAGGAGA ATCCATTTCTG
	CGGGAGGACC GGTGACAGCT CTTGCAACCG CCACTCCCCA TTTCAGACGA GGATGGGGT GGGGTCTCTT TAGGTAAGAC
	TGCCACGAGC CGGGTTCCCA ATCTCCAACT CCGGTCTTCA CAGCATCTTG GGTGAGGTGG GCGGGCAGCT TGCTATTCATT
	ACGGTGTCTG GCGCAAGGGT TAGAGGTTGA GGGCAAGAA GTGTAGAAC CCAGTCCACC CGGCGCTCGA ACGATAGTAA
Exon 3	
481	GGAGATGACA TTAACGGGAG ATAGACACA GAGTCCAGA ATTACTTGA GCAGCTGAG CCCACAGCTG GGAATGCCCTA
561	CTCTTACTGT AATTGGCTC TATCTGTGT CTCAGGTCT TAATGACCT CGTCGAGCTC GGTGTCTGAC CTTACGGAT
641	CGAATCTTC ACCAAGATTG CTTCCAGTA CCAACACCA CCTGACCCAG CACACAGTG ATGGGTCCC TGGCTGGGA
721	GCTTGAGAAG TGGTCTTAC GGAGGTTCAT GGTGCTGGT GACTGGGTC GTGTGTGAC TACCCGAGG ACCGACCCCT
	CCGAGTTCTG GAACTCAGAT ACGATCCCCG CCACTCTCC CGTCTCTGG CCCCCTGCG TGTCTTCTGC ATACTTGCTG
	GGCTCAAGCA CTTGAGTCTA TGCTAGGGG GGTAGAGGG GCAGAGACCC GGGGTGACCG ACAGAAGAGG TATGAACGAC
	TCATGCCCTC CAGGAGCTCT
	AGTACGGAGA GTCTTCGAGA
Cebador directo K-R	

FIG. 6



transfección, depósito de células individuales, selección por secuenciación de ADN

FIG. 7

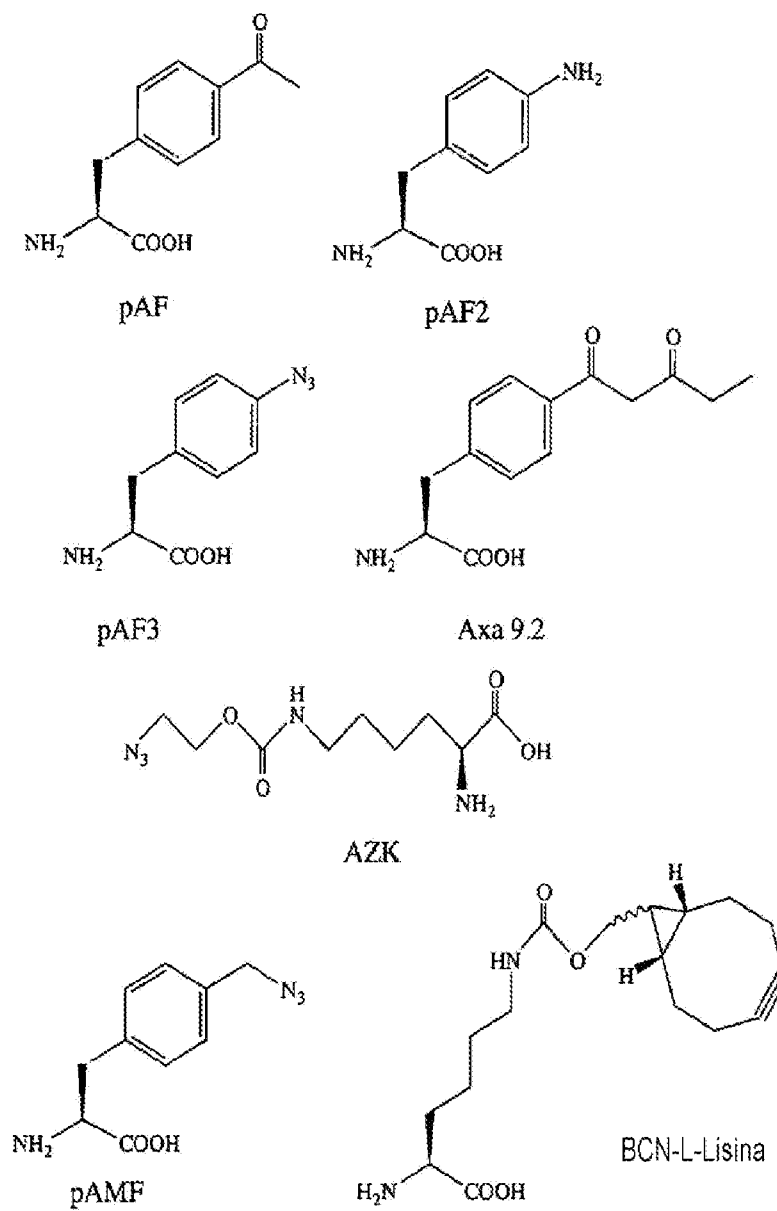


FIG. 8

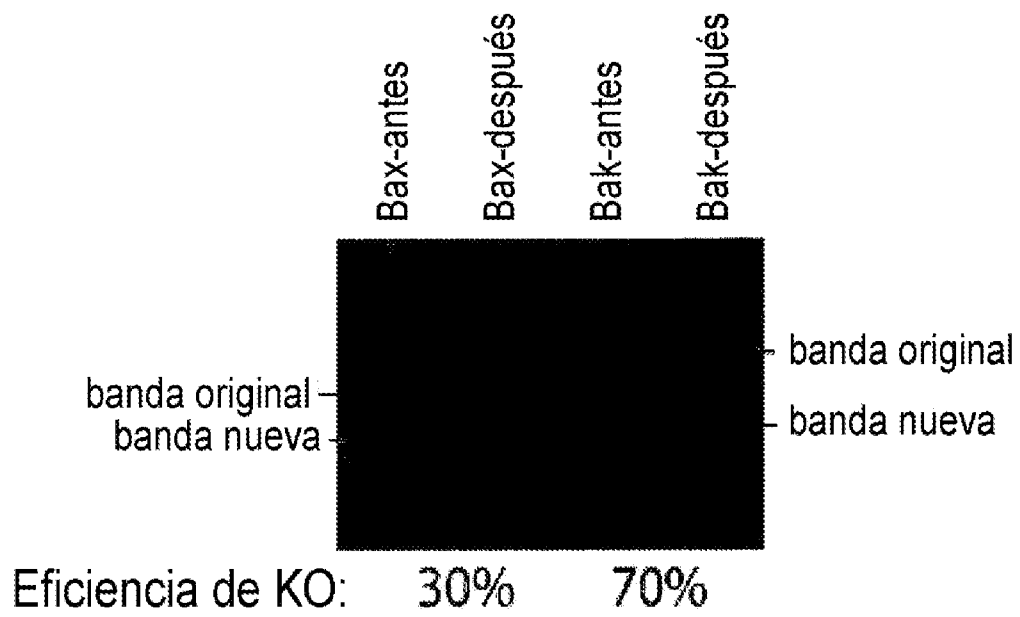


FIG. 9

	(447)	447	460	470	480	490	3'
Bak-CHO-gDNA1	(418)	CCAAATCTCCAACTCCGGTTCCTTACAGCA					
YA_082_K2_BakI-II	(388)	CCAAATCTCCAACT		TACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_084_K4_BakI-II	(388)	CCAAATCTCCAACT		ATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_086_K6_BakI-II	(107)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_088_K8_BakI-II	(108)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_090_K10_BakI-II	(106)	CCAAACCCCGA	CA	TTAACCCCGATATTAACCCGAGAT			
YA_092_K12_BakI-II	(106)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_093_K13_BakI-II	(110)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
YA_095_K15_BakI-II	(103)	CCAAACCCCGA	G	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_097_K17_BakI-II	(388)	CAAAATGTCCATCC	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_098_K18_BakI-II	(388)	CCAAATCTCCAACT	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_100_K20_BakI-II	(96)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_101_K21_BakI-II	(97)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_103_K23_BakI-II	(104)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_105_K25_BakI-II	(389)	CCAAATCTCCAACT	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_106_K26_BakI-II	(389)	CCAAATCTCCAACT	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_108_K28_BakI-II	(104)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_109_K29_BakI-II	(373)	CCAAATCTCCAACT	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_110_K30_BakI-II	(104)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_111_K31_BakI-II	(98)	CCAAACCCCGA	C	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_112_K32_BakI-II	(387)	CCAAATCTCCAACT	CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				

FIG. 10

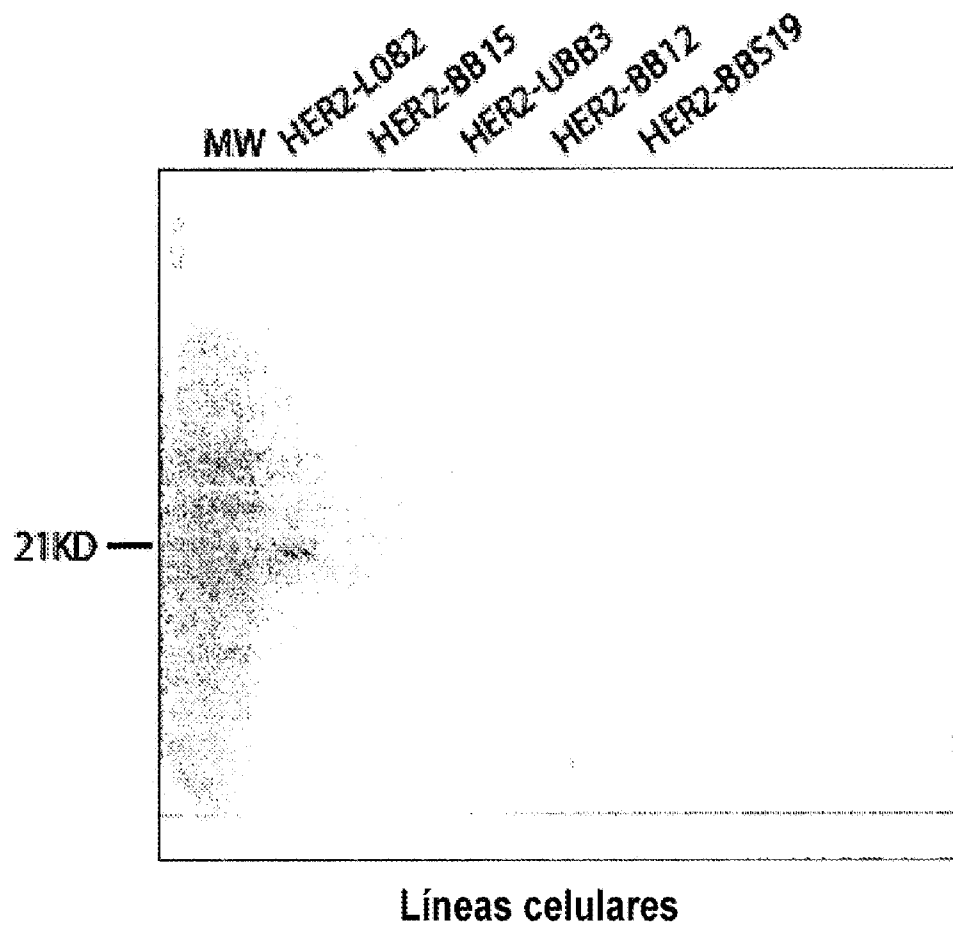
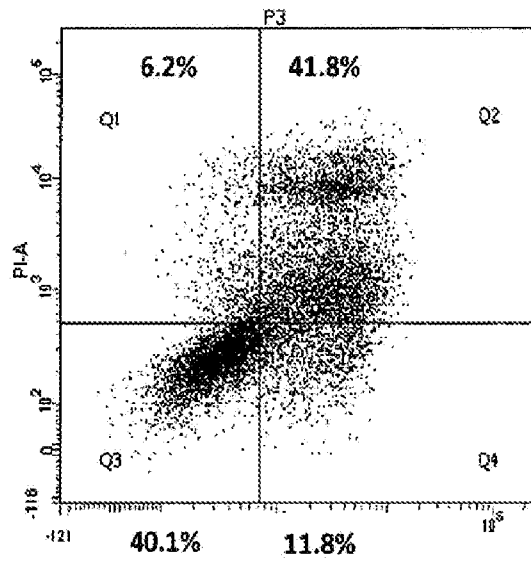
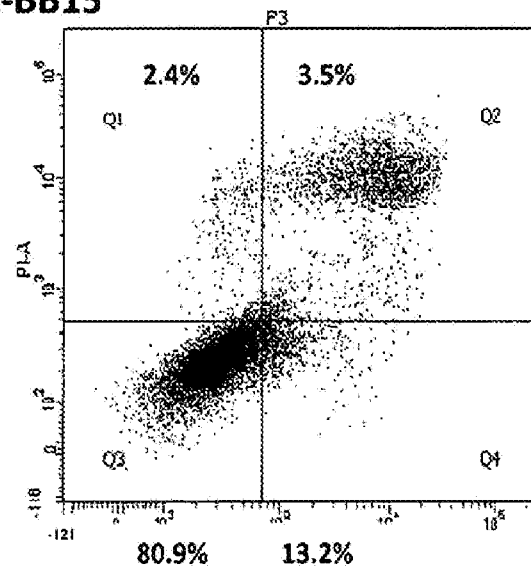


FIG. 11

A. HER2-L082



B. HER2-BB15



Línea celular	Célula viable (Q3)	Célula apoptótica temprana (Q4)	Célula apoptótica tardía (Q2)	Célula muerta (Q1)
HER2-L082	40.1%	11.8%	41.8%	6.2%
HER2-BB15	80.9%	13.2%	3.5%	2.4%

FIG. 12

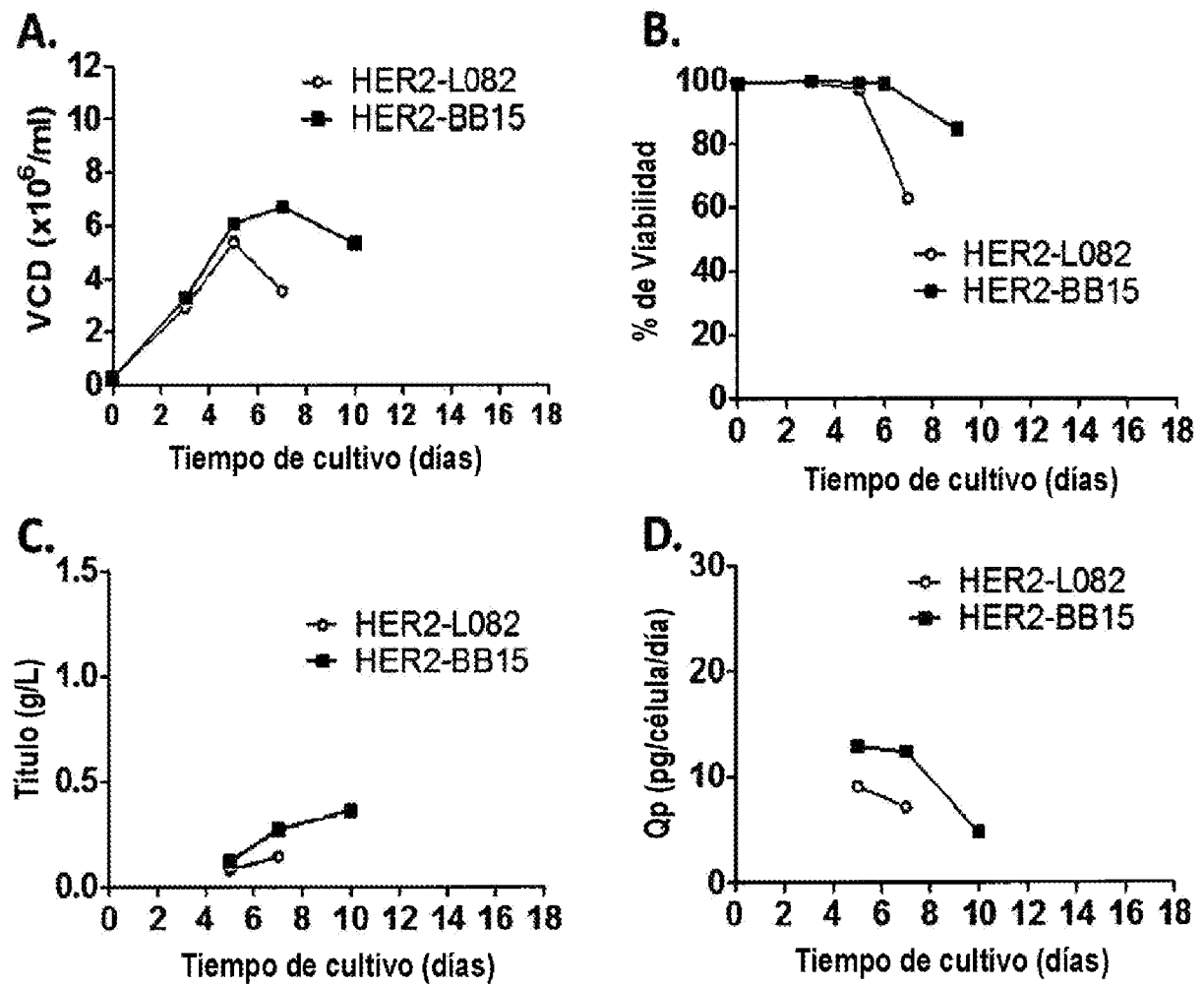


FIG. 13

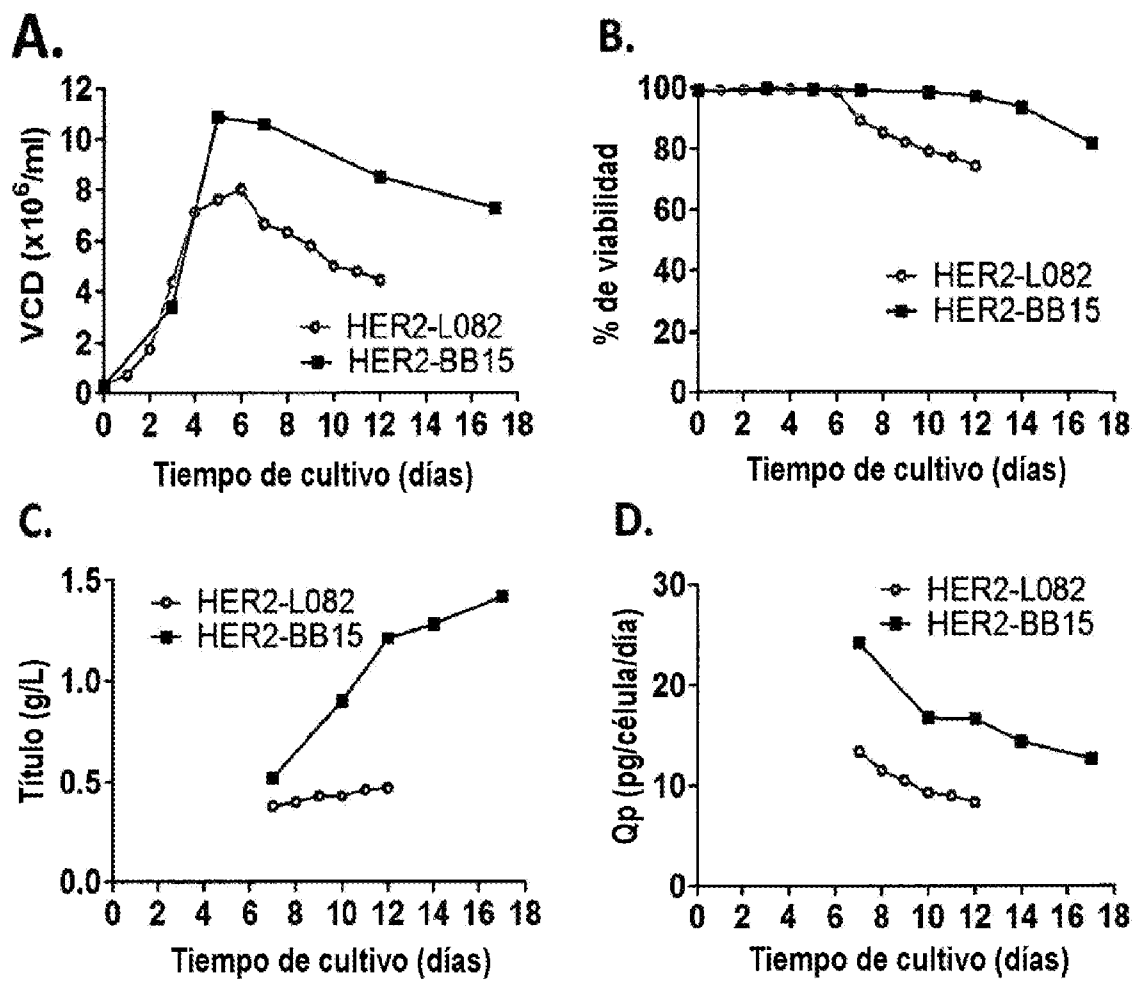


FIG. 14

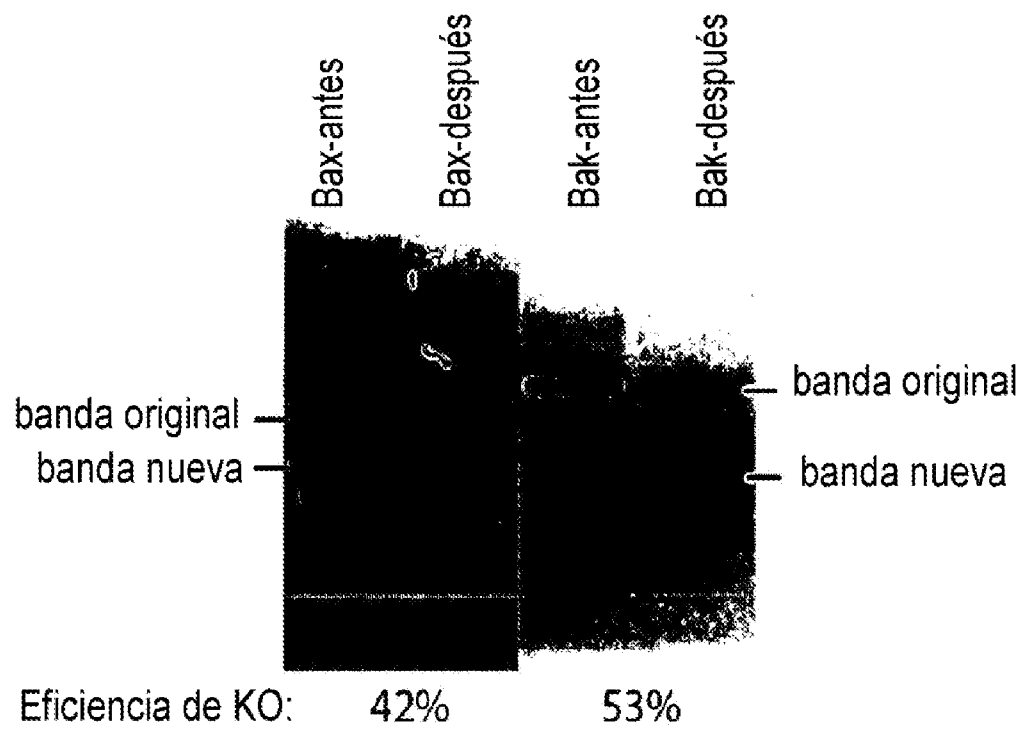
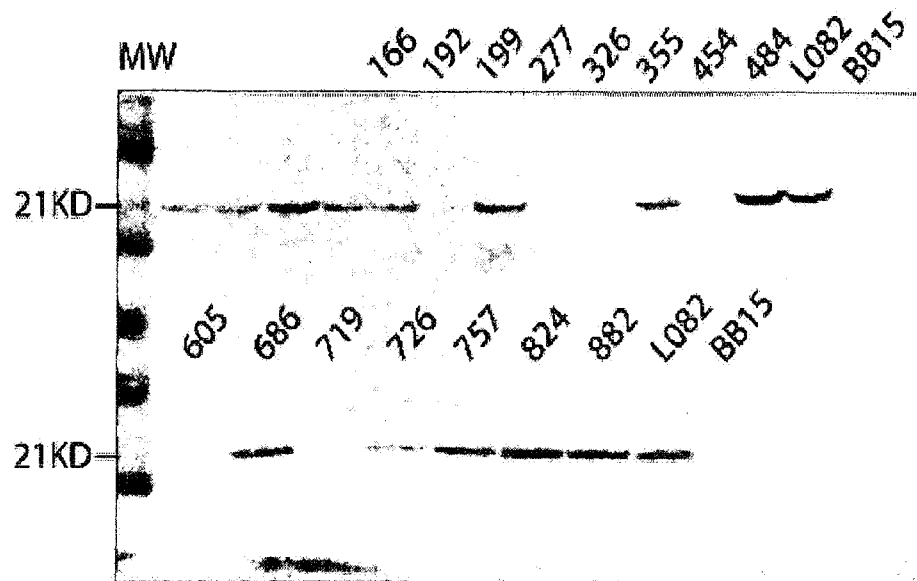


FIG. 15

A.



B.

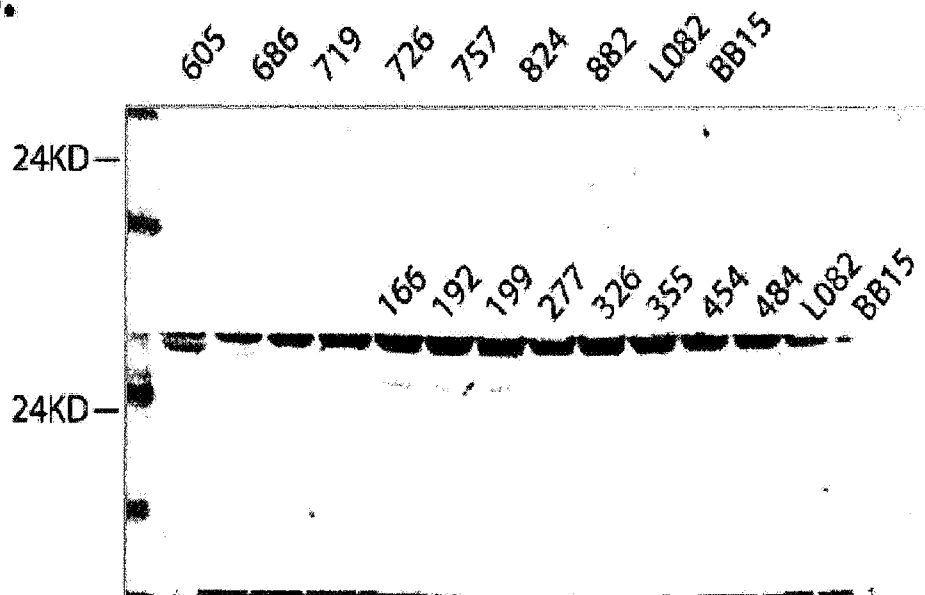


FIG. 16

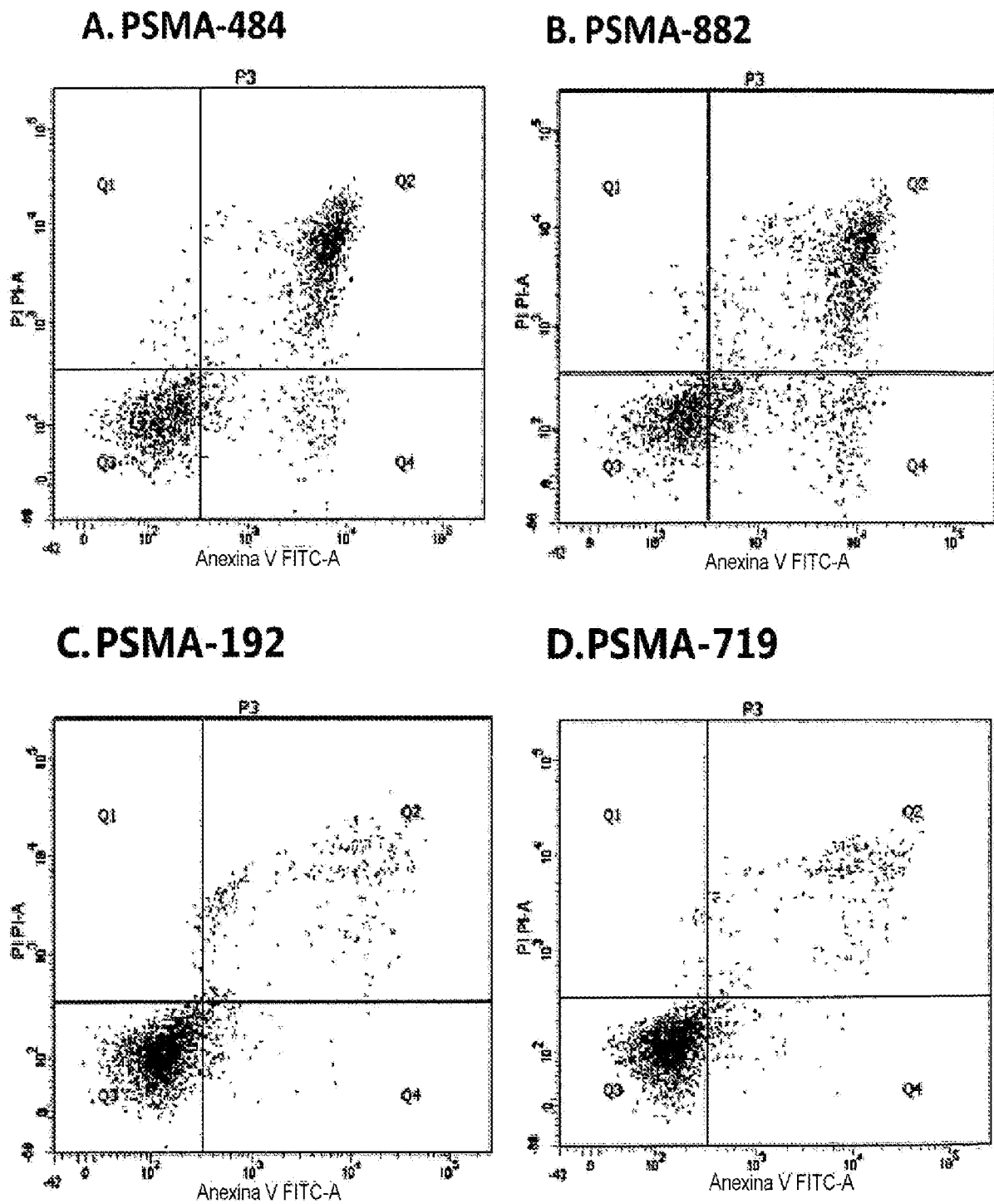


FIG. 17

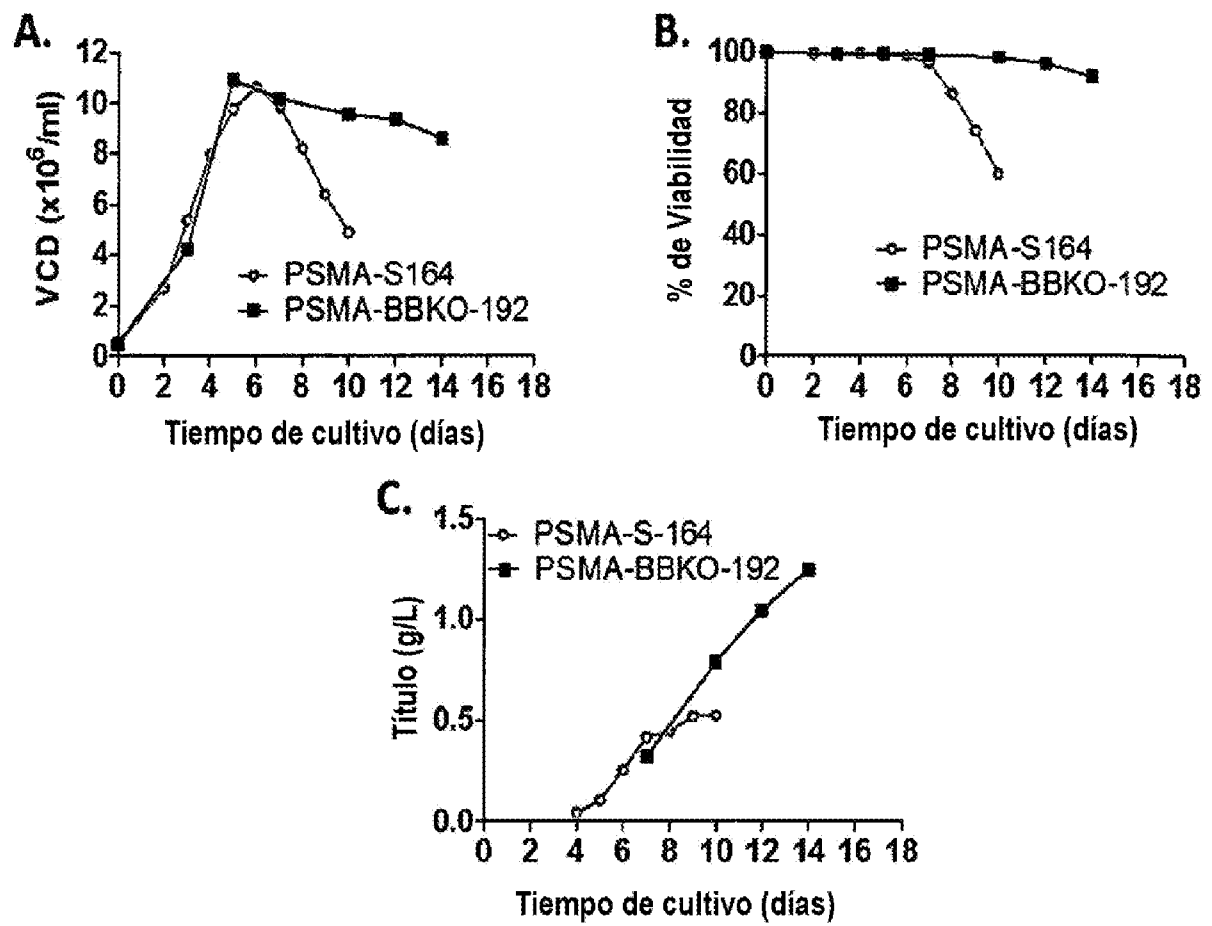


FIG. 18

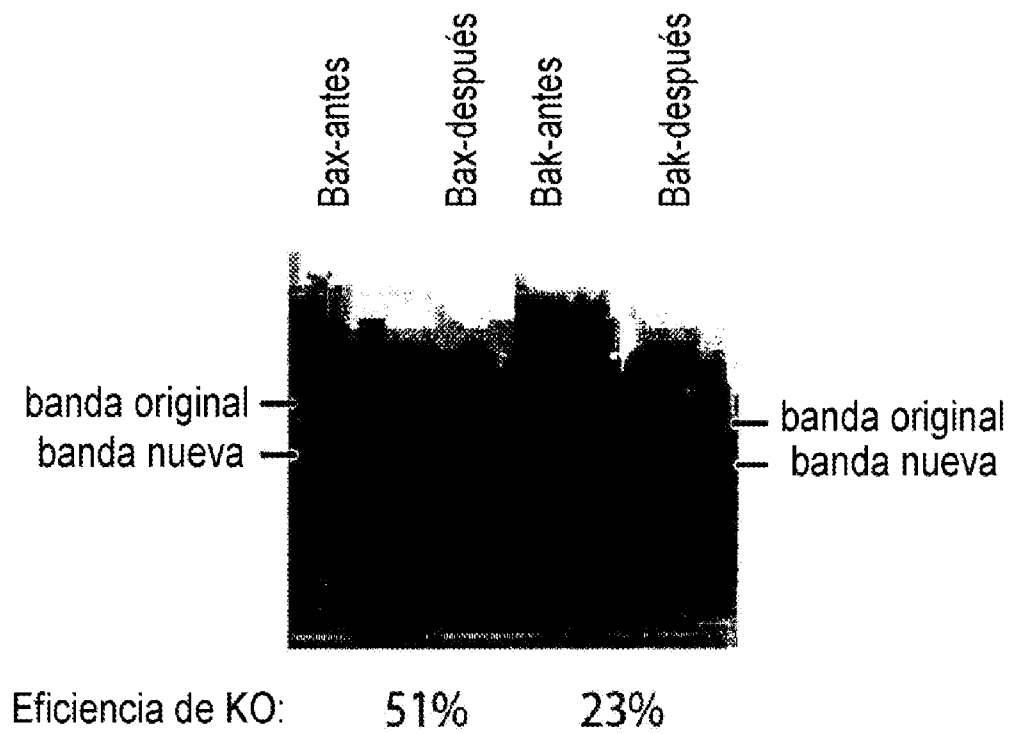


FIG. 19

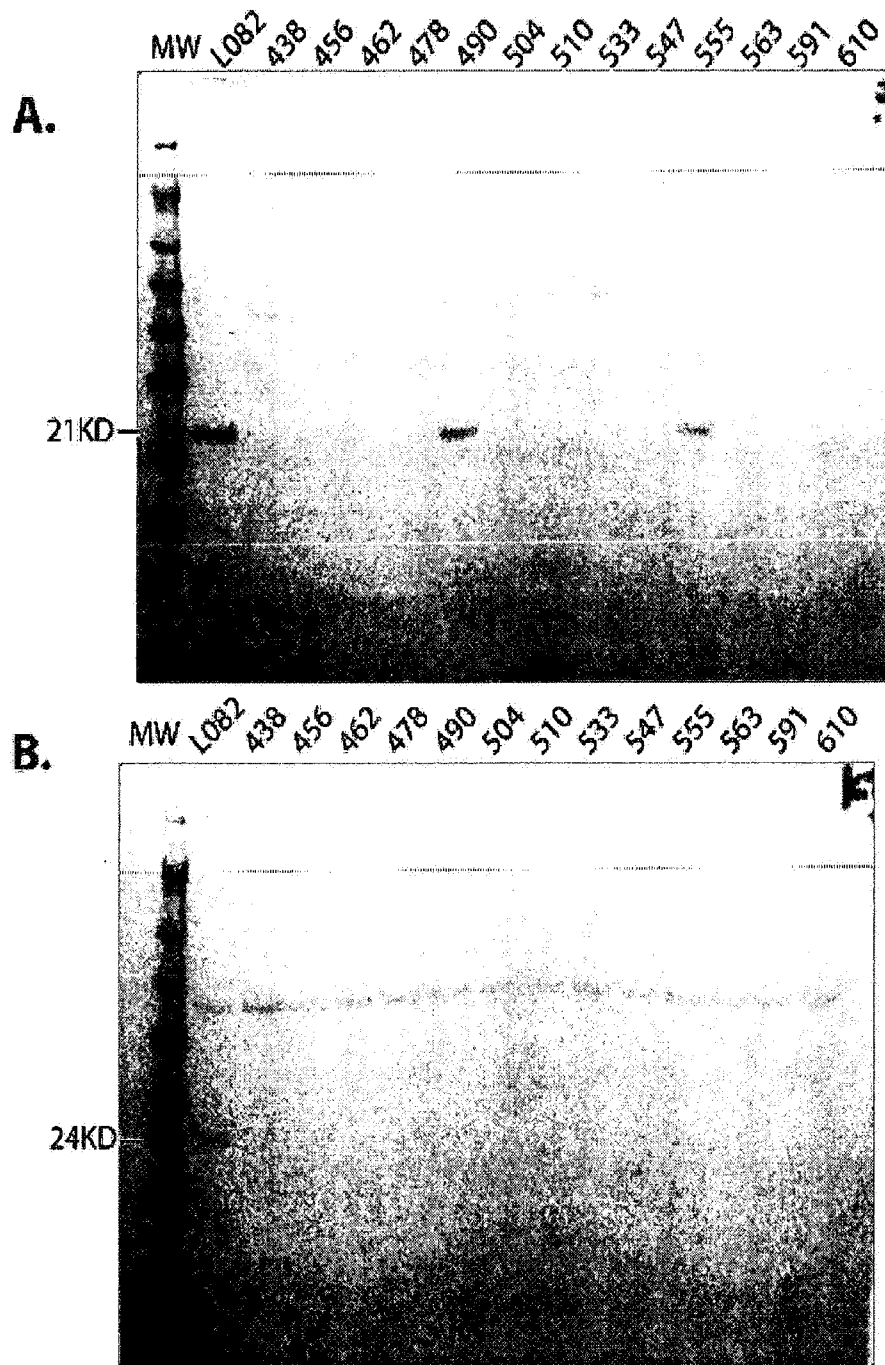
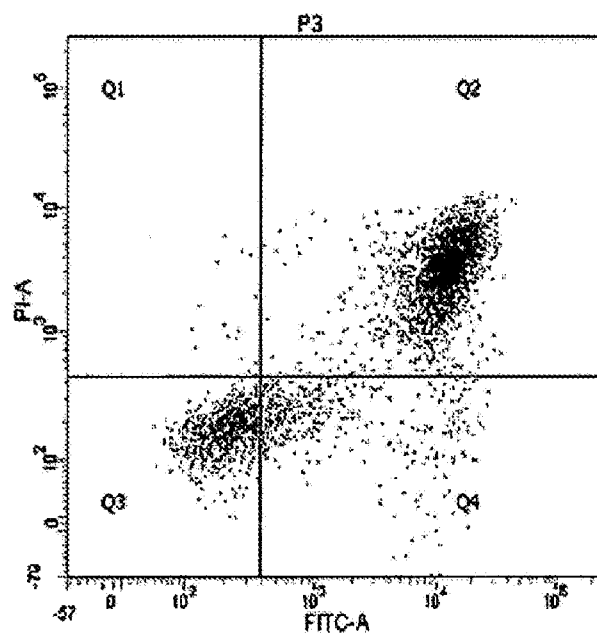
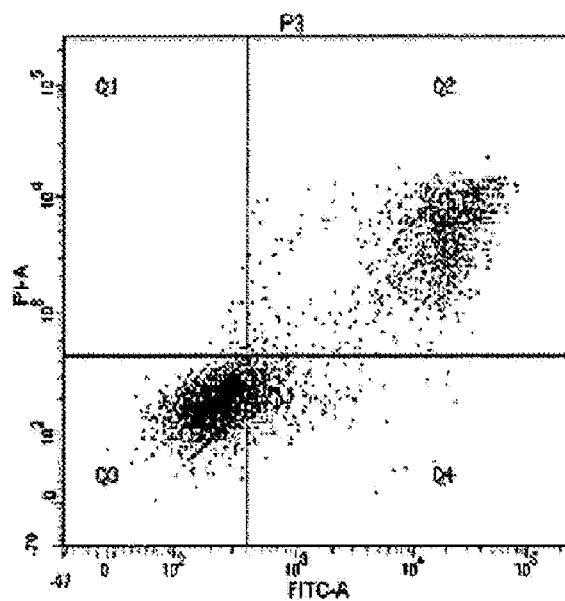


FIG. 20

A. CD70-MW-108



B. CD70-BBKO-563



Línea celular	Células viables (Q3)	Células apoptóticas tempranas (Q4)	Células apoptóticas tardías (Q2)	Células muertas (Q1)
CD70-MW-108	18.3 %	8.8 %	72.5 %	0.3 %
CD70-BBKO-563	60.3 %	11.4 %	27.9 %	0.5 %

FIG. 21

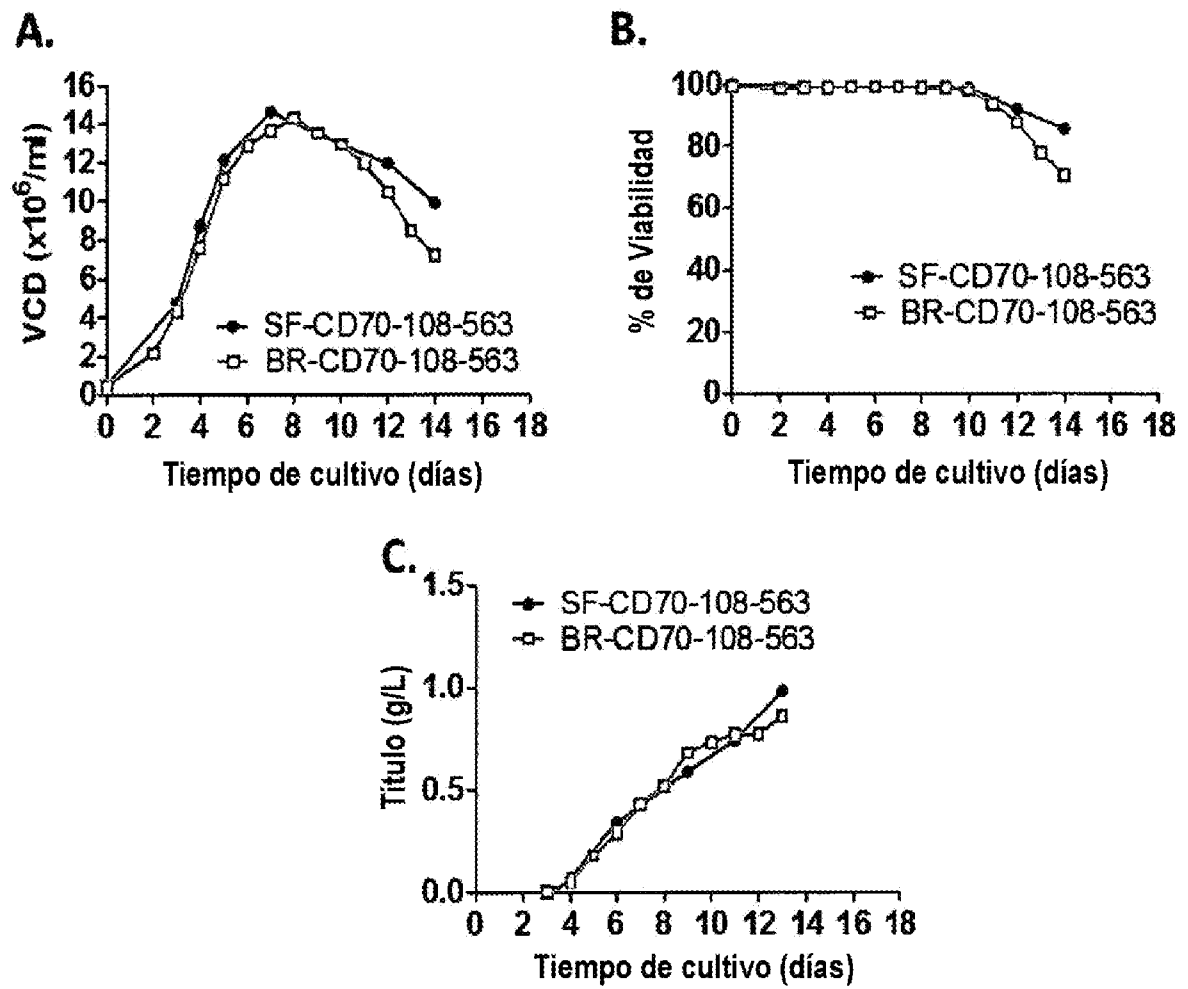


FIG. 22