

CÉLULAS PARA GLUCOINGENIERÍA Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[0001]** Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 63/639,286, presentada el 26 de abril de 2024. La totalidad de la solicitud mencionada anteriormente se incorpora en la presente como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0002]** La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó eléctricamente en formato .xml y por lo tanto se incorpora como referencia en su totalidad. La copia .xml, creada el 17 de junio de 2024, se nombró "A1000-01700PCT_20240617_SeqListing.xml" y es de 77 kilobytes en
15 tamaño.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente divulgación se relaciona con composiciones y métodos para la ingeniería de glucoproteína y la producción de anticuerpos terapéuticos diseñados por glucoingeniería.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Durante los últimos años, los productos terapéuticos basados en proteínas han ganado cada vez más prominencia en casi todos los campos de la medicina. La mayoría de esas terapias proteicas son glucoproteínas y los glicanos en esas
25 glucoproteínas han probado se esenciales y determinantes de la

eficacia terapéutica. Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales de esos agentes biológicos, particularmente hacia sus estados de glucosilación, han llamado cada vez más la atención en sectores académicos e industriales. Con la
5 tendencia actual para producir terapias proteicas en plataformas de expresión en mamíferos, existe una necesidad continua de plataformas que ofrezcan un perfil de glicano deseado que sea favorable para mejorar la eficacia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 **[0005]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona una célula para expresar una glucoproteína sialilada, en donde la célula expresa de manera constitutiva y/o controlable un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y un péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena, en donde el
15 péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se traducen en estrecha proximidad.

[0006] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la glucoingeniería de una glucoproteína
20 recombinante que comprende: proporcionar un vector de expresión en una célula de acuerdo con una modalidad de la presente divulgación, en donde el vector de expresión comprende un ácido nucleico de carga útil nucleico configurado para codificar la glucoproteína recombinante; y expresar el ácido nucleico de
25 carga útil nucleico en la célula, obteniendo por lo tanto una

pluralidad de glucoproteínas recombinantes, donde al menos una glucoproteína recombinante de la pluralidad se conjuga con un glicano sialilado.

5 **[0007]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona una pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas, en donde al menos el 50% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se configura con un glicano sialilado.

10 **[0008]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona una célula para expresar una glucoproteína GlcNAc, que es deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y que expresa de manera constitutiva o controlable una endoglucosidasa exógena.

15 **[0009]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante, que comprende: proporcionar un vector de expresión en una célula de acuerdo con una modalidad de la presente divulgación, en donde el vector de expresión comprende un ácido nucleico de carga útil nucleico configurado para codificar una glucoproteína recombinante; y expresar el ácido nucleico de carga útil nucleico en la célula, obteniendo por lo tanto una pluralidad de glucoproteínas recombinantes, donde al menos una glucoproteína recombinante de la pluralidad se conjuga con un glicano GlcNAc.

25 **[0010]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona una pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas, en

donde al menos el 50% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se configura con un glicano GlcNAc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **[0011]** La Figura 1 es una representación gráfica de un ensayo de citometría de flujo que muestra los resultados ejemplares de un ensayo de tinción de SNA realizado para examinar el Adalimumab ejemplar producido mediante el uso de las células CHO ejemplares (SWG-006) de la presente divulgación. Una célula comparativa transfectada con B4GALT1 y ST6GAL1 configurada para ser expresada en transcripciones separadas y una célula no transfectada (es decir, una célula parental, como control negativo). En esta modalidad ejemplar particular los anticuerpos Adalimumab producidos por las células ejemplares (SWG-006) de la presente divulgación tenían una población
10 positiva a SNA del 5.44%. Los anticuerpos Adalimumab producidos por la célula comparativa tenían una población positiva a SNA del 4.58%. La célula parental expresada al 0.022% de anticuerpos Adalimumab positivos a SNA.
15

20 **[0012]** La Figura 2 es una representación gráfica de un ensayo de citometría de flujo que muestra los resultados de un ensayo de tinción de SNA realizado para examinar el Adalimumab producido utilizando células CHO SWG-006 ejemplares de la presente divulgación, la célula SWG-015 ejemplar de la presente divulgación y las células sin transfectar (es decir, una célula
25 parental, como control negativo). Los anticuerpos Adalimumab

producidos por las células SWG-006 de la presente divulgación tenían una población positiva a SNA de 39.8%. Los anticuerpos Adalimumab producidos por las células SWG-015 de la presente divulgación tenían una población positiva a SNA del 28.5%. La
5 célula parental expresada 0.25% de anticuerpos Adalimumab positivos a SNA.

[0013] La Figura 3A es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab producidos por un clon
10 estabilizado ejemplar SAII-A3 de la célula CHO SWG-006 de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la
15 forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0014] La Figura 3B es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab ejemplares producidos por un clon
20 estabilizado ejemplar SAI-G1 de la célula CHO SWG-006 de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la
25 forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular

representa fucosa.

[0015] La Figura 3C es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab ejemplares producidos por un clon estabilizado ejemplar SAI-D4 de la célula CHO SWG-006 de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0016] La Figura 3D es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab ejemplares producidos por un clon estabilizado ejemplar SAI-F12 de la célula CHO SWG-006 de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0017] La Figura 3E es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab ejemplares producidos por una célula CHO parental. No se observaron glicanos sialilados. La

forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

5 **[0018]** La Figura 4A es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para investigar los glicoformas de un producto comercial de Adalimumab (Humira®). No se observaron glicanos sialilados. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

15 **[0019]** La Figura 4B es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab producidos por una célula CHO parental. No se observaron glicanos sialilados. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

20 **[0020]** La Figura 4C es una representación gráfica de un espectro de LS/MS-MS realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos Adalimumab producidos por un clon estabilizado ejemplar SAII-A3 de la célula CHO SWG-006 de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados

25

se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular
5 representa fucosa.

[0021] La Figura 5A es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula HEK293T parental. No se
10 observaron glicanos sialilados. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0022] La Figura 5B es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación. Los glicanos sialilados se
15 marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular
20 representa fucosa.

[0023] La Figura 6 es una representación gráfica de los datos

de un análisis de glicoformas realizado para investigar los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula natural (es decir una célula parental) y una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación (una célula "diseñada").

5 Izquierda: porcentaje de glicano fucosilado; Parte media: porcentaje de glicano galactosilado; Derecha: porcentaje de glicano sialilado.

[0024] La Figura 7 es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para
10 demostrar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación, sin tratar (parte superior), tratados con neuraminidasa de *Streptococcus pneumonia* $\alpha 2-3$ (parte media) o tratados con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (parte
15 inferior). Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

20 **[0025]** La Figura 8 es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para demostrar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula comparativa transfectada con un gen hB4GalT1 pero sin el gen hST6GAL1. Los datos muestran que los
25 anticuerpos tenían mayor galactosilación generada a partir de

células con introducción (*knock-in*) de hB4GalT1 únicamente pero no mostró sialilación terminal. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0026] La Figura 9A es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los cambios en los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación durante cinco días. Parte superior: del Día 0 al Día 3 (muestras recolectadas el Día 3); Parte inferior: del Día 4 al Día 5 (muestras recolectadas el Día 5). Los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0027] La Figura 9B es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los cambios en los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula inactivada por FUT8 comparativa durante cinco días. Parte superior: del Día 0 al Día 3 (muestras recolectadas el Día 3); Parte inferior: del Día 4 al Día 5 (muestras recolectadas el Día 5). La forma

de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa manosa; la forma triangular representa fucosa.

5 **[0028]** La Figura 10 es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los cambios en los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación durante tres
10 días. Las muestras se recolectaron el Día 1 (Parte superior), Día 2 (Parte media) y Día 3 (Parte inferior) respectivamente. La forma de Diamante representa ácido siálico; la forma de círculo abierto representa galactosa; la forma cuadrada representa GlcNAc; la forma de círculo sólido representa
15 manosa; la forma triangular representa fucosa.

[0029] La Figura 11 es una representación gráfica de datos de ELISA que muestra la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por una célula natural (es decir una célula parental) y una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la
20 presente divulgación (una célula "enriquecida en SCT") a receptores FcγIIA (Izquierda), receptores FcγIIB (Parte media) y receptores FcγIIIA (Derecha). La unión del anticuerpo se midió por medio de un anticuerpo anti-IgG Fc humano conjugado con HRP.

25 **[0030]** La Figura 12A presenta el resultado de la

electroforesis de proteína que muestra que los anticuerpos chMC18370 expresados por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación (Endo H KI "+") y una célula parental GnTI-KO EXPI293 (Endo H LI "-") son diferentes en el peso molecular debido a que se observó un desplazamiento de banda.

[0031] La Figura 12B presenta el resultado del ensayo de transglucosilación que muestra que los anticuerpos chMC18370 expresados por una célula con introducción (*knock-in*) Endo H ejemplar, de acuerdo con la presente divulgación, tenía alta eficiencia de transglucosilación. La transglucosilación se observó dentro de 15 minutos.

[0032] La Figura 12C es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula parental (célula GnTI-KO EXPI293). La forma cuadrada representa GlcNAc y la forma de círculo sólido representa manosa.

[0033] La Figura 12D es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula con introducción (*knock-in*) Endo H ejemplar de acuerdo con la presente divulgación. La forma cuadrada representa GlcNAc y la forma de círculo sólido representa manosa.

[0034] La Figura 12E es una representación gráfica de los datos de un análisis de glicoformas realizado para investigar los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula GnTI-KO EXPI293, una célula con introducción de (*knock-in*) Endo H
5 ejemplar de acuerdo con la presente divulgación y una célula con introducción de (*knock-in*) Endo S2 ejemplar de acuerdo con la presente divulgación. Izquierda: porcentaje de glicanos del tipo de manosa; Derecha: porcentaje de mono-glicano GlcNAc.

[0035] La Figura 13A presenta el resultado de electroforesis
10 de proteína que muestra que los anticuerpos chMC18370 expresados por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación (Endo S2 KI "+") y una célula GnTI-KO EXPI293 parental (Endo S2 KI "-") son diferentes en el peso molecular puesto que se observó un desplazamiento de banda.

[0036] La Figura 13B presenta el resultado de un ensayo de
15 transglucosilación que muestra que los anticuerpos chMC18370 expresados por una célula con introducción (*knock-in*) Endo S2 ejemplar, de acuerdo con la presente divulgación, tenía una alta eficiencia de transglucosilación. La transglucosilación
20 se observó dentro de 15 minutos.

[0037] La Figura 13C es una representación gráfica de los datos de un análisis de masa de proteína intacta (IPM) realizado para investigar los glicoformas de los anticuerpos chMC81370 producidos por una célula con introducción de (*knock-*
25 *in*) Endo S2 ejemplar de acuerdo con la presente divulgación.

La forma cuadrada representa GlcNAc.

5 **[0038]** La Figura 14A es una representación gráfica de datos de ELISA que muestra la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación ("enriquecida en SCT") y una célula con introducción (*knock-in*) Endo H ejemplar con una transglucosilación de acuerdo con la presente divulgación ("SCT homogéneo").

10 **[0039]** La Figura 14B es una representación gráfica de los datos de un ensayo de reportero ADCC que muestra la comparación entre los anticuerpos producidos por una célula natural (es decir una célula parental), una célula HEK293T ejemplar de acuerdo con la presente divulgación ("enriquecida en SCT") y una célula con introducción (*knock-in*) Endo H ejemplar con una
15 transglucosilación de acuerdo con la presente divulgación ("SCT homogéneo").

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 **[0040]** La glucosilación es una modificación post o cotraduccional común encontrada en la mayoría de las proteínas celulares, especialmente proteínas de la superficie. La importancia de un perfil de glicanos (es decir, glicoformo) de una glucoproteína y el impacto sobre los efectos terapéuticos ha sido reconocido. Tomando los anticuerpos terapéuticos como
25 ejemplo, la unión entre un anticuerpo y una célula objetivo o un patógeno desencadena una variedad de funciones inmunes

corriente abajo, incluyendo la fagocitosis, citotoxicidad celular, efecto vacunal, activación del complemento, etc. Esa respuesta basada en células inmunes requiere la unión del dominio Fc del anticuerpo para receptores de Fc específicos sobre las células inmunes, en las cuales se cree que el glicoformo del anticuerpo es crítico. Por ejemplo, se cree que la *N*-glucosilación de IgG en N297 en la región constante de la cadena pesada es crítica en la unión entre la IgG y el receptor FcγIIIA en las células NK da como resultado la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por lo tanto, es importante diseñar o modificar y obtener un glicoformo optimizado para mejorar la eficacia y seguridad de las glucoproteínas terapéuticas.

[0041] Las líneas celulares de mamífero convencionales para la producción de glucoproteína usualmente producen una mezcla de glicoformos con glicanos del tipo complejo biantenarios fucosilados en el núcleo, los cuales no son óptimos para la unión a un receptor de Fcγ debido a la función inhibidora de la fucosilación del núcleo o la entrega fuera del objetivo causada por la galactosilación terminal. En comparación, un glicano del tipo complejo de sialilo ligado en α2-6 (SCT) proporciona una mejor unión a los receptores FcγIIIA y los receptores FcγIIA, los cuales están asociados con la ADCC, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) y efecto vacunal. Además, la mono-GlcNAc (N-Acetilglucosamina) y

glicoformos que portan GlcNac-Fuc son buenos sustratos receptores para la transglucosilación medida por endoglucosidasa (glucosintasa) y son, por lo tanto, beneficiosos para diseñar una cadena de glicano deseada. En consecuencia, deben hacerse esfuerzos para modificarlos glicoformos.

[0042] CÉLULA

[0043] *Células para expresar una glucoproteína sialilada*

[0044] Un aspecto de la presente divulgación proporciona una célula para expresar una glucoproteína sialilada, la cual expresa constitutivamente y/o de manera controlable un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y un péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena, en donde el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se traducen en estrecha proximidad. Como se utiliza en la presente, "**traducido en estrecha proximidad**" describe el evento de traducción del péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el evento de traducción de la transcripción del péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena que ocurren cada uno cerca del otro tanto temporal como espacialmente.

[0045] En algunas modalidades, el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se expresan en un solo transcripto. Como se utiliza en la presente, "**en un solo**

transcripto” significa la transcripción del péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y la transcripción del péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se realiza transcripcionalmente bajo el mismo promotor o ADN que codifica para el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el ADN que codifica para el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se transcriben en una sola molécula de ARNm.

[0046] La presente divulgación contempla que la traducción del péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena próximos entre sí en una sola transcripción proporciona mayor sialilación a la glucoproteína. Sin desear ser limitados por alguna teoría, puesto que la reacción catalítica ejercida por la galactosiltransferasa genera un glicano galactosilado, el cual es el sustrato de una sialiltransferasa, la traducción de las dos enzimas próximas o la expresión de ellas en una sola transcripción asegura que las dos reacciones catalíticas ocurran muy cerca o casi simultáneamente y por lo tanto una mayor eficiencia de la sialilación.

[0047] *Enfoque de desplazamiento ribosómico.* En algunas modalidades, la célula de la presente divulgación comprende un primer ácido nucleico configurado para expresar el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena; y un segundo ácido nucleico configurado para expresar el péptido catalítico de

galactosiltransferasa exógena, en donde el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son controlados bajo el mismo promotor. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico están conectados entre sí a través de un ácido nucleico de conexión, el cual está configurado para codificar un péptido de desplazamiento ribosómico. Un péptido de desplazamiento ribosómico está configurado para provocar la omisión ribosómica, donde el péptido de desplazamiento ribosómico evita que el ribosoma se enlace covalentemente a un aminoácido recién insertado, continuando a la vez la traducción, dando como resultado la escisión traduccional de una poliproteína en péptidos/proteínas separadas. En algunas modalidades, el péptido de desplazamiento ribosómico comprende una secuencia de aminoácidos de DxExNPGP, en donde x denota cualquier aminoácido, D denota ácido aspártico, E denota ácido glutámico, N denota asparagina, P denota prolina y G denota glicina. En ciertas modalidades, el péptido de desplazamiento ribosómico comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07, SEQ ID NO: 08 o SEQ ID NO: 09. En ciertas modalidades, el ácido nucleico de conexión comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22.

[0048] *Enfoque de proteína de fusión.* De manera alternativa, el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido

catalítico de galactosiltransferasa exógena, en algunas modalidades, están configurados para ser expresados en una proteína de fusión. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una primera porción que tiene el péptido catalítico de sialiltransferasa y una segunda porción que tiene el péptido catalítico de galactosiltransferasa, en donde la primera porción y la segunda porción están conectadas entre sí a través de un enlazante escindible y el enlazante escindible está configurado para ser escindible después de la traducción de la proteína de fusión, por lo que después de la escisión se liberan el péptido catalítico de sialiltransferasa y el péptido catalítico de galactosiltransferasa como proteínas separadas.

[0049] En algunas modalidades, el péptido catalítico de sialiltransferasa es una alfa-2,6-sialiltransferasa. En algunas modalidades, la sialiltransferasa es una beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1. En ciertas modalidades, el péptido catalítico de sialiltransferasa comprende un producto de un gen ST6Gal1 o un gen PspST. En ciertas modalidades, el péptido catalítico de sialiltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos como la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 01 o SEQ ID NO: 02. Aunque en ciertas modalidades, el péptido catalítico de sialiltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 03 o SEQ ID NO: 04.

[0050] En algunas modalidades, el péptido catalítico de

galactosiltransferasa es una beta-1,4-galactosiltransferasa 1. En ciertas modalidades, el péptido catalítico de galactosiltransferasa comprende un producto de un gen B4GALT1. En ciertas modalidades, el péptido catalítico de galactosiltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 05.

[0051] En algunas modalidades, la célula comprende un primer ácido nucleico configurado para expresar el péptido catalítico de sialiltransferasa exógena, en donde el primer ácido nucleico se deriva de un gen ST6Gal1 o un gen PspST. Como se utiliza en la presente, "derivado de" describe que el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos exactamente igual a un gen de referencia; por ejemplo, el primer ácido nucleico podría comprender una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En algunas otras situaciones, "derivado de" describe que el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos modificada del gen de referencia, siempre que el producto de la secuencia de nucleótidos modificada ejerza la misma o una funcionalidad catalítica similar que el producto del gen de referencia. La modificación podría realizarse para acomodar el uso del codón u optimizar la eficiencia o exactitud de la transcripción/traducción en una célula anfitriona. En otros ejemplos, la modificación agrega un péptido señal que dirige el producto del gen a un cierto lugar dentro o fuera de las

células. Por ejemplo, el primer ácido nucleico puede derivarse de un gen PspST, dado que el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto del gen PspST y una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal que dirige el producto del gen al aparato de Golgi donde toma lugar la glucosilación. El péptido señal, en ciertas modalidades, puede ser el péptido señal de un gen ST6Gal1 o un gen B4GALT1. En esas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0052] En algunas modalidades, la célula comprende un segundo ácido nucleico configurado para expresar el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena, en donde el segundo ácido nucleico se deriva de un gen B4GALT1. En ciertas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

[0053] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son controlados transcripcionalmente bajo el mismo promotor, el cual puede ser un promotor constitutivo o un promotor activable. El promotor constitutivo puede ser, pero no se limita a un promotor de CMV, un promotor de T7, un promotor del Factor de Elongación Humano 1 Alfa (EF1 α), un promotor β -Actina de Pollo (CAG) o un promotor SV40. El promotor activable proporciona una expresión controlable de la sialiltransferasa exógena y la galactosiltransferasa

exógena. El promotor activable puede ser, pero no se limita a un Promotor Inducible por Tetraciclina (activable por doxiciclina) o un promotor del gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (utilizado para seleccionar y amplificar la expresión genética).

[0054] *Célula parental.* En algunas modalidades, la célula de la presente divulgación se deriva de una célula parental (por ejemplo, una célula natural), la cual puede ser una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula parental no tiene una sialiltransferasa endógena y/o una galactosiltransferasa endógena. En algunas otras modalidades, la célula parental podría tener una sialiltransferasa endógena y/o una galactosiltransferasa endógena. No obstante, la presente divulgación descubre sorprendentemente que la sobreexpresión de la sialiltransferasa endógena y/o la galactosiltransferasa endógena no incrementa la sialilación como puede lograrse expresando las endógenas. En algunas modalidades, la célula parental y/o la célula de la presente divulgación son deficientes en actividad de la fucosiltransferasa 8. En ciertas modalidades, la célula parental y/o la célula de la presente divulgación son deficientes en un gen FUT8 que codifica para un producto de la actividad de fucosiltransferasa. En algunas modalidades, la célula parental y/o la célula de la presente divulgación son o se derivan de una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula HEK293. La célula CHO puede ser, pero

no se limita a ExpiCHO, CHO-K1, CHO-C, CHOZN y CHOK1Q. En algunas modalidades, "célula" se utiliza en la presente de manera intercambiable con "línea celular".

[0055] *Células para expresar una glucoproteína recombinante.*

5 En algunas modalidades, la célula comprende además un ácido nucleico de carga útil nucleico configurado para codificar para una glucoproteína recombinante y la expresión del ácido nucleico de carga útil es controlada transcripcionalmente por un promotor constitutivo o activable. El promotor constitutivo
10 y el promotor activable son como se describió anteriormente y la presente. En algunas modalidades, la glucoproteína recombinante expresada o producida por la célula se conjuga con un glicano. En ciertas modalidades, el glicano puede ser un glicano ligado a N (es decir, N-glicano) o un glicano ligado
15 a O (es decir, O-glicano).

[0056] *Glicano y glucoproteína.* La célula de la presente divulgación es capaz de expresar una glucoproteína sialilada. En algunas modalidades, la glucoproteína sialilada comprende un glicano de tipo complejo de sialilo (SCT), el cual puede
20 conjugarse con la proteína a través de un residuo de lisina (es decir, O-glicano) o un residuo de asparagina (es decir, N-glicano). En algunas modalidades, la célula de la presente divulgación se configura para expresar una proteína enriquecida en SCT. Como se utiliza en la presente, "enriquecido en SCT"
25 describe que las proteínas expresadas por la célula de la

presente divulgación tienen un mayor porcentaje de glicano SCT en comparación con las mismas proteínas expresadas por una célula parental utilizadas para producir las células de la presente divulgación. En algunas modalidades, el porcentaje de glicano SCT es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% mayor que el de las proteínas expresadas por una célula parental o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 10% a 500%, de 10% a 400%, de 10% a 300%, de 10% a 200%, de 10% a 100%, de 10% a 90%, de 10% a 80%, de 10% a 70%, de 10% a 60%, de 10% a 50%, de 10% a 40%, de 10% a 30%, de 10% a 20%, de 30% a 500%, de 30% a 400%, de 30% a 300%, de 30% a 200%, de 30% a 100%, de 30% a 90%, de 30% a 80%, de 30% a 70%, de 30% a 60%, de 30% a 50% o 30% a 40%. En ciertas modalidades, el porcentaje de glicano SCT está enriquecido en 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 o 10 veces el porcentaje de glicano SCT de las proteínas expresadas por una célula parental o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 1.2 a 10 veces, de 1.2 a 9 veces, de 1.2 a 8 veces, de 1.2 a 7 veces, de 1.2 a 6 veces, de 1.2 a 5 veces, de 1.2 a 4 veces, de 1.2 a 3 veces, de 1.2 a 2 veces, de 2 a 10 veces, de 2 a 9 veces, de 2 a 8 veces, de 2 a 7 veces, de 2 a 6 veces, de 2 a 5 veces, de 2 a 4 veces, de 2 a 3 veces, de 5 a 10 veces, de 5 a 9 veces, de 5 a 8 veces, de 5 a 7 veces o de 5 a 6 veces. En ciertas modalidades, el glicano

es un glicano de tipo complejo de α 2-6 sialilo (SCT) monoantenario o binantenario. En algunas modalidades, el glicano es un glicano SCT rico en galactosa con o sin fucosa en el núcleo. En algunas otras modalidades, el glicano es un
5 glicano SCT completamente galactosilado con o sin fucosa en el núcleo.

[0057] En ciertas modalidades, la glucoproteína recombinante (por ejemplo, una glucoproteína recombinante) es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Una unidad de
10 anticuerpo básico es una glucoproteína heterotetramétrica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena L se enlaza a una cadena H por el menos un (y típicamente un) enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí por medio
15 de uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) por cada una de las tres cadenas α y γ y cuatro dominios C_H por los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L
20 tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos de
25 aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios

variables de cadena ligera y cadena pesada. El apareamiento de un V_H y V_L juntos forma un solo sitio de unión de antígeno.

[0058] La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede ser asignada a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes (C_L). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, que tienen cadenas pesadas designadas alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases con base en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Se apreciará que los mamíferos que codifican para múltiples isotipos Ig serán capaces de experimentar un cambio de clase de isotipo.

[0059] Un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" es un polipéptido que comprende o consiste de una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión de antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmento de anticuerpos incluyen un fragmento de $F(ab')_2$, un fragmento de F_v , un anticuerpo F_v (ScF_v) de una sola cadena, un diacuerpo,

minianticuerpo, nanoanticuerpo (V_HH) y un anticuerpo lineal (véase la Patente estadounidense No. 5,641,870; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0060] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento residual "Fe", una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste de una cadena L completa con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión de antígeno, es decir, tiene un solo sitio de unión de antígeno. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce y un fragmento $F(ab')_2$ de una sola cadena que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tienen actividad de unión de antígeno divalente y aún es capaz de reticular el antígeno. Ambos del Fab y $F(ab')_2$ son ejemplos de "fragmentos de unión de antígeno". Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio $CH1$, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. $Fab'-SH$ es la designación actual para Fab' en la cual los residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de

anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos fragmento de anticuerpos.

5 **[0061]** El fragmento "Fc" comprende las porciones carboxi
terminales (es decir, los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG) de ambas
cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones
efectoras de los anticuerpos son determinadas por las
secuencias en la región Fc. El dominio Fc es la porción del
10 anticuerpo reconocida por los receptores celulares, como el
FcR y al cual se une la proteína de activación de complemento,
C1q. Como se discute en la presente, pueden hacerse
modificaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) a
un dominio Fc para modificar (por ejemplo, mejorar, reducir o
15 remover gradualmente) una o más funcionalidades de un
polipéptido que contiene Fc (por ejemplo, un anticuerpo de la
presente divulgación).

[0062] El "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que
contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno
20 completo. Este fragmento consiste de un dímero de un dominio
de región variable de cadena pesada y una ligera en asociación
estrecha y no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios
emanan seis bucles hipervariables (tres bucles de cada una de
la cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácidos para
25 la unión del antígeno y confieren especificidad de unión de

antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) has la capacidad para para reconocer y unirse al antígeno, aunque típicamente a una
5 afinidad menor que la de todo el sitio de unión.

[0063] Los "Fv de una sola cadena" también abreviados como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv
10 comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite el sFv para formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.
15 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0064] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo precedente) con enlazantes cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de
20 modo que se logre el apareamiento entre cadenas, pero no dentro de las cadenas, del dominio V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmentos que tienen dos sitios de unión de antígenos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de "cruce" sFv en los cuales
25 los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en

diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Otros fragmentos de anticuerpo y moléculas que comprenden los mismos incluyen, por ejemplo, anticuerpos lineales, scFv en tándem, scFv-Fc, scFv-Fc en tándem, dímeros de scFv, cremallera de scFv, diacuerpo-Fc, diacuerpo-CH₃, scDiacuerpos, scDiacuerpo-Fc, scDiacuerpo-CH₃, nanoanticuerpos, TandAbs, minicuerpos, minianticuerpos, trianticuerpos, tetraanticuerpos, scFab, Fab-scFv, Fab-scFv-Fc, scFv-CH-CL-scFv y F(ab')₂-scFv₂, todos los cuales también son contemplados por la presente.

[0065] En las modalidades en las que la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el glicano puede localizarse en una cadena pesada o en una región Fc. Es importante señalar que el sitio de glucosilación de un anticuerpo que regula las funciones del anticuerpo puede diferir de subtipo a subtipo. Por ejemplo, el conjunto preBCR es importante para el desarrollo de las células B y es regulado de manera crítica por el N-glicano en N46 sobre μ HC. El N-glicano en N402 sobre μ HC ha sido vinculado con la oligomerización del anticuerpo y activación del complemento. Además, la N-glucosilación de IgG en N297 sobre γ HC juega un papel crítico en la activación del complemento y Fc γ receptor que conduce a la activación de varias funciones efectoras. Por

lo tanto, en algunas modalidades, el glicano puede localizarse en N46, N402 y/o N297 de una cadena pesada.

[0066] En ciertas modalidades, la glucoproteína recombinante es Adalimumab (Humira®), Adalimumab-atto (Amjevita®), Rituximab (Rituxan®), Rituximab -atto (Truxima®), Cetuximab (Erbitux®), Bevacizumab (Avastin®), Infliximab (Remicade®), Trastuzumab (Herceptin®), Pembrolizumab (Keytruda®), Etanercept (Enbrel®), Ipilimumab (Yervoy®), Ofatumumab (Arzerra), Golimumab (Simponi®), Atezolizumab (Tecentriq®), Ocrelizumab (OCREVUS®), Durvalumab (Durvalumab®), Avelumab (Bavencio®), Nivolumab (Opdivo®), Pertuzumab (Perjeta®), Obinutuzumab (Gazyva®), Gazyvaro Infliximab (Remicade®) o Trastuzumab emtansine (Kadcyla®).

[0067] En ciertas modalidades, la glucoproteína recombinante es una proteína inmunogénica, como una proteína de envoltura viral o una proteína de espícula de un virus. Por ejemplo, la proteína inmunogénica puede ser, pero no se limita a una hemaglutinina de la influenza o una proteína de la espícula del SARS-CoV-2.

20 [0068] **Células para expresar una glucoproteína GlcNAc**

[0069] Un aspecto de la presente divulgación proporciona a célula para expresar una glucoproteína GlcNAc, en donde la célula es deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y expresa de manera constitutiva o controlable una endoglucosidasa exógena. Como

se describe en la presente, "glucoproteína GlcNAc" describe que el glicano conjugado en la glucoproteína recombinante está compuesto principalmente de GlcNAc. En algunas modalidades, el glicano GlcNAc puede ser un monoglicano GlcNAc o un glicano GlcNAc-Fuc. En algunas modalidades, la glucoproteína recombinante es como se describió anteriormente en la presente.

[0070] La endoglucosidasa exógena puede ser, pero no se limita a una endoglucosidasa H (Endo H) o una endoglucosidasa S2 (Endo S2). En ciertas modalidades, la endoglucosidasa exógena comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. En algunas de ciertas modalidades, la célula comprende a ácido nucleico configurado para codificar para la endoglucosidasa exógena, en donde el ácido nucleico podría comprender a una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. El ácido nucleico puede ser controlado bajo a constitutivo o un promotor activable. El promotor constitutivo puede ser pero no se limita a un promotor CMV, un promotor T7, un promotor EF1A, un promotor CAG o un promotor SV40. El promotor activable proporciona una expresión controlable de la sialiltransferasa exógena y la galactosiltransferasa exógena. El promotor activable puede ser, pero no se limita a un Promotor Inducible por Tetraciclina (activable por doxiciclina) o un promotor del gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (utilizado para seleccionar y amplificar la expresión genética).

[0071] Como se describe en la presente, "deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI)" significa que la célula no tiene una N-acetilglucosaminiltransferasa funcionando, lo cual puede
5 resultar del bloqueo de un gen endógeno que codifica para la N-acetilglucosaminiltransferasa I o una mutación en el gen que causa falta de sentido, cambio de sentido o desplazamiento del marco del gen. Sin desear estar obligado por ninguna teoría, a célula deficiente en actividad de GnTI produce un glicano rico
10 en manosa, el cual es escindido preferiblemente por una endoglucosidasa, generando por lo tanto una glucoproteína GlcNAc.

[0072] *Célula parental.* En algunas modalidades, la célula de la presente divulgación se deriva de una célula parental, la
15 cual puede ser una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula parental es deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI). En algunas otras modalidades, la célula parental no es deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI), mientras que la
20 célula de la presente divulgación es modificada genéticamente para ser deficiente en actividad de GnTI. En algunas modalidades, la célula parental y/o la célula de la presente divulgación son deficientes en actividad de la fucosiltransferasa 8. En ciertas modalidades, la célula
25 parental y/o la célula de la presente divulgación son

deficientes en un gen FUT8 que codifica para un producto de la actividad de fucosiltransferasa. En algunas modalidades, la célula parental y/o la célula de la presente divulgación son o se derivan de una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula HEK293. La célula CHO puede ser, pero no se limita a ExpiCHO, CHO-K1, CHO-C, CHOZN y CHOK1Q y la célula HEK293 puede ser Expi293F™ GnTI KO.

[0073] *Células para expresar una glucoproteína recombinante.* En algunas modalidades, la célula comprende además una carga útil ácido nucleico configurado para codificar para una glucoproteína recombinante y la expresión del ácido nucleico de carga útil es controlada por medio de a constitutivo o un promotor activable. El promotor constitutivo y el promotor activable son como se describió anteriormente y la presente.

En algunas modalidades, la glucoproteína recombinante expresada o producida por la célula se conjuga con un glicano. En ciertas modalidades, el glicano puede ser un glicano ligado a N.

[0074] PRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA PRESENTE DIVULGACIÓN

[0075] La producción de las células de acuerdo con una modalidad de la presente divulgación implica la ingeniería o modificación de una célula parental, de modo que la célula modificada exprese las enzimas exógenas. En algunas modalidades, la producción de las células implica la ingeniería o modificación de una célula parental para introducir y/o

bloquear un gen de interés. En algunas modalidades, la ingeniería puede realizarse utilizando enfoques de transfección o enfoques de edición génica, los cuales pueden ser estables o transitorios.

5 **[0076] *Transfección***

10 **[0077]** La transfección puede realizarse utilizando cualquier metodología convencional con la consideración de la alta eficiencia de transfección, toxicidad celular mínima, bajos o efectos insignificantes sobre la fisiología normal y facilidad de operación.

15 **[0078]** En algunas modalidades, la transfección puede realizarse utilizando métodos mediados por virus. Los métodos mediados por virus utilizan un vector viral para llevar un ácido nucleico configurado para codificar para un producto del gen deseado a una célula anfitriona. Algunos vectores virales comúnmente utilizados incluyen, pero no se limitan a Adenovirus, Virus adenoasociados, el virus de la leucemia murina retroviral, virus del herpes simple, vaccinia virus y virus de Sindbis. Los métodos mediados por virus son altamente
20 efectivos, dada la naturaleza infecciosa de las partículas virales. Las desventajas de esos métodos, sin embargo, residen en los problemas de inmunogenicidad y citotoxicidad. No obstante, muchos métodos mediados por virus han sido bien estudiados y desarrollados para resolver esos problemas.
25 Además, en algunas modalidades, la célula de la presente

divulgación se utiliza para producir una glucoproteína deseada en ciertos usos, la transfección no se realiza en un paciente o sujeto humano directamente. Por lo tanto, las preocupaciones o problemas de inmunogenicidad y citotoxicidad son menos críticas para la presente divulgación.

[0079] En algunas modalidades, la transfección puede realizarse utilizando métodos químicos como utilizando un polímero catiónico, fosfato de calcio, un lípido catiónico o un aminoácido catiónico. Los ejemplos específicos de métodos químicos incluyen, pero no se limitan a, el uso de DEAE-dextrano, polietilenimina, dendrímero, polibreno, fosfato de calcio, lipofectina, DOTAP, lipofectamina, CTAB/DOPE o DOTMA. El principio que subyace a esos métodos es el uso de aquellos compuestos cargados químicamente para producir complejos de ácido nucleico/compuesto químico con ácidos nucleicos cargados negativamente. Se cree que los complejos de ácido nucleico/compuesto químico serán atraídos hacia la membrana celular cargada negativamente y pasarán a través de esta eventualmente a través de endocitosis, fagocitosis o ambas. La eficiencia de esos métodos químicos puede verse afectada por varios factores, incluyendo la relación ácido nucleico/compuesto químico, el valor del pH del ambiente y las condiciones de la membrana celular.

[0080] En algunas modalidades, la transfección puede realizarse utilizando métodos físicos, como microinyección

directa, administración biolística de partículas, electroporación, transfección basada en láser, transfección con ultrasonidos y magnetofección. Esos métodos pueden ser útiles, pero usualmente se requiere un mayor nivel de destreza y son de trabajo intensivo.

[0081] Edición genómica

[0082] En algunas modalidades, la ingeniería genética puede realizarse utilizando edición genómica. Los métodos de edición genómica pueden ser de edición génica no dirigida, como el transposón Sleeping Beauty o el transposón mediado por meganucleasa I-SceI o edición génica dirigida, como utilizando nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN) o repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas (CRISPR)/proteína asociada con CRISPR. La edición génica proporciona la integración del ácido nucleico exógeno en el genoma de la célula anfitriona (célula parental).

[0083] Los métodos de edición génica dirigida inducen roturas de doble cadena del ADN (DSB) en sitios dirigidos, lo cual da oportunidad a alterar la función (inserción de un gen exógeno o silenciamiento de un gen endógeno) de un gen de interés. El enfoque de TALEN implica el uso de una molécula quimérica que consiste de un dominio efector similar al activador de la transcripción (TALE) y un dominio catalítico de nucleasa *FokI*. El dominio de TALE comprende un motivo de unión de ADN, el cual puede diseñarse para dirigirse a un sitio específico del genoma

de la célula anfitriona. Normalmente, se requiere un par de dos moléculas quiméricas, cada una dirigida hacia las direcciones hacia adelante e inversa, respectivamente. Una vez que los dominios de TALE se unen al locus dirigido en las direcciones hacia adelante e inversa, los dominios catalíticos de nucleasa *FokI* del par de dos moléculas quiméricas forman un dímero, activando por lo tanto la actividad catalítica de la nucleasa para escindir el ADN y generar un DSB. El método de CRISPR comprende utilizar un complejo de proteína Cas y un ARN guía. El ARN guía comprende una secuencia de andamio para la unión de Cas y un espaciador (de alrededor de 20 nucleótidos) que tiene una secuencia complementaria a un sitio específico del genoma de la célula anfitriona. Normalmente, el espaciador debe tener una secuencia que sea única y específica para el sitio objetivo para prevenir la unión fuera del objetivo y el sitio objetivo es seguido por un sitio de motivo adyacente protoespaciador (PAM), el cual es necesario para el reconocimiento de la proteína Cas. Una vez que el complejo de ARN guía/proteína Cas se une al sitio objetivo, la actividad de la nucleasa Cas se activa y escindirá el ADN para generar un DCB.

[0084] Los DSB inducidos pueden ser reparados por tres mecanismos de reparación diferentes, incluyendo reparación dirigida por homología (HDR), unión de extremos no homólogos (NHEJ) y unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ).

En el proceso del mecanismo de reparación, la supresión de desplazamiento del marco puede dar como resultado silenciamiento genético, mediante el uso de un vector donador que comprende secuencias de microhomología homólogas a un sitio dirigido, el mecanismo de reparación puede inducir eficientemente una integración dirigida de genes exógenos en el genoma.

[0085] MÉTODOS PARA LA GLUCOINGENIERÍA DE UNA GLUCOPROTEÍNA RECOMBINANTE Y GLUCOPROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTENIDAS POR ESTOS

[0086] Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante. El método comprende proporcionar un vector de expresión en una célula a acuerdo con una modalidad de la presente divulgación, en donde el vector de expresión comprende una carga útil ácido nucleico configurado para codificar para una glucoproteína recombinante; y expresar el ácido nucleico de carga útil nucleico en la célula, obteniendo por lo tanto una pluralidad de glucoproteínas recombinantes, donde al menos una glucoproteína recombinante de la pluralidad se conjuga con un glicano deseado

[0087] Una glucoproteína recombinante puede ser como las descritas en la presente. En ciertas modalidades, la glucoproteína recombinante es un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En las modalidades en

las que la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el glicano puede localizarse en una cadena pesada o en una región Fc. En algunas modalidades, el glicano se localiza en un sitio de glucosilación del anticuerpo. En ciertas modalidades, el glicano puede localizarse en N46, N402 y/o N297 de una cadena pesada.

[0088] Como se utiliza en la presente, "glucoingeniería" se refiere a producir la glucoproteína recombinante utilizando la célula por lo que la glucoproteína recombinante lleva o se conjuga con un glicofomo deseado o glicano deseado. En algunas modalidades, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% de ellas lleva el glicofomo deseado (por ejemplo, un glicano sialilado o un glicano GlcNAc) o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 50 a 100%, de 50 a 99%, de 50 a 95%, de 50 a 90%, de 50 a 85%, de 50 a 80%, de 50 a 75%, de 50 a 70%, de 50 a 65%, de 50 a 60%, de 50 a 55%, de 60 a 100%, de 60 a 99%, de 60 a 95%, de 60 a 90%, de 60 a 85%, de 60 a 80%, de 60 a 75%, de 60 a 70%, de 60 a 65%, de 70 a 100%, de 70 a 99%, de 70 a 95%, de 70 a 90%, de 70 a 85%, de 70 a 80%, de 70 a 75%, de 80 a 100%, de 80 a 99%, de 80 a 95%, de 80 a 90%, de 80 a 85%, de 90 a 100%, de 90 a 99% o 90 a 95%.

[0089] En algunas modalidades, la pluralidad de

glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicoformo deseado (por ejemplo, un glicano sialilado o un glicano GlcNAc) en una homogeneidad de al menos 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%, 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% o 100% o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como 1% a 100%, de 1% a 90%, de 1% a 80%, de 1% a 70%, de 1% a 60%, de 1% a 50%, 1% a 40%, de 1% a 30%, de 1% a 20%, de 1% a 10%, de 5% a 100%, de 5% a 95%, de 5% a 85%, de 5% a 75%, de 5% a 65%, de 5% a 55%, de 5% a 45%, de 5% a 35%, de 5% a 25%, de 5% a 10%, de 10% a 100%, de 10% a 99%, de 10% a 95%, de 10% a 90%, de 10% a 85%, de 10% a 80%, de 10% a 75%, de 10% a 70%, de 10% a 65%, de 10% a 60%, de 10% a 55%, de 10% a 50%, de 10% a 45%, de 10% a 40%, de 10% a 35%, de 10% a 30%, de 10% a 25%, de 10% a 20%, de 10% a 15%, de 20% a 100%, de 20% a 99%, de 20% a 95%, de 20% a 90%, de 20% a 85%, de 20% a 80%, de 20% a 75%, de 20% a 70%, de 20% a 65%, de 20% a 60%, de 20% a 55%, de 20% a 50%, de 20% a 45%, de 20% a 40%, de 20% a 35%, de 20% a 30%, de 20% a 25%, de 40% a 100%, de 40% a 99%, de 40% a 95%, de 40% a 90%,

de 40% a 85%, de 40% a 80%, de 40% a 75%, de 40% a 70%, de 40% a 65%, de 40% a 60%, de 40% a 55%, de 40% a 50%, de 60% a 100%, de 60% a 99%, de 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a 75%, de 50% a 100%, de 50% a 99%, de 50% a 95%, de 50% a 90%, de 50% a 85%, de 50% a 80%, de 50% a 75%, de 50% a 70%, de 50% a 65%, de 50% a 60%, de 55% a 100%, de 55% a 99%, de 55% a 98%, de 55% a 97%, de 55% a 96%, de 55% a 95%, de 55% a 94%, de 55% a 93%, de 55% a 92%, de 55% a 91%, de 55% a 90%, de 55% a 85%, de 55% a 80%, de 55% a 75%, de 55% a 70%, de 55% a 65%, de 55% a 60%, de 70% a 100%, de 70% a 99%, de 70% a 95%, de 70% a 90%, de 70% a 85%, de 70% a 80%, de 70% a 75%, de 80% a 100%, de 80% a 99%, de 80% a 95%, de 80% a 90%, de 80% a 85%, de 90% a 100%, de 90% a 99% o de 90% a 95%, incluyendo o excluyendo cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define en la presente.

[0090] En algunas modalidades, la célula es de acuerdo con la célula de la presente divulgación descrita anteriormente para expresar una glucoproteína sialilada. En algunas modalidades, la glucoproteína sialilada comprende un glicano de tipo complejo de sialilo (SCT). En algunas modalidades, el método de la presente divulgación se configura para expresar una proteína enriquecida en SCT, la cual se define como se describe en la presente. En algunas otras modalidades, la célula es de acuerdo con la célula de la presente divulgación

anterior para expresar una glucoproteína GlcNAc, la cual se define como se describe en la presente.

[0091] En algunas modalidades, el método comprende además cosechar la glucoproteína recombinante dentro de 200, 180, 150, 120, 100, 80, 50, 30, 20, 10, 5 o 1 hora a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como 1 a 200 horas, de 1 a 180 horas, de 1 a 150 horas, de 1 a 120 horas, de 1 a 100 horas, de 1 a 80 horas, de 1 a 50 horas, de 1 a 30 horas, de 1 a 20 horas, de 1 a 10 horas, de 1 a 5 horas, de 5 a 200 horas, de 5 a 180 horas, de 5 a 150 horas, de 5 a 120 horas, de 5 a 100 horas, de 5 a 80 horas, de 5 a 50 horas, de 5 a 30 horas, de 5 a 20 horas o de 5 a 10 horas. En algunas modalidades, la glucoproteína recombinante se cosecha dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos números anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como 1 a 10 días, de 1 a 9 días, de 1 a 8 días, de 1 a 7 días, de 1 a 6 días, de 1 a 5 días, de 1 a 4 días, de 1 a 3 días o 1 a 2 días. Como se describe en la presente, "a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil" significa a partir del momento en que se entrega el vector de expresión a la célula o a partir del punto de tiempo en que el vector de

expresión es entregado a la célula y el promotor que controla la expresión del ácido nucleico de carga útil esa activado.

[0092] En algunas modalidades, la expresión del ácido nucleico de carga útil es constitutiva o controlable. En ciertas modalidades, la expresión del ácido nucleico de carga útil es controlada por medio de un promotor constitutivo o un promotor activable. El promotor constitutivo puede ser pero no se limita a un promotor CMV, un promotor T7, un promotor EF1A, un promotor CAG o un promotor SV40. El promotor activable proporciona una expresión controlable de la sialiltransferasa exógena y la galactosiltransferasa exógena. El promotor activable puede ser, pero no se limita a un Promotor Inducible por Tetraciclina (activable por doxiciclina) o un promotor del gen de dihidrofolato reductasa (DHFR utilizado para seleccionar y amplificar la expresión genética.).

[0093] En algunas modalidades, el vector de expresión puede proporcionarse a través de ingeniería genética, la cual puede realizarse utilizando enfoques de transfección o enfoques de edición génica, los cuales pueden ser estables o transitorios. Los enfoques de transfección y los enfoques de edición génica pueden ser como aquellos descritos en la presente para producir las células de la presente divulgación.

[0094] Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una pluralidad de glucoproteínas recombinantes, en donde al menos 50% de la pluralidad de las glucoproteínas recombinantes

se configura con un glicano deseado, el cual puede ser un glicano sialilado o un glicano GlcNAc. Una glucoproteína recombinante se puede describir en la presente. En ciertas modalidades, la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se obtiene utilizando los métodos para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante de la presente divulgación.

[0095] En algunas modalidades, la pluralidad de glucoproteínas recombinantes es una pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas. El término "enriquecido" describe que la pluralidad de glucoproteínas recombinantes de la presente divulgación tiene un porcentaje de glicano deseado mayor o enriquecido en comparación con las mismas proteínas expresadas por una célula parental o una célula natural para producir las células de la presente divulgación o la pluralidad de glucoproteínas recombinantes de la presente divulgación tiene un porcentaje de glicano deseado mayor o enriquecido en comparación que el porcentaje de glicano deseado de una pluralidad de proteínas de origen natural que tienen la misma o secuencias de aminoácidos similares. En algunas modalidades, el porcentaje de glicano deseado está enriquecido en al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o 500% o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 10% a 500%,

de 10% a 400%, de 10% a 300%, de 10% a 200%, de 10% a 100%, de 10% a 90%, de 10% a 80%, de 10% a 70%, de 10% a 60%, de 10% a 50%, de 10% a 40%, de 10% a 30%, de 10% a 20%, de 30% a 500%, de 30% a 400%, de 30% a 300%, de 30% a 200%, de 30% a 100%, de 30% a 90%, de 30% a 80%, de 30% a 70%, de 30% a 60%, de 30% a 50% o 30% a 40%, incluyendo o excluyendo cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define en la presente. En ciertas modalidades, el porcentaje de glicano deseado está enriquecido en 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 o 10 veces el porcentaje de glicano SCT de las proteínas expresadas por una célula parental o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 1.2 a 10 veces, de 1.2 a 9 veces, de 1.2 a 8 veces, de 1.2 a 7 veces, de 1.2 a 6 veces, de 1.2 a 5 veces, de 1.2 a 4 veces, de 1.2 a 3 veces, de 1.2 a 2 veces, de 2 a 10 veces, de 2 a 9 veces, de 2 a 8 veces, de 2 a 7 veces, de 2 a 6 veces, de 2 a 5 veces, de 2 a 4 veces, de 2 a 3 veces, de 5 a 10 veces, de 5 a 9 veces, de 5 a 8 veces, de 5 a 7 veces o de 5 a 6 veces, incluyendo o excluyendo cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define en la presente.

[0096] En algunas modalidades, el porcentaje de glicano

deseado está enriquecido en al menos 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% o 95% o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como 51% a 95%, 51% a 94%, 51% a 93%, 51% a 92%, 51% a 91%, 51% a 90%, 51% a 85%, 51% a 80%, 51% a 75%, 51% a 70%, 51% a 65%, 51% a 60%, de 55% a 95%, de 55% a 90%, de 55% a 85%, de 55% a 80%, de 55% a 75%, de 55% a 70%, de 55% a 65%, de 55% a 60%, de 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a 75%, de 60% a 70%, de 60% a 65%, de 70% a 95%, de 70% a 90%, de 70% a 85%, de 70% a 80% o 70% a 75%, incluyendo o excluyendo cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define en la presente.

[0097] En algunas modalidades, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% de la pluralidad de glicoproteínas recombinantes lleva el glicoforismo deseado (por ejemplo, un glicano sialilado o un glicano GlcNAc) o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos número anteriores o cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores, como de 50 a 100%, de 50 a 99%, de 50 a 95%, de 50 a 90%, de 50 a 85%, de 50 a 80%, de 50 a 75%, de 50 a 70%, de

50 a 65%, de 50 a 60%, de 50 a 55%, de 60 a 100%, de 60 a 99%,
 de 60 a 95%, de 60 a 90%, de 60 a 85%, de 60 a 80%, de 60 a
 75%, de 60 a 70%, de 60 a 65%, de 70 a 100%, de 70 a 99%, de
 70 a 95%, de 70 a 90%, de 70 a 85%, de 70 a 80%, de 70 a 75%,
 5 de 80 a 100%, de 80 a 99%, de 80 a 95%, de 80 a 90%, de 80 a
 85%, de 90 a 100%, de 90 a 99% o 90 a 95%. Todos los números
 pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define
 en la presente.

[0098] En algunas modalidades, la pluralidad de
 10 glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano
 sialilado en una homogeneidad de al menos 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%,
 15 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% o 100% o
 20 cualquier intervalo definido por los puntos finales anteriores,
 como de 1% a 100%, de 1% a 90%, de 1% a 80%, de 1% a 70%, de
 1% a 60%, de 1% a 50%, 1% a 40%, de 1% a 30%, de 1% a 20%, de
 1% a 10%, de 5% a 100%, de 5% a 95%, de 5% a 85%, de 5% a 75%,
 de 5% a 65%, de 5% a 55%, de 5% a 45%, de 5% a 35%, de 5% a
 25 25%, de 5% a 10%, de 10% a 100%, de 10% a 99%, de 10% a 95%,

de 10% a 90%, de 10% a 85%, de 10% a 80%, de 10% a 75%, de 10% a 70%, de 10% a 65%, de 10% a 60%, de 10% a 55%, de 10% a 50%, de 10% a 45%, de 10% a 40%, de 10% a 35%, de 10% a 30%, de 10% a 25%, de 10% a 20%, de 10% a 15%, de 20% a 100%, de 20% a 99%, de 20% a 95%, de 20% a 90%, de 20% a 85%, de 20% a 80%, de 20% a 75%, de 20% a 70%, de 20% a 65%, de 20% a 60%, de 20% a 55%, de 20% a 50%, de 20% a 45%, de 20% a 40%, de 20% a 35%, de 20% a 30%, de 20% a 25%, de 40% a 100%, de 40% a 99%, de 40% a 95%, de 40% a 90%, de 40% a 85%, de 40% a 80%, de 40% a 75%, de 40% a 70%, de 40% a 65%, de 40% a 60%, de 40% a 55%, de 40% a 50%, de 60% a 100%, de 60% a 99%, de 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a 75%, de 50% a 100%, de 50% a 99%, de 50% a 95%, de 50% a 90%, de 50% a 85%, de 50% a 80%, de 50% a 75%, de 50% a 70%, de 50% a 65%, de 50% a 60%, de 55% a 100%, de 55% a 99%, de 55% a 98%, de 55% a 97%, de 55% a 96%, de 55% a 95%, de 55% a 94%, de 55% a 93%, de 55% a 92%, de 55% a 91%, de 55% a 90%, de 55% a 85%, de 55% a 80%, de 55% a 75%, de 55% a 70%, de 55% a 65%, de 55% a 60%, de 70% a 100%, de 70% a 99%, de 70% a 95%, de 70% a 90%, de 70% a 85%, de 70% a 80%, de 70% a 75%, de 80% a 100%, de 80% a 99%, de 80% a 95%, de 80% a 90%, de 80% a 85%, de 90% a 100%, de 90% a 99% o de 90% a 95%, incluyendo o excluyendo cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden ser modificados por "aproximadamente", como se define en la presente.

[0099] En las modalidades en las que la célula es de acuerdo

con la célula de la presente divulgación anterior para expresar una glucoproteína GlcNAc, el método de la presente divulgación puede comprender además un paso de transglucosilación. El paso de transglucosilación puede comprender recolectar la pluralidad de glucoproteínas recombinantes expresadas en los pasos precedentes del método e incubar la pluralidad de glucoproteínas recombinantes con una endoglucosidasa y un donador de glicano, conjugando por lo tanto el donador de glicano en al menos una glucoproteína de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes (es decir, una reacción de transglucosilación).

[0100] En algunas modalidades, los donadores de glicano pueden comprender un resto de oxazolina configurado para reaccionar con la endoglucosidasa conjugando por lo tanto el donador de glicano en al menos una glucoproteína de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes. En ciertas modalidades, el donador de glicano es un glicano de tipo complejo de sialilo (SCT). En algunas modalidades, la endoglucosidasa es una endoglucosidasa H (Endo H), una endoglucosidasa S2 (Endo S2) o un derivado de la misma. En algunas modalidades, el derivado de la Endo S2 comprende una Endo S2 D184 mutante, incluyendo pero sin limitarse a, una a D184M mutante o una a D184Q mutante.

[0101] En algunas modalidades, el paso de transglucosilación genera una pluralidad de glucoproteínas recombinantes

conjugadas con el donador de glicano en una homogeneidad de al
 menos 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%,
 5 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 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%,
 10 97%, 98%, 99% o 100% o cualquier intervalo definido por los
 puntos finales anteriores, como 1% a 100%, de 1% a 90%, de 1%
 a 80%, de 1% a 70%, de 1% a 60%, de 1% a 50%, 1% a 40%, de 1%
 a 30%, de 1% a 20%, de 1% a 10%, de 5% a 100%, de 5% a 95%, de
 5% a 85%, de 5% a 75%, de 5% a 65%, de 5% a 55%, de 5% a 45%,
 15 de 5% a 35%, de 5% a 25%, de 5% a 10%, de 10% a 100%, de 10% a
 99%, de 10% a 95%, de 10% a 90%, de 10% a 85%, de 10% a 80%,
 de 10% a 75%, de 10% a 70%, de 10% a 65%, de 10% a 60%, de 10%
 a 55%, de 10% a 50%, de 10% a 45%, de 10% a 40%, de 10% a 35%,
 de 10% a 30%, de 10% a 25%, de 10% a 20%, de 10% a 15%, de 20%
 20 a 100%, de 20% a 99%, de 20% a 95%, de 20% a 90%, de 20% a 85%,
 de 20% a 80%, de 20% a 75%, de 20% a 70%, de 20% a 65%, de 20%
 a 60%, de 20% a 55%, de 20% a 50%, de 20% a 45%, de 20% a 40%,
 de 20% a 35%, de 20% a 30%, de 20% a 25%, de 40% a 100%, de
 40% a 99%, de 40% a 95%, de 40% a 90%, de 40% a 85%, de 40% a
 25 80%, de 40% a 75%, de 40% a 70%, de 40% a 65%, de 40% a 60%,

de 40% a 55%, de 40% a 50%, de 60% a 100%, de 60% a 99%, de
 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a
 75%, de 50% a 100%, de 50% a 99%, de 50% a 95%, de 50% a 90%,
 de 50% a 85%, de 50% a 80%, de 50% a 75%, de 50% a 70%, de 50%
 5 a 65%, de 50% a 60%, de 55% a 100%, de 55% a 99%, de 55% a 98%,
 de 55% a 97%, de 55% a 96%, de 55% a 95%, de 55% a 94%, de 55%
 a 93%, de 55% a 92%, de 55% a 91%, de 55% a 90%, de 55% a 85%,
 de 55% a 80%, de 55% a 75%, de 55% a 70%, de 55% a 65%, de 55%
 a 60%, de 70% a 100%, de 70% a 99%, de 70% a 95%, de 70% a 90%,
 10 de 70% a 85%, de 70% a 80%, de 70% a 75%, de 80% a 100%, de
 80% a 99%, de 80% a 95%, de 80% a 90%, de 80% a 85%, de 90% a
 100%, de 90% a 99% o de 90% a 95%, incluyendo o excluyendo
 cualquiera de los números anteriores. Todos los números pueden
 ser modificados por "aproximadamente", como se define en la
 15 presente.

[0102] DEFINICIONES

[0103] A menos que se defina específicamente lo contrario,
 todos los términos técnicos y científicos utilizados en la
 presente tienen el mismo significado que es comúnmente
 20 comprendido por un experto en el estado de la técnica al que
 pertenece esta divulgación. A menos que se mencione lo
 contrario, las técnicas empleadas o contempladas en la presente
 son metodologías estándar bien conocidas por un experto en el
 estado de la técnica. La práctica de la presente divulgación
 25 empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas

convencionales de microbiología, cultivo de tejidos, biología molecular, química, bioquímica y tecnología de ADN recombinante, que están dentro del estado de la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no limitantes. Lo siguiente se presenta a modo de ilustración y no pretende limitar el alcance de la divulgación.

[0104] Los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades como homogeneidad, nivel de enriquecimiento, peso molecular, condiciones de reacción y resultados, etc., utilizados para describir y reivindicar ciertas modalidades de la presente divulgación deben entenderse modificados en algunos casos por el término "aproximadamente". Un experto en el estado de la técnica comprendería el significado del término "aproximadamente" en el contexto del valor que califica. Los valores numéricos presentados en algunas modalidades de la presente divulgación pueden contener ciertos errores resultantes de la desviación estándar en sus respectivas mediciones de prueba. Por ejemplo, el término "aproximadamente", como se utiliza en la presente, se refiere a un valor medible, como una cantidad, una duración temporal, etc., y abarca variaciones de $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ o $\pm 0.1\%$ con respecto al valor especificado, según corresponda.

[0105] Como se utiliza en la presente, "sustancialmente" significa suficiente para trabajar para el propósito pretendido. El término "sustancialmente" permite de esta manera

variaciones menores, insignificantes de un estado, dimensión, resultado absoluto o perfecto o similar, como es esperado por un experto en el estado de la técnica en el campo, pero que no afecta de manera apreciable el rendimiento total. Cuando se
5 utiliza con respecto a valores numéricos o parámetros o características expresada como valores numéricos, "sustancialmente" significa dentro de diez por ciento.

[0106] Como se utiliza en la presente, "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a un enfoque para
10 obtener resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos. Para esta divulgación, los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir inhibir o suprimir el inicio o el progreso de una infección o una enfermedad; mejorar o reducir el desarrollo de los síntomas de una infección o
15 enfermedad; o una combinación de los mismos.

[0107] Como se utiliza en la presente, "prevenir" y "prevención" se utilizan de manera intercambiable con "profilaxis" y pueden significar la prevención completa de una
20 infección o la prevención del desarrollo de los síntomas de esa infección, un retraso en la aparición de una enfermedad o sus síntomas; o una disminución de la gravedad de una infección desarrollada posteriormente o sus síntomas.

[0108] Como se utiliza en la presente, "glicano" se refiere a un polisacárido, oligosacárido o monosacárido. Los glicanos
25 pueden ser monómeros o polímeros de residuos de azúcar y pueden

ser lineales o ramificados. Un glicano puede incluir residuos de azúcares naturales (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico, galactosa, manosa, fucosa, hexosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o
5 azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-desoxirribosa, fosfomanosa, 6'-sulfo-N-acetilglucosamina, etc.).

[0109] Como se utiliza en la presente, una "glucoproteína recombinante" o una "proteína recombinante" es una proteína
10 producida mediante la introducción de un ácido nucleico diseñado o modificado en un organismo anfitrión, como células de bacterias, levaduras o de mamíferos que utilizando procesos de laboratorio o industriales y, en algunas situaciones, aislada o purificada para usos clínicos o industriales.

15 **[0110] EJEMPLO**

[0111] EJEMPLO 1: Producción de Células CHO Ejemplares de la Presente divulgación para Expresar una Glucoproteína Sialilada

[0112] Este experimento produjo una célula ejemplar a acuerdo con una modalidad de la presente divulgación a partir de una
20 célula CHO parental. Se compraron células ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) y se mantuvieron en Medio de Expresión ExpiCHO™ de acuerdo con el manual del producto. Entonces, las células se transfirieron con un plásmido a SWG-006 (es decir un vector de expresión) utilizando un Equipo de Transfección
25 de CHO ExpiFectamine™ de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. El plásmido SWG-006 (SEQ ID NO: 23) estaba constituido de plásmido pcDNATM3.1 y fue construido con un potenciador de CMV, un promotor de CMV, un gen ST6GAL1 (SEQ ID NO: 10), una secuencia de P2A (SEQ ID NO: 19) y un gen B4GALT1 (SEQ ID NO: 14). De manera alternativa, las células se cotransfectaron con un plásmido ST6GAL1 (SEQ ID NO: 25) y un plásmido B4GALT1 (SEQ ID NO: 26), cada uno de construyó para expresar el gen ST6GAL1 y el gen B4GALT1 por separado bajo un promotor de CMV.

10 **[0113]** Entonces, las células se transfectaron con un plásmido de Adalimumab (pcDNA2 TADA, SEQ ID NO: 27) utilizando el Equipo de Transfección de CHO ExpiFectamineTM para expresar el Adalimumab (Humira). Tres días después de la transfección, las células transfectadas (un clon transitorio) se lavaron con

15 amortiguador de tinción (EDTA 1 mM, NaN₃ al 0.02%, BSA al 1%, en PBS) y se tiñeron con SNA biotinilado (VectorLabs), el cual está diseñado para unirse a un ácido siálico enlazado a una N-acetilgalactosamina o galactosa. Después de ser lavadas, las células se tiñeron con Streptoavidin-Alexa647 (BioLegend) y se

20 analizaron utilizando citometría de flujo (BD LSRFortessa).

[0114] Los resultados (Figura 1) mostraron transfección con el plásmido SWG-006 o cotransfectadas con el plásmido ST6GAL1 y el plásmido B4GALT1 fueron capaces de promover la sialilación en α 2,6. En comparación, las células CHO parentales (Células

25 ExpiCHO) no tienen una α 2,6-sialiltransferasa endógena, por lo

que no se detectó ninguna señal de las células transfectadas. De manera más importante, los resultados también mostraron que la transfección con el plásmido SWG-006 proporciona mayor sialilación en $\alpha 2,6$ que la cotransfección con el plásmido ST6GAL1 y el plásmido B4GALT1.

[0115] De manera similar, se produjo otra célula ejemplar a acuerdo con una modalidad de la presente divulgación transfectando una célula ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) utilizando el Equipo de Transfección de CHO ExpiFectamine™ con un plásmido SWG-015 (SEQ ID NO: 24). El vector SWG-015 estaba constituido por el plásmido pcDNA™3.1 y fue construido con un potenciador de CMV, un promotor de CMV, un PspST modificado (SEQ ID NO: 12), una secuencia de P2A (SEQ ID NO: 19) y un gen B4GALT1 (SEQ ID NO: 14). La célula también se transfectó con el plásmido de Adalimumab (pcDNA2 TADA, SEQ ID NO: 27) para expresar Adalimumab (Humira). Entonces, se observó la sialilación del Adalimumab producido por la célula, el cual también en un clon transitorio, utilizando tinción como se describió anteriormente. También se examinó la célula transfectada con el vector SWG-006 para comparar con la célula transfectada con el vector SWG-015. Los resultados mostraron que la célula transfectada con el SWG-015 proporciona un nivel similar de sialilación que el de la célula transfectada con el vector SWG-006 (Figura 2).

[0116] EJEMPLO 2: Estabilización de las células ejemplares de la presente divulgación

[0117] Se linealizó el plásmido SWG-006 por digestión con PvuI y luego purificación. El SWG-006 linealizado se transfectó en Células ExpiCHO utilizando el Equipo de Transfección de CHO ExpiFectamine™ (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 2 después de la transfección, se agregó G418 a 400 ug/ml para la selección de fármaco. Después de recuperarse hasta el 90% de supervivencia, las células se tiñeron con SNA biotinilado y luego streptavidin-BV421 en donde el SNA se une a las proteínas de la membrana endógenas producidas por las células. Las células se clasificaron entonces por alta unión de SNA utilizando el Clasificador Celular WOLF G2 (Nanocollect Biomedical, Inc.) en células individuales cultivadas en placas de 96 pocillos. Después de un periodo de cultivo, las células de un solo clon se tiñeron con SNA biotinilado y luego streptavidin-APC y se analizaron utilizando citometría de flujo para seleccionar los clones con alta alfa-2,6-sialilación de la superficie. Las células seleccionadas (>99% positivas a) se transfectaron entonces con el plásmido de expresión de Adalimumab (SEQ ID NO: 27) para sobreexpresar Adalimumab. El Adalimumab expresado se purificó utilizando perlas de proteína A y se analizó utilizando una mancha de hibridación de SNA para seleccionar los clones que fueron capaces de expresar alta alfa-2,6-

sialilación del Adalimumab. El glicoformo de Adalimumab fue analizado adicionalmente por LC/MS-MS.

[0118] Los datos de LC/MS-MS muestran que los cuatro clones estabilizados probados en este EJEMPLO, SAII-A3, SAI-GI, SAI-D4 y SAI-F12, expresaron todos un alto porcentaje de sialilación de Adalimumab. El Clon SAII-A3 estabilizado mostró 70.9% (aproximadamente de 70% a 72%) de sialilación del Adalimumab que expresa (Figura 3A); el Clon SAI-GI estabilizado mostró 55.39% (aproximadamente 55% a 57%) de sialilación del Adalimumab que expresa (Figura 3B); el Clon SAI-D4 estabilizado mostró 16.8% (aproximadamente 16% a 18%) de sialilación del Adalimumab que expresa (Figura 3C); y el Clon SAI-F12 estabilizado mostró 36.14% (aproximadamente 36% a 38%) de sialilación del Adalimumab que expresa (Figura 3D). En comparación, el Adalimumab expresado por la célula parental no mostró sialilación significativa (Figura 3E).

[0119] EJEMPLO 3: Glucoingeniería del Adalimumab utilizando una célula estabilizada ejemplar de acuerdo con la presente divulgación

[0120] En este experimento, un clon estabilizado (SAII-A3) de las células SWG-006 obtenido como se describe en el EJEMPLO 2 anterior fue transfectado con un vector de expresión de Adalimumab (SEQ ID NO: 27) utilizando un Equipo de Transfección de CHO ExpiFectamine™ (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para expresar Adalimumab

y se observó el glicoformo del mismo y se comparó con el mismo anticuerpo expresado por una célula parental (célula ExpiCHO).

[0121] De manera breve, las células se diluyeron hasta una densidad final de 5×10^6 células viables/mL con 15 ml de Medio de Expresión ExpiCHO™ fresco en un matraz, precalentado a 37°C. 5 Entonces el matraz se agitó suavemente. Las células se mantuvieron entonces en una incubadora a 37° C con una atmósfera humidificada de 8% de CO₂ en el aire en un agitador orbital a 125 rpm antes de la transfección. El plásmido DNA 10 (es decir, el vector de expresión of SEQ ID NO: 27, 12 µg) se diluyó con 0.6 mL de medio OptiPRO™ frío y el reactivo de CHO ExpiFectamine™ (48 µL) se diluyó con 552 µL de medio OptiPRO™ frío. El ADN dilatado se diluyó entonces con el reactivo de CHO ExpiFectamine™ diluido para obtener complejos de CHO 15 ExpiFectamine™/ADN plasmídico. Los complejos de CHO ExpiFectamine™/ADN plasmídico se agregaron al cultivo celular en una incubadora a 37°C con una atmósfera humidificada de 8% de CO₂ en el aire en un agitador orbital a 125 rpm. Después de la transfección, se agregaron 90 µL de potenciador de CHO 20 ExpiFectamine™ y 3.6 ml volúmenes de ExpiCHO™ Feed a las células. Las células en el matraz se mantuvieron entonces en la incubadora a 37° C con una atmósfera humidificada de 8% de CO₂ con agitación. Después de 8-10 días después de la transfección, se cosechó el sobrenadante del cultivo celular 25 para la purificación de proteína.

[0122] Entonces, los anticuerpos producidos por las SAII-A3 células y las células parentales ExpiCHO se aislaron respectivamente utilizando perlas de proteína A (GE HealthCare). De manera breve, se hicieron pasar 15 mL sobrenadante a través de una columna de Proteína de 200 uL. LA columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) PBS. El anticuerpo unido se eluyó con 15 CV de glicina 0.1 M pH=3. Los anticuerpos producidos se dializaron contra acetato de amonio 10 mM. Los anticuerpos se redujeron entonces utilizando DTT 25 mM y se analizaron por LC/MS-MS. Se compró un producto comercial de Adalimumab (Humira®) y se analizó utilizando LC/MS-MS como control.

[0123] Los datos de LC/MS-MS muestran que el Adalimumab producido por las células ejemplares de la presente divulgación tenían una variedad de glicanos sialilados (Véase Figura 4C), los glicanos sialilados se marcaron con flechas sólidas), incluyendo G2S2F, G2S1F, G1S1F, N3H6F1S1, N3H4S1, N3H5F1S1, N4H6F1S1, N4H6F1S2. El porcentaje de sialilación de los glicanos totales fue del 70.9% y el porcentaje de sialilación del glicano tipo complejo biantenarico fue del 79.8%. En comparación, aunque los productos comerciales (Figura 4A) y el Adalimumab producido por las Células parentales ExpiCHO (Figura 4B) también llevaban glicanos, no se observó sialilación.

[0124] **EJEMPLO 4: Producción de Células HEK293 Ejemplares de la Presente Divulgación para Expresar una Glucoproteína**

Sialilada

[0125] Este experimento produjo una célula ejemplar de acuerdo con una modalidad de la presente divulgación a partir de una célula HEK293T parental utilizando las tecnologías CRISPR. Los resultados fueron muy similares a los resultados con el uso del Equipo de Transfección de CHO ExpiFectamine™ en células CHO, como se describe en el EJEMPLO 1.

[0126] *Células, plásmidos y Transfección.* Se cultivaron células HEK293T parental (ATCC) en DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de FBS (Thermo Fisher Scientific) a 37°C con 5% de CO₂ en la incubadora celular. Los plásmidos para la expresión de CRISPR/Cas9 se construyeron se acuerdo a lo sugerido por el manual del equipo (Thermo Fisher Scientific). De manera breve, se sintetizó la secuencia de ARNsg validada dirigida a la glucosiltransferasa (Integrated DNA Technologies) y se clonó el vector para la expresión de Cas9 y ARNsg. El inserto genético sintético optimizado por codones (Integrated DNA Technologies), flanqueado por el brazo homólogo del gen objetivo en el sitio objetivo del ARNsg, se clonó en un vector vacío como el plásmido donador. La transfección objetivo de las células 293T fue mediada por TransIT-293 (Mirus Bio) siguiendo el manual del reactivo. Un plásmido para expresar el anticuerpo chMC81370 (un anticuerpo humanizado dirigido al antígeno embrionario de una etapa específica 4 (SSEA4)) se transfectó en células seguido, por

incubación. En el momento de la cosecha, se recolectó el medio de cultivo y luego se sometió a una columna de perlas de sefarosa de proteína A (GE HealthCare) para purificar los anticuerpos.

5 **[0127]** *Análisis.* Los anticuerpos purificados se analizaron utilizando análisis de masa de proteína intacta (IPM). De manera breve, las muestras se diluyeron con agua grado LCMS a una concentración entre 5-10 μ M y se analizaron por 6230 TOF LC/MS con una fuente de iones Dual AJS ESI (Agilent Technologies) con una columna PLRP-S de 1000Å 5 μ m (Agilent Technologies). El disolvente fue Acido Fórmico al 0.1% H₂O y el disolvente B fue Acido Fórmico al 0.1% CAN. Los resultados muestran un incremento significativo en glicoformas de anticuerpos galactosilados y sialilados (Figura 5B) en 10 comparación con los anticuerpos generados por las células HEK293T parentales (Figura 5A). Los resultados del análisis de Glicoformas por IPM se presentaron en gráficas de barras, lo 15 cual reveló un incremento significativo en la galactosiliación y sialilación del anticuerpo, con una ausencia de fucosilación del núcleo (Figura 6). 20

[0128] *Caracterización de la sialilación.* Para confirmar que la sialilación en el anticuerpo fue mediada por hST6Gal1, el anticuerpo fue tratado con dos sialidasas diferentes, neuraminidasa de *Streptococcus pneumonia* α 2-3 y neuraminidasa 25 de *Clostridium perfringens* a 37°C durante la noche

respectivamente, seguido por purificación por electroforesis en gel. El análisis de la proteína intacta no muestra ninguna diferencia obvia en la distribución de los anticuerpos asialilados y sialilados entre el grupo sin tratar y tratado con neuraminidasa $\alpha 2-3$ (parte superior y parte media de la Figura 7; los glicoformas sialilados se marcaron con flechas sólidas), indicando que la sialilación en el anticuerpo no se debió a las $\alpha 2-3$ sialiltransferasas endógenas. Por otro lado, el tratamiento con neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, pudo eliminar todos los enlaces de sialilación, eliminó en gran medida los ácidos siálicos terminal (parte inferior de la Figura 7). Además, los anticuerpos con mayor galactosilación generados a partir de células con introducción de hB4GalT1 únicamente no muestra sialilación terminal (Figura 8). Esos resultados confirmaron que la sialilación en el anticuerpo fue introducida por hST6Gal1 y el incremento de la expresión de hB4Gal1 en realidad la galactosilación del anticuerpo (Figura 5).

[0129] La sialiltransferasa hST6Gal1 se conoce como la única glucosiltransferasa humana que media la sialilación $\alpha 2-6$ y preferentemente utiliza el brazo de la rama $\alpha 1-3$ del glicano biantenarico como sustratos. Algunos estudios *in vitro* muestran que la glucoingeniería en los glicanos de anticuerpo por el hST6Gal1 toma mucho tiempo y es difícil producir glicanos de anticuerpos completamente sialilados. Además, esto podría

explicar por qué únicamente el anticuerpo con al menos un glicano completamente galactosilado fue sialilado. Si la galactosa en el glicano G1 no se encontraba sobre el brazo de la rama α 1-3, el hST6Gal1 no puede sialilarla. Por lo tanto, el nivel de expresión de las glucosiltransferasas puede que no sea el cuello de botella en esta situación. Más bien, la preferencia del sustrato y la actividad enzimática son los factores principales. El uso de α 2-6 sialiltransferasas de otros organismos pueden tener una actividad similar o mejor que la de hST6Gal1, lo cual es evidente por los otros EJEMPLOS descritos la presente que utilizaron un gen PspST.

[0130] EJEMPLO 5: Factor Tiempo en la Glucoingeniería Utilizando un Ejemplo de Célula de la Presente Divulgación

[0131] Este experimento probó si la cantidad y el tiempo de expresión del anticuerpo utilizando una célula ejemplar de la presente divulgación afectan la glucosilación. El tiempo de cultivo se extendió a 5 días y el medio de cultivo se recolectó los días 3 y 5, respectivamente. Los anticuerpos producidos se examinaron utilizando el análisis de masa de proteína intacta (IPM). Los resultados muestran una sialilación relativamente fuerte en la recolección (primeros tres días) (Figura 9A, D0-3) y entonces la sialilación disminuyó en la segunda recolección (últimos dos días), acompañada por un aumento de la galactosilación terminal (Figura 9A, D4-5), lo que sugiere que las proteínas involucradas en la glucosilación pueden no

ser suficientes para producir efectivamente el anticuerpo Fc-SCT en una etapa posterior.

[0132] Debido a que el hST6Gal1 y hB4GalT1 involucrados en la producción de anticuerpos FC-SCT se expresaron casi artificialmente y constitutivamente en las células, también examinamos si las glucosiltransferasas endógenas enfrentaban el mismo problema de glucosilación reducida. Con la expresión de anticuerpos en células las FUT8 KO, el anticuerpo se glicosiló casi terminalmente con al menos una o más galactosas en la primera recolección (Figura 9B, D0-3), pero la proporción de anticuerpos galactosilados disminuyó e incluso los glicósidos de anticuerpos sin ninguna galactosa se convirtieron en los glicoformas dominantes en los últimos dos días (Fig. 9B, D4-5). El resultado mostró que el nivel de glucosilación dinámica después de la expresión del anticuerpo también puede observarse en los productos de glucosilación endógena.

[0133] El hallazgo anteriormente mencionado sugiere que la producción de anticuerpos en diferentes momentos puede afectar la glucosilación de manera diferente. Por lo tanto, en el siguiente experimento, los anticuerpos se purificaron todos los días después de la transfección del plásmido y se analizó el cambio dinámico de los glicanos de anticuerpos de múltiples células diseñadas. El anticuerpo con sialilación completa pudo detectarse utilizando un análisis de masa de proteína intacta que se encontró el primer día y luego disminuyó gradualmente

con el tiempo (Figura 10). Con respecto a la galactosilación, los glicanos de anticuerpo estuvieron cubiertos por al menos dos galactosas (2~4 galactosas en total) en el primer día, pero comenzaron a disminuir en el segundo día, como lo demuestra la
 5 aparición de una galactosa en los glicanos de anticuerpo (Figura 10). Estas observaciones sugieren que la glucosilación de anticuerpos fue casi completa al comienzo de la expresión de la proteína y disminuyó gradualmente con el tiempo.

[0134] EJEMPLO 6: Unión entre Anticuerpos Sialilados y
 10 **Receptores de Fc γ**

[0135] El Fc γ RIIA (Fc gamma RIIA) y el Fc γ RIIB (Fc gamma RIIB) usualmente son expresados por las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y macrófagos y esos dos receptores trabajan juntos para modular respuesta inmunes.
 15 El Fc γ RIIIA es crítico para las células NK para mediar la ADCC3. Este experimento probó si los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT producidos utilizando las células ejemplares de la presente divulgación muestran mayor afinidad de unión que los anticuerpos naturales (es decir, los anticuerpos producidos
 20 por las células parentales). Los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT se produjeron y purificaron como se describe en el EJEMPLO 4. La afinidad de unión se examinó utilizando un ensayo de ensayo de ELISA.

[0136] *ELISA.* Los anticuerpos solubles recombinantes Fc γ IIA, Fc γ IIB y Fc γ RIIIA (Fc gamma RIIIA, R&D) se recubrieron con 50

ng/pocillo en amortiguador de recubrimiento de bicarbonato/carbonato (50 mM, pH 10) a 4°C durante la noche, antes de bloquear el pocillo con BSA al 5% en TPBS (Tween 20 al 0.05% en PBS) a 4°C durante la noche. El anticuerpo se
5 agregó a los pocillos con una concentración final inicial de 100 µg/ml con diluciones en serie 5x y se incubó a TA durante 1 hora, seguido de una incubación con anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora más a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó el
10 sustrato TMB (Bethyl Laboratories) para que reaccionara con HRP a temperatura ambiente antes de detener la reacción con H₂SO₄. La absorbancia a 450 nm se detectó con el lector de espectros SpectraMax M5 (Molecular Device). Los pocillos se lavaron con TPBS de 3 a 5 veces entre cada paso.

15 **[0137]** Los resultados muestran que la unión de los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT a los FcR aumentó en tres receptores Fc analizados (FIG. 11). Entre estos receptores, el aumento de la unión de FcγRIIA y FcγRIIIA fue consistente con estudios previos. De manera interesante, el anticuerpo WT
20 mostró una unión muy débil al receptor inhibitor FcγRIIB. Aunque la mejora fue menos significativa que la de FcγRIIA y FcγRIIIA, la glucoingeniería celular realizada por las células de la presente divulgación logró mejorar la unión del anticuerpo al receptor de FcγRIIB. Aunque el aumento de la
25 unión a los dos receptores funcionales opuestos, FcγRIIA y

FcγRIIB, que se expresan típicamente en las células presentadoras de antígeno (CPA) simultáneamente, parece ser contradictorio, la respuesta inmune final estuvo determinada por el nivel de expresión y la intensidad de la señalización de FcγRIIA y FcγRIIB en las células efectoras. El anticuerpo enriquecido con Fc-SCT también mostró una mayor capacidad de unión a FcγRIIA que el anticuerpo producido a partir de células naturales (Figura 11). Sin desear limitarse a teorías, esta mejora también se debió a la eliminación de la fucosa central 11 y la adición de galactosa.

[0138] EJEMPLO 7: Producción de Células HEK293 Ejemplares de la Presente Divulgación para Expresar glucoproteína GlcNAc

[0139] Este experimento produjo una célula ejemplar de acuerdo con una modalidad de la presente divulgación a partir de una célula parental GnT1 KO ExpiHEK293F utilizando las tecnologías CRISPR. Las células parentales se prepararon como se describe en el EJEMPLO 4. El N-glicano expresado por esta línea celular fue de un tipo alto en manosa el cual fue escindido preferentemente por Endo H para generar el anticuerpo Fc-GlcNAc. Por lo tanto, este experimento tiene como propósito introducir en Endo H (UniProtKB/Swiss-Prot: P04067.1, véase la SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17) en esta línea celular por medio de CRISPR-Cas9. El plásmido para la tecnología CRISPR se preparó como se describe a continuación.

[0140] *Plásmidos y Transfección.* Los plásmidos para la

expresión de CRISPR/Cas9 se construyeron se acuerdo a lo sugerido por el manual del equipo (Thermo Fisher Scientific). De manera breve, se sintetizó la secuencia de ARNsg validada dirigida a la glucosiltransferasa (Integrated DNA Technologies) y se clonó el vector para la expresión de Cas9 y ARNsg. El inserto genético sintético optimizado por codones (Integrated DNA Technologies), flanqueado por el brazo homólogo del gen objetivo en el sitio objetivo del ARNsg, se clonó en un vector vacío como el plásmido donador. La transfección objetivo de las células 293T fue mediada por utilizando un Expi293Fectamine™ Transfección Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el manual del reactivo. Un plásmido para expresar el anticuerpo chMC81370 se transfectó en células seguido, por incubación. En el momento de la cosecha, se recolectó el medio de cultivo y luego se sometió a una columna de perlas de sefarosa de proteína A (GE HealthCare) para purificar el anticuerpo.

[0141] *Análisis.* Los anticuerpos expresados por las células se analizaron por electroforesis. La proteína se calentó a 95°C durante 5 min en el amortiguador de muestra LDS suplementado con 2-Mercaptoetanol y luego se sometió a electroforesis en gel con 12% de SDS-PAGE. La proteína sobre el gel se tiñó con amortiguador de azul Coomassie (ApexBio). El resultado mostró que la cadena pesada del anticuerpo (AbHC) expresada por esas células tenía una movilidad más rápida que AbHC de sus células

parentales (GnT1 KO) y la mayoría de AbHC se desaceleraron (Figura 12A).

5 **[0142]** Ese anticuerpo también se sometió a un ensayo de transglucosilación. El anticuerpo se incubó con glicano de SCT-oxazolina y Endo S2 mutante en amortiguador Tris a 37°C durante el tiempo indicado antes de cosechar por purificación por electroforesis en gel. La transglucosilación generó anticuerpos con glicano homogéneo (en este experimento, glicano de SCT). La eficiencia de la transglucosilación fue bastante
10 buena (Figura 12B). Los glicanos de estos anticuerpos se analizaron posteriormente por análisis de masa de proteína intacta (IPM). Los resultados mostraron que la mayoría de los anticuerpos (más del 95%) contienen únicamente GlcNAc en cada HC (Figura 12C, Figura 12D y Figura 12E).

15 **[0143]** De manera alternativa, en lugar de la introducción en Endo H, se bloqueó la endoglucosidasa S2 (Endo S2; UniProtKB/Swiss-Prot: T1WGN1.1, véase la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 18) de *Streptococcus pyogenes* debido a que esta
20 enzima puede hidrolizar tanto los N-glicanos con alto contenido de manosa como los de tipo complejo se unieron a Fc-GlcNAc. Se administraron vector donador y plásmidos CRISPR-Cas9 a células GnT1 KO. Posteriormente, los glicanos de anticuerpos generados por estas células se examinaron como se describió
25 anteriormente. El gel de proteínas mostró una banda claramente desplazada hacia abajo de AbHC en comparación con sus células

parentales (utilizando GNT1 KO, Figura 13A). Además, también pueden agregarse glicanos a AbHC a través de transglucosilación enzimática (Figura 13B). El análisis de la masa de proteína intacta mostró una clara señal del anticuerpo Fc-GlcNAc (Figura 13C). La mayoría de los anticuerpos (más del 90%) contienen únicamente GlcNAc en cada HC (Figura 12E).

[0144] Con base en estos resultados, se concluye que tanto Endo H como Endo S2 pueden introducirse en las células mediante CRISPR-Cas9 para procesar los N-glicanos a anticuerpos Fc-GlcNAc para su transglucosilación *in vitro*. Además, este método celular puede emplearse con otras glucoproteínas, como la hemaglutinina de la influenza y la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, para generar glicoformos decoradas con mono-GlcNAc como vacunas y así inducir respuestas inmunes ampliamente protectoras.

[0145] A continuación, puesto que la unión de los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT (es decir, el anticuerpo obtenido en EJEMPLO 4) al receptor FcγIIIA estaba elevada, los anticuerpos homogéneos en Fc-SCT obtenidos anteriormente a través de transglucosilación se compararon con los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT por su afinidad de unión a los receptores FcγIIIA. El resultado mostró que los anticuerpos enriquecidos con Fc-SCT exhibieron una avidez de unión similar a la de los anticuerpos SCT homogéneos (Figura 14A).

[0146] Además, se realizó un ensayo de reportero de ADCC. De

manera breve, el ensayo se realizó de acuerdo con el manual del equipo. Las células objetivo SK-OV3 que expresan SSEA4 se sembraron en una placa de 96 pocillos, seguido por la adición de un anticuerpo con una concentración final inicial de 1 g/ml con dilución en serie 5x. A continuación, se agregaron las células efectoras que expresan FcγRIIIA (relación efector:célula objetivo, 6:1) y se incubaron con las células objetivo en la incubadora a 37°C durante 6 h. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min antes de agregar el sustrato de luciferasa. Después de 5 min de incubación, se midió la luminiscencia con un lector de espectros SpectraMax M5. El factor de inducción se calculó mediante RLU (inducida-fondo)/RLU (control-fondo sin anticuerpo). Se observó que, a la concentración más baja de anticuerpos utilizada para la inducción, el anticuerpo WT no indujo una activación celular evidente, pero los anticuerpos homogéneos Fc-SCT y enriquecidos con Fc-SCT pueden desencadenar la activación celular y alcanzar rápidamente un máximo en la siguiente concentración (Figura 14B). Incluso a la concentración más alta, el anticuerpo WT puede alcanzar una inducción máxima, pero la actividad fue mucho menor que la del anticuerpo homogéneo Fc-SCT o enriquecido con Fc-SCT (Figura 14B).

[0147] MODALIDADES EJEMPLARES

[0148] Modalidad 1: Una célula para expresar una glucoproteína sialilada en donde la célula expresa de manera

constitutiva y/o controlable un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y una un péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena, en donde un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se traducen en estrecha proximidad.

[0149] Modalidad 2: La célula de la Modalidad 1, en donde un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se expresan en un solo transcripto.

[0150] Modalidad 3: La célula de la Modalidad 1 o Modalidad 2, que comprende un primer ácido nucleico configurado para expresar un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y un segundo ácido nucleico configurado para expresar el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena, en donde el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico con controlados transcripcionalmente por el mismo promotor.

[0151] Modalidad 4: La célula de la Modalidad 3, en donde el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se conectan entre sí a través de un ácido nucleico de conexión, el cual se configura para codificar para un péptido de desplazamiento ribosómico.

[0152] Modalidad 5: La célula de la Modalidad 4, en donde el péptido de desplazamiento ribosómico comprende una secuencia de aminoácidos de DxExNPGP, en donde x denota cualquier

aminoácido, D denota ácido aspártico, E denota ácido glutámico, N denota asparagina, P denota prolina y G denota glicina.

[0153] Modalidad 6: La célula de la Modalidad 4 o Modalidad 5, en donde el péptido de desplazamiento ribosómico comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07, SEQ ID NO: 08 o SEQ ID NO: 09.

[0154] Modalidad 7: La célula de la Modalidad 3, en donde un péptido catalítico de sialiltransferasa exógena y el péptido catalítico de galactosiltransferasa exógena se configuran para ser expresados como una proteína de fusión.

[0155] Modalidad 8: La célula de la Modalidad 7, en donde la proteína de fusión comprende una primera porción que tiene el dominio del péptido catalítico de sialiltransferasa y una segunda porción que tiene el dominio del péptido catalítico de galactosiltransferasa, en donde la primera porción y la segunda porción se conectan entre sí a través de un enlazante escindible, en donde además el enlazante escindible se configura para ser escindible después de la traducción de la proteína de fusión, proporcionando por lo tanto después de la escisión el péptido catalítico de sialiltransferasa y el péptido catalítico de galactosiltransferasa como proteínas separadas.

[0156] Modalidad 9: La célula de cualquiera de las Modalidades 3 a 8, en donde el primer ácido nucleico se deriva de un ST6Gal1 gene o un gen PspST.

[0157] Modalidad 10: La célula de cualquiera de las Modalidades 3 a 9, en donde el primer ácido nucleico comprende a una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

5 **[0158]** Modalidad 11: La célula de la Modalidad 10, en donde el primer ácido nucleico comprende a una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

10 **[0159]** Modalidad 12: La célula de cualquiera de las Modalidades 3 a 11, en donde el segundo ácido nucleico se deriva de un gen B4GALT1.

15 **[0160]** Modalidad 13: La célula de cualquiera de las Modalidades 3 a 12, en donde el segundo ácido nucleico comprende a una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 14.

[0161] Modalidad 14: La célula de cualquiera de las Modalidades 3 a 13, en donde el promotor es un promotor constitutivo o un promotor activable.

20 **[0162]** Modalidad 15: La célula de la Modalidad 14, en donde el promotor constitutivo es un promotor de CMV, un promotor de T7, un promotor del factor de elongación humano 1 alfa (EF1 α), un promotor de β -actina de pollo (CAG) o un promotor de SV40.

25 **[0163]** Modalidad 16: La célula de la Modalidad 14, en donde el promotor activable es un Promotor Inducible por Tetraciclina (activable por doxiciclina) o un promotor del gen de

dihidrofolato reductasa (DHFR).

[0164] Modalidad 17: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 16, en donde el péptido catalítico de sialiltransferasa es una alfa-2,6-sialiltransferasa.

5 **[0165]** Modalidad 18: La célula de la Modalidad 17, en donde la sialiltransferasa es una beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1.

[0166] Modalidad 19: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 18, en donde el péptido catalítico de
10 sialiltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 01 o SEQ ID NO: 02.

[0167] Modalidad 20: La célula de la Modalidad 19, en donde el péptido catalítico de sialiltransferasa comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 03 o SEQ ID NO: 04.

[0168] Modalidad 21: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 20, en donde el péptido catalítico de galactosiltransferasa es una beta-1,4-galactosiltransferasa 1.

[0169] Modalidad 22: La célula de la Modalidad 21, en donde
20 el péptido catalítico de galactosiltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 05.

[0170] Modalidad 23: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 22, en donde la célula es deficiente en actividad de fucosiltransferasa.

25 **[0171]** Modalidad 24: La célula de la Modalidad 23, en donde

la célula es deficiente en actividad de la fucosiltransferasa 8.

5 **[0172]** Modalidad 25: La célula de la Modalidad 23 o Modalidad 24, en donde la célula es deficiente en un gen FUT8 que codifica para un producto de la actividad de fucosiltransferasa.

[0173] Modalidad 26: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 25, en donde la célula es una célula de mamífero.

10 **[0174]** Modalidad 27: La célula de la Modalidad 26, en donde la célula se deriva de una célula de ovario de hámster chino o una célula HEK293.

[0175] Modalidad 28: La célula de cualquiera de las Modalidades 1 a 27, en donde la célula comprende además una carga útil ácido nucleico configurado para codificar para una glucoproteína recombinante y la expresión del ácido nucleico de carga útil es controlada transcripcionalmente por un promotor constitutivo o activable.

20 **[0176]** Modalidad 29: La célula de la Modalidad 28, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0177] Modalidad 30: La célula de la Modalidad 29, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

25 **[0178]** Modalidad 31: Un método para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante que comprende: proporcionar un vector de expresión en una célula de acuerdo con cualquiera de

las Modalidades 1 a 27, en donde el vector de expresión comprende una carga útil ácido nucleico configurado para codificar para la glucoproteína recombinante; y expresar el ácido nucleico de carga útil nucleico en la célula, obteniendo
5 por lo tanto una pluralidad de glucoproteínas recombinantes, donde al menos una glucoproteína recombinante de la pluralidad se conjuga con un glicano sialilado.

[0179] Modalidad 32: El método de la Modalidad 31, en donde el glicano sialilado es un glicano de tipo complejo de α 2-6-sialilo (SCT).
10

[0180] Modalidad 33: El método de la Modalidad 32, en donde el glicano de tipo complejo de α 2-6-sialilo (SCT) es monoantenario o biantenariano.

[0181] Modalidad 34: El método de la Modalidad 31 o Modalidad
15 32, en donde el glicano sialilado carece de fucosa en el núcleo.

[0182] Modalidad 35: El método de cualquiera de las Modalidades 31 a 34, en donde la expresión del ácido nucleico de carga útil es constitutiva o controlable.

[0183] Modalidad 36: El método de cualquiera de las
20 Modalidades 31 a 35, en donde al menos 50% de la pluralidad de las glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano sialilado.

[0184] Modalidad 37: El método de cualquiera de las Modalidades 31 a 36, en donde la pluralidad de las
25 glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano

sialilado a una homogeneidad enriquecida de al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 94%, 95%, 99%, 100% o un número entero que oscila entre cualquiera de los dos números anteriores.

5 **[0185]** Modalidad 38: El método de cualquiera de las Modalidades 31 a 37, que comprende además cosechar la pluralidad de glucoproteínas recombinantes dentro de 200 horas a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil en la célula.

10 **[0186]** Modalidad 39: El método de la Modalidad 38, en donde la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se cosechó dentro de 100 horas a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil en la célula.

15 **[0187]** Modalidad 40: El método de cualquiera de las Modalidades 31 a 39, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0188] Modalidad 41: El método de la Modalidad 40, en donde el glicano se encuentra sobre una región constante del anticuerpo.

20 **[0189]** Modalidad 42: El método de la Modalidad 41, en donde el glicano se encuentra sobre una cadena pesada del anticuerpo.

[0190] Modalidad 43: El método de cualquiera de las Modalidades 40 a 42, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio de glucosilación del anticuerpo.

25 **[0191]** Modalidad 44: El método de la Modalidad 43, en donde

el glicano se encuentra sobre un sitio N46, N402 y/o N297 del anticuerpo.

[0192] Modalidad 45: El método de cualquiera de las Modalidades 40 a 44, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

[0193] Modalidad 46: El método de la Modalidad 45, en donde el anticuerpo terapéutico es Adalimumab (Humira®), Adalimumab-atto (Amjevita®), Rituximab (Rituxan®), Rituximab -atto (Truxima®), Cetuximab (Erbix®), Bevacizumab (Avastin®),
 10 Infliximab (Remicade®), Trastuzumab (Herceptin®), Pembrolizumab (Keytruda®), Etanercept (Enbrel®), Ipilimumab (Yervoy®), Ofatumumab (Arzerra), Golimumab (Simponi®), Atezolizumab (Tecentriq®), Ocrelizumab (OCREVUS®), Durvalumab (Durvalumab®), Avelumab (Bavencio®), Nivolumab (Opdivo®),
 15 Pertuzumab (Perjeta®), Obinutuzumab (Gazyva®), Gazyvaro Infliximab (Remicade®) o Trastuzumab emtansine (Kadcyla®).

[0194] Modalidad 47: Una pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas, en donde al menos 50% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se configura con un glicano sialilado.

[0195] Modalidad 48: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 47, en donde al menos 70% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas se configura con el glicano sialilado.

[0196] Modalidad 49: La pluralidad de glucoproteínas

recombinantes enriquecidas de la Modalidad 47 o Modalidad 48,
en donde la pluralidad de glucoproteínas recombinantes
enriquecidas se conjuga con el glicano sialilado en una
homogeneidad de al menos aproximadamente 1%, aproximadamente
5 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente
5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente
8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente
11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente
14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente
10 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente
20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente
23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente
26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente
29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente
15 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%, aproximadamente
35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente
38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente
41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente
44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente
20 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente
50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente
53%, aproximadamente 54%, aproximadamente 55%, aproximadamente
56%, aproximadamente 57%, aproximadamente 58%, aproximadamente
59%, aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente
25 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente

65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o aproximadamente 100%.

[0197] Modalidad 50: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 47 o Modalidad 48, en donde la pluralidad de las glucoproteínas recombinantes enriquecidas se conjuga con el glicano sialilado en una homogeneidad de 1% a 100%, de 1% a 90%, de 1% a 80%, de 1% a 70%, de 1% a 60%, de 1% a 50%, 1% a 40%, de 1% a 30%, de 1% a 20%, de 1% a 10%, de 5% a 100%, de 5% a 95%, de 5% a 85%, de 5% a 75%, de 5% a 65%, de 5% a 55%, de 5% a 45%, de 5% a 35%, de 5% a 25%, de 5% a 10%, de 10% a 100%, de 10% a 99%, de 10% a 95%, de 10% a 90%, de 10% a 85%, de 10% a 80%, de 10% a 75%, de 10% a 70%, de 10% a 65%, de 10% a 60%, de 10% a 55%, de 10% a 50%, de 10% a 45%, de 10% a 40%, de 10% a 35%, de 10% a 30%, de 10% a 25%, de 10% a 20%, de 10% a 15%, de 20% a 100%, de

20% a 99%, de 20% a 95%, de 20% a 90%, de 20% a 85%, de 20% a 80%, de 20% a 75%, de 20% a 70%, de 20% a 65%, de 20% a 60%, de 20% a 55%, de 20% a 50%, de 20% a 45%, de 20% a 40%, de 20% a 35%, de 20% a 30%, de 20% a 25%, de 40% a 100%, de 40% a 99%,
 5 de 40% a 95%, de 40% a 90%, de 40% a 85%, de 40% a 80%, de 40% a 75%, de 40% a 70%, de 40% a 65%, de 40% a 60%, de 40% a 55%, de 40% a 50%, de 60% a 100%, de 60% a 99%, de 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a 75%, de 50% a 100%, de 50% a 99%, de 50% a 95%, de 50% a 90%, de 50% a 85%,
 10 de 50% a 80%, de 50% a 75%, de 50% a 70%, de 50% a 65%, de 50% a 60%, de 70% a 100%, de 70% a 99%, de 70% a 95%, de 70% a 90%, de 70% a 85%, de 70% a 80%, de 70% a 75%, de 80% a 100%, de 80% a 99%, de 80% a 95%, de 80% a 90%, de 80% a 85%, de 90% a 100%, de 90% a 99% o de 90% a 95%.

15 **[0198]** Modalidad 51: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 47 a 50, en donde el glicano sialilado es un glicano de tipo complejo de α 2-6-sialilo (SCT).

20 **[0199]** Modalidad 52: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 51, en donde el glicano de tipo complejo de α 2-6-sialilo (SCT) es monoantenario o biantenarior.

25 **[0200]** Modalidad 53: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 51 o Modalidad 52, en donde el glicano sialilado carece de fucosa en el núcleo.

[0201] Modalidad 54: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 47 a 53, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 **[0202]** Modalidad 55: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 54, en donde el glicano se encuentra sobre una región constante del anticuerpo.

[0203] Modalidad 56: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 55, en donde el
10 glicano se encuentra sobre una cadena pesada del anticuerpo.

[0204] Modalidad 57: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 54 a 56, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio de glucosilación del anticuerpo.

15 **[0205]** Modalidad 58: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 57, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio N46, N402 y/o N297 del anticuerpo.

[0206] Modalidad 59: La pluralidad de glucoproteínas
20 recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 54 a 58, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

[0207] Modalidad 60: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 47 a 59, que se obtiene utilizando el método para la
25 glucoingeniería de una glucoproteína recombinante de

cualquiera de las Modalidades 31 a 46.

5 **[0208]** Modalidad 61: Una célula para expresar una glucoproteína GlcNAc, que es deficiente en actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y se expresa de manera constitutiva o controlable una endoglucosidasa exógena.

[0209] Modalidad 62: La célula de la Modalidad 61, en donde la endoglucosidasa exógena es una endoglucosidasa H (Endo H) o una endoglucosidasa S2 (Endo S2).

10 **[0210]** Modalidad 63: La célula de la Modalidad 62, en donde la endoglucosidasa exógena comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

15 **[0211]** Modalidad 64: La célula de cualquiera de las Modalidades 61 a 63, en donde la célula comprende a ácido nucleico configurado para codificar para la endoglucosidasa exógena.

[0212] Modalidad 65: La célula de la Modalidad 64, en donde el ácido nucleico comprende a una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

20 **[0213]** Modalidad 66: La célula de cualquiera de las Modalidades 61 a 65, en donde la célula es una célula de mamífero.

25 **[0214]** Modalidad 67: La célula de la Modalidad 66, en donde la célula se deriva de una célula de ovario de hámster chino o una célula HEK293.

[0215] Modalidad 68: La célula de cualquiera de las Modalidades 61 a 67, en donde la célula se deriva de una célula Expi293F™ GnTI KO.

5 **[0216]** Modalidad 69: La célula de cualquiera de las Modalidades 61 a 68, en donde la célula comprende además una carga útil ácido nucleico configurado para codificar para una glucoproteína recombinante y la expresión del ácido nucleico de carga útil es controlada por medio de a constitutivo o un promotor activable.

10 **[0217]** Modalidad 70: La célula de la Modalidad 69, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0218] Modalidad 71: La célula de la Modalidad 70, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

15 **[0219]** Modalidad 72: Un método para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante, que comprende: proporcionar un vector de expresión en una célula de acuerdo con cualquiera de las Modalidades 61 a 68, en donde el vector de expresión comprende una carga útil ácido nucleico configurado para
20 codificar para una glucoproteína recombinante; y expresar el ácido nucleico de carga útil nucleico en la célula, obteniendo por lo tanto una pluralidad de glucoproteínas recombinantes, donde al menos una glucoproteína recombinante de la pluralidad se conjuga con un glicano GlcNAc.

25 **[0220]** Modalidad 73: El método de la Modalidad 72, en donde

el glicano GlcNAc es un monoglicano GlcNAc o un glicano GlcNAc-Fuc.

5 **[0221]** Modalidad 74: El método de la Modalidad 72 o Modalidad 73, en donde la expresión del ácido nucleico de carga útil es constitutiva o controlable.

[0222] Modalidad 75: El método de cualquiera de las Modalidades 72 a 74, en donde al menos 50% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano GlcNAc.

10 **[0223]** Modalidad 76: El método de cualquiera de las Modalidades 72 a 75, en donde la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano GlcNAc en una homogeneidad de al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%, aproximadamente 35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente

25

41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente
 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente
 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente
 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente
 5 53%, aproximadamente 54%, aproximadamente 55%, aproximadamente
 56%, aproximadamente 57%, aproximadamente 58%, aproximadamente
 59%, aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente
 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente
 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente
 10 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente
 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente
 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente
 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente
 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente
 15 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente
 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente
 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente
 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente
 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente
 20 98%, aproximadamente 99% o aproximadamente 100%.

[0224] Modalidad 77: El método de cualquiera de las
 Modalidades 72 a 76, que comprende además cosechar la
 pluralidad de glucoproteínas recombinantes dentro de 200 horas
 a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil en
 25 la célula.

[0225] Modalidad 78: El método de la Modalidad 77, en donde la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se cosechó dentro de 100 horas a partir de la expresión del ácido nucleico de carga útil en la célula.

5 **[0226]** Modalidad 79: El método de cualquiera de las Modalidades 72 a 78, que comprende además: recolectar la pluralidad de glucoproteínas recombinantes; e incubar las glucoproteínas recombinantes con una endoglucosidasa y un donador de glicano.

10 **[0227]** Modalidad 80: El método de la Modalidad 79, en donde los donadores de glicano pueden comprender un resto de oxazolina.

[0228] Modalidad 81: El método de la Modalidad 79 o Modalidad 80, en donde el donador de glicano es un glicano de tipo
15 complejo de sialilo (SCT).

[0229] Modalidad 82: El método de cualquiera de las Modalidades 79 a 81, en donde la endoglucosidasa es una endoglucosidasa H (Endo H) o una endoglucosidasa S2 (Endo S2).

[0230] Modalidad 83: El método de cualquiera de las
20 Modalidades 72 a 82, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0231] Modalidad 84: El método de la Modalidad 83, en donde el glicano se encuentra sobre una región constante del anticuerpo.

25 **[0232]** Modalidad 85: El método de la Modalidad 84, en donde

el glicano se encuentra sobre una cadena pesada del anticuerpo.

[0233] Modalidad 86: El método de cualquiera de las Modalidades 83 a 85, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio de glucosilación del anticuerpo.

5 **[0234]** Modalidad 87: El método de la Modalidad 86, en donde el glicano se localiza en un sitio N46, N402 y/o N297 del anticuerpo.

[0235] Modalidad 88: El método de cualquiera de las Modalidades 83 a 87, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

[0236] Modalidad 89: El método de la Modalidad 88, en donde el anticuerpo terapéutico es Adalimumab (Humira®), Adalimumab-atto (Amjevita®), Rituximab (Rituxan®), Rituximab -atto (Truxima®), Cetuximab (Erbitux®), Bevacizumab (Avastin®),
 15 Infliximab (Remicade®), Trastuzumab (Herceptin®), Pembrolizumab (Keytruda®), Etanercept (Enbrel®), Ipilimumab (Yervoy®), Ofatumumab (Arzerra), Golimumab (Simponi®), Atezolizumab (Tecentriq®), Ocrelizumab (OCREVUS®), Durvalumab (Durvalumab®), Avelumab (Bavencio®), Nivolumab (Opdivo®),
 20 Pertuzumab (Perjeta®), Obinutuzumab (Gazyva®), Gazyvaro Infliximab (Remicade®) o Trastuzumab emtansine (Kadcyla®).

[0237] Modalidad 90: Una pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas, en donde al menos 50% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se configura con un
 25 glicano GlcNAc.

[0238] Modalidad 91: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 90, en donde al menos 70% de la pluralidad de glucoproteínas recombinantes se configura con el glicano GlcNAc.

5 **[0239]** Modalidad 92: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 90 o Modalidad 91, en donde la pluralidad de las glucoproteínas recombinantes se conjuga con el glicano GlcNAc en una homogeneidad de al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%,
10 aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%,
15 aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente 32%, aproximadamente 33%,
20 aproximadamente 34%, aproximadamente 35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%,
25 aproximadamente 49%, aproximadamente 50%, aproximadamente 51%,

aproximadamente 52%, aproximadamente 53%, aproximadamente 54%,
aproximadamente 55%, aproximadamente 56%, aproximadamente 57%,
aproximadamente 58%, aproximadamente 59%, aproximadamente 60%,
aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%,
5 aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%,
aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%,
aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%,
aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%,
aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%,
10 aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%,
aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%,
aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%,
aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%,
aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%,
15 aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%,
aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%
o aproximadamente 100%

[0240] Modalidad 93: La pluralidad de glucoproteínas
recombinantes enriquecidas de la Modalidad 90 o Modalidad 91,
20 en donde la pluralidad de las glucoproteínas recombinantes se
conjuga con el glicano GlcNAc en una homogeneidad de 1% a 100%,
de 1% a 90%, de 1% a 80%, de 1% a 70%, de 1% a 60%, de 1% a
50%, 1% a 40%, de 1% a 30%, de 1% a 20%, de 1% a 10%, de 5% a
100%, de 5% a 95%, de 5% a 85%, de 5% a 75%, de 5% a 65%, de
25 5% a 55%, de 5% a 45%, de 5% a 35%, de 5% a 25%, de 5% a 10%,

de 10% a 100%, de 10% a 99%, de 10% a 95%, de 10% a 90%, de 10% a 85%, de 10% a 80%, de 10% a 75%, de 10% a 70%, de 10% a 65%, de 10% a 60%, de 10% a 55%, de 10% a 50%, de 10% a 45%, de 10% a 40%, de 10% a 35%, de 10% a 30%, de 10% a 25%, de 10% a 20%, de 10% a 15%, de 20% a 100%, de 20% a 99%, de 20% a 95%, de 20% a 90%, de 20% a 85%, de 20% a 80%, de 20% a 75%, de 20% a 70%, de 20% a 65%, de 20% a 60%, de 20% a 55%, de 20% a 50%, de 20% a 45%, de 20% a 40%, de 20% a 35%, de 20% a 30%, de 20% a 25%, de 40% a 100%, de 40% a 99%, de 40% a 95%, de 40% a 90%, de 40% a 85%, de 40% a 80%, de 40% a 75%, de 40% a 70%, de 40% a 65%, de 40% a 60%, de 40% a 55%, de 40% a 50%, de 60% a 100%, de 60% a 99%, de 60% a 95%, de 60% a 90%, de 60% a 85%, de 60% a 80%, de 60% a 75%, de 50% a 100%, de 50% a 99%, de 50% a 95%, de 50% a 90%, de 50% a 85%, de 50% a 80%, de 50% a 75%, de 50% a 70%, de 50% a 65%, de 50% a 60%, de 70% a 100%, de 70% a 99%, de 70% a 95%, de 70% a 90%, de 70% a 85%, de 70% a 80%, de 70% a 75%, de 80% a 100%, de 80% a 99%, de 80% a 95%, de 80% a 90%, de 80% a 85%, de 90% a 100%, de 90% a 99% o de 90% a 95%.

[0241] Modalidad 94: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 90 a 93, en donde el glicano GlcNAc es un monoglicano GlcNAc o un glicano GlcNAc-Fuc.

[0242] Modalidad 95: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 90 a 94, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo

o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0243] Modalidad 96: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 95, en donde el glicano se encuentra sobre una región constante del anticuerpo.

5 **[0244]** Modalidad 97: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 96, en donde el glicano se encuentra sobre una cadena pesada del anticuerpo.

[0245] Modalidad 98: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 95
10 a 97, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio de glucosilación del anticuerpo.

[0246] Modalidad 99: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de la Modalidad 98, en donde el glicano se encuentra sobre un sitio N46, N402 y/o N297 del
15 anticuerpo.

[0247] Modalidad 100: La pluralidad de glucoproteínas recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 95 a 99, en donde el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

[0248] Modalidad 101: La pluralidad de glucoproteínas
20 recombinantes enriquecidas de cualquiera de las Modalidades 90 a 100, que se obtiene utilizando el método para la glucoingeniería de una glucoproteína recombinante de cualquiera de las Modalidades 72 a 89.

[0249] SECUENCIAS

5	SEQ ID NO: 01 ST6GAL1, aa	MIHTNLKKKFSCCVLVFLLFAVICVWKEKKKGSYYDSFKLQTKE FQVLKSLGKGLAMGSDSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAK PEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNYLSMNKYKVS YKGP GPG IKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFPFNTSEWEGYLPKESIRT KAGPWGRCAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQ QDVGTKTTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSL YNEGILIVWDPSVYHS DIPK WYQNP DYNFFN NYKTYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDIL QEISPEEIQPNPPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDV CYYYQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKA TLPGFRTIHC
10	SEQ ID NO: 02 PspST únicamente, aa	NVVAPSLEVYVDHASLPTLQQLMDIIKSEEENPTAQRYIAWGRI VPTDEQMKELNITSFALINNHTPADLVQEIVKQAQTKHRLNVKL SSNTAHSFDNLVPILKELNSFNNVTVTNIDLYDDGSMEYVNLYN WRDTLNKTDNLKIGKDYLEDVINGINEDTSNTGTSSVYNWQKLY PANYHFLRKDYLTLEPSLHEL RDYIGDSLKQM QWDGFKKFSKQ QELFLSIVNFDKQKLQNEYNSSNLPNFVFTGTTVWGGNHEREYY AKQQINVINNAINESSPHYLGNSYDLFFKGHPGGGIINTLIMQN YPSMVDIPSKISFEVLMMTDMLPDAVAGIASSLYFTIPA EKI KF IVFTSTETITDRETALRSPLVQVMIKLGIVKEENVLFWADLPNC ETGVC
15	SEQ ID NO: 03 PspST modificado (Péptido señal ST6GAL1), aa	MIHTNLKKKFSCCVLVFLLFAVICVWKEKKKGSYYDSFKLQTKE FQVLKSLGKGLAMGSDSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAK PGGGGSGGGGSGGGGSNVVAPSLEVYVDHASLPTLQQLMDIIKS EEENPTAQRYIAWGRI VPTDEQMKELNITSFALINNHTPADLVQ EIVKQAQTKHRLNVKLSSNTAHSFDNLVPILKELNSFNNVTVTN
20		
25		

5		IDLYDDGSMEYVNLYNWRDTLNKTDNLKIGKDYLEDVINGINED TSNTGTSSVYNWQKLYPANYHFLRKDYLTLEPSLHEL RDYIGDS LKQM QWDGFKKFNSKQQELFLSIVNFDKQKLQNEYNSSNLPNFV FTGTTVWGGNHEREYYAKQQINVINNAINESSPHYLGNSYDLFF KGHPGGGIINTLIMQNYPSMVDIPSKISFEVLMMTDMLPDAVAG IASSLYFTIPAEEKIKFIVFTSTETITDRETALRSPLVQVMIKLG IVKEENVLFWADLPNCETGVCGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM RLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGR DLSRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLG ASSQPRPGGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALS LPACPEE SPLLVGPM LIEFNMPVDLELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHK VAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIYVINQAGDTI FNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDVLI PMNDHNAYRCFSQ PRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALS KQQFLTINGFPNNYWG WGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNP QRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTP S
20	SEQ ID NO: 04 PspST modificado (Péptido señal B4GALT1), aa	MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAG RDLSRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPL GASSQPRPGGGGGGSGGGGSGGGGSNVVAPSLEVYVDHASLPTL QQLM DIIKSEEENPTAQRYIAWGRIVPTDEQMKELNITSFALIN NHTPADLVQEIVKQAQTKHRLNVKLSSNTAHSFDNLVPILKELN SFNNVTVTNIDLYDDGSMEYVNLYNWRDTLNKTDNLKIGKDYLE DVINGINEDTSNTGTSSVYNWQKLYPANYHFLRKDYLTLEPSLH ELRDYIGDSLKQM QWDGFKKFNSKQQELFLSIVNFDKQKLQNEY
25		

5		NSSNLPNFVFTGTTVWGGNHEREYYAKQQINVINNAINESSPHY LGNSYDLFFKGHPGGGIINTLIMQNYPSMVDIPSKISFEVLMMT DMLPDAVAGIASSLYFTIPAEEKIKFIVFTSTETITDRETALRSP LVQVMIKLGIVKEENVLFWADLPNCETGVCGSGATNFSLLKQAG DVEENPGPMRLREPLLSGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGV TLVYYLAGRDL SRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTG GARPPPPLGASSQPRPGGDSSPVVD SGPGPASNLTSVPVPHTTA LSLPACPEESPLLVGPM LIEFNMPVDLELVAKQNP NVKMGGRYA PRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYYLHPVLQRQQLDYGIY VINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSDVDLIPMND HNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALS KQQFLT I NGFPNNYWGWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPN AVVGRCRMIRHS RDKKNEPNPQRFDR IAH TKETMLS DGLNSLT YQVLDVQRYPLYT QITVDIGTPS
15	SEQ ID NO: 05 B4GALT1, aa	MRLREPLLSGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAG RDL SRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPL GASSQPRPGGDSSPVVD SGPGPASNLTSVPVPHTTALS L PACPE ESPLLVGPM LIEFNMPVDLELVAKQNP NVKMGGRYA PRDCVSPH KVAIIIPFRNRQEHLKYWLYYLHPVLQRQQLDYGIYVINQAGDT IFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSDVDLIPMNDHNAYRCFS QPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALS KQQFLT INGFPNNYW GWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPN AVVGRCRMIRHS RDKKNEPN PQRFDRIAH TKETMLS DGLNSLT YQVLDVQRYPLYTQITVDIGT PS
25	SEQ ID NO: 06	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

	Péptido de Desplazamiento Ribosómico - P2A, aa	
5	SEQ ID NO: 07 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - T2A, aa	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
10	SEQ ID NO: 08 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - E2A, aa	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
15	SEQ ID NO: 09 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - F2A, aa	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
20	SEQ ID NO: 10 ST6GAL1, nt	ATGATCCACACCAATCTGAAGAAGAAGTTTAGCTGTTGCGTGCT GGTGTTCCTGCTGTTGCTGTGATCTGCGTGTTGGAAGGAGAAGA AGAAGGGCAGCTATTATGACTCCTTTAAGCTGCAGACCAAGGAG TTCCAGGTGCTGAAGTCCCTGGGCAAGCTGGCCATGGGCAGCGA CTCCCAGTCCGTGAGCTCCTCCAGCACCCAGGACCCCCACCGGG GAAGGCAGACCCTGGGATCCCTGAGGGGCCTGGCTAAGGCCAAG
25		

5	CCTGAGGCTTCCTTCCAGGTGTGGAATAAGGATAGCTCCAGCAA GAACCTGATCCCTAGGCTGCAGAAGATCTGGAAGAACTATCTGA GCATGAACAAGTATAAGGTGAGCTATAAGGGCCCTGGCCCTGGC ATCAAGTTCTCCGCCGAGGCCCTGAGGTGCCACCTGAGAGATCA CGTGAATGTGAGCATGGTGGAGGTGACCGACTTCCCTTTTAACA CCTCCGAGTGGGAGGGCTACCTGCCCAAGGAGAGCATCCGGACC AAGGCCGGCCCTTGGGGCAGATGTGCCGTGGTGTCCAGCGCCGG CTCCCTGAAGAGCTCCCAGCTGGGCCGGGAGATCGATGACCACG ATGCTGTGCTGAGGTTCAATGGCGCTCCTACCGCTAACTTTCAG 10 CAGGATGTGGGCACCAAGACCACCATCCGGCTGATGAATAGCCA GCTGGTGACCACCGAGAAGCGGTTTCTGAAGGACTCCCTGTACA ACGAGGGCATCCTGATCGTGTGGGACCCCTCCGTGTACCACAGC GACATCCCCAAGTGGTATCAGAACCCCGACTACAACCTTCTTCAA TAATTACAAGACCTACCGGAAGCTGCACCCCAACCAGCCCTTTT 15 ATATCCTGAAGCCCCAGATGCCTTGGGAGCTGTGGGACATCCTG CAGGAGATCTCCCCCGAGGAGATCCAGCCTAACCCCCCTAGCAG CGGCATGCTGGGCATCATCATCATGATGACCCTGTGCGATCAGG TGGATATCTACGAGTTCCTGCCCAGCAAGCGGAAGACCGACGTG TGTTATTATTATCAGAAGTTCTTCGATTCCGCCTGCACCATGGG 20 CGCCTATCACCTCTGCTGTACGAGAAGAATCTGGTGAAGCACC TGAACCAGGGCACCGACGAGGACATCTATCTGCTGGGCAAGGCC ACCCTGCCCCGGCTTTAGGACCATCCACTGCTGA
25	SEQ ID NO: 11 PspST ATGAAAACTTTTTATTATTAACCTTAAATATTACTTACTGCTTG TAATAATTCAGAAGAAAATACACAATCTATTATTAAAAATGATA

5	únicamente, nt	TTAATAAACTATTATTGATGAGGAGTATGTTAATTTAGAGCCA ATTAATCAATCAAACATCTCTTTTACAAAACACTCTTGGGTACA AACTTGTGGTACGCAACAAC TATTAACAGAACAAAATAAAGAGT CAATATCATTATCTGTAGTGGCGCCACGATTAGATGACGATGAA AAGTACTGCTTTGATTTTAAATGGTGTTAGTAATAAAGGTGAAAA ATATATAACAAAAGTAACATTAAACGTAGTGGCTCCATCTTTAG AGGTTTATGTTGATCATGCATCTCTTCCAACCTCTTCAGCAGCTA ATGGATATTATTAAATCGGAAGAAGAAAATCCTACAGCACAAAG ATATATAGCTTGGGGGAGAATAGTTCCGACTGATGAGCAAATGA 10 AAGAGTTAAATATTACATCGTTTGCATTGATAAATAACCATACA CCAGCTGACTTAGTACAAGAAATTGTTAAGCAAGCACAAACAAA GCATAGATTGAATGTTAAACTTAGCTCTAACACTGCTCATTTCAT TTGATAATTTAGTGCCAATACTAAAAGAATTAAATTCGTTTAAAT AACGTTACGGTAACAAATATAGATTTATATGATGATGGTTCAGC 15 AGAATATGTAAATTTATATAACTGGAGAGATACATTAAATAAAA CAGATAATTTAAAAATTGGTAAAGATTATCTTGAGGATGTCATT AATGGTATCAATGAAGACACTTCAAATACAGGAACATCATCTGT TTATAACTGGCAAAAAC TATATCCAGCTAACTACCATTTTTTTAA GAAAAGATTATTTAACTTTAGAACCATCATTACATGAGTTACGA 20 GACTATATTGGTGATAGTTTAAAGCAAATGCAATGGGATGGTTT CAAAAAATTCAATAGCAAACAACAAGAATTATTCTTATCGATTG TTAATTTTGACAAACAAAAATTACAAAATGAATATAATTCATCT AATTTACCAAAC TTTGTGTTTACAGGTACGACTGTATGGGCTGG TAACCATGAAAGAGAGTATTATGCGAAACAACAAATTAATGTCA 25 TTAATAATGCAATTAATGAATCGAGCCACATTATTTAGGCAAT
---	----------------	--

5		AGTTATGATTTGTTCTTCAAAGGTCACCCTGGTGGCGGTATCAT TAATACATTAATAATGCAAACTATCCTTCAATGGTTGATATTC CATCAAAAATATCATTTGAAGTTTTGATGATGACAGATATGCTT CCTGATGCAGTTGCTGGTATAGCGAGCTCTTTATATTTACGAT ACCAGCTGAAAAAATTAAATTTATAGTTTTTACATCGACAGAAA CTATAACTGATCGTGAACTGCTTTGAGAAGTCCTTTAGTTCAA GTAATGATAAACTAGGTATTGTAAAAGAAGAGAATGTACTTTT TTGGGCTGATCTGCCAAATTGTGAAACAGGTGTTTGTATTGCAG TCTAG
10	SEQ ID NO: 12 PspST modificado (Péptido señal ST6GAL1), nt	ATGATCCACACCAACCTGAAGAAGAAGTTCTCCTGCTGTGTGCT GGTGTTTTCTGCTGTTTCGCTGTGATCTGCGTGTGGAAGGAGAAGA AGAAGGGCAGCTATTATGACAGCTTTAAGCTGCAGACCAAGGAG TTTCAGGTGCTGAAGTCCCTGGGCAAGCTGGCCATGGGCTCCGA CTCCCAGTCCGTGTCCAGCTCCAGCACCCAGGATCCTCACCGGG GCAGGCAGACCCTGGGCTCTCTGAGAGGCCTGGCTAAGGCTAAG CCCGGCGGCGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGAGG ATCCAATGTGGTGGCCCCCTTCCCTGGAGGTGTATGTGGACCACG CCTCCCTGCCCACCCTGCAGCAGCTGATGGATATCATCAAGAGC GAGGAGGAGAATCCTACCGCCCAGCGGTATATCGCCTGGGGCCG GATCGTGCCTACCGACGAGCAGATGAAGGAGCTGAACATCACCT CCTTCGCTCTGATCAACAATCACACCCCCGCCGACCTGGTGCAG GAGATCGTGAAGCAGGCCCAGACCAAGCACCGGCTGAACGTGAA GCTGTCCTCCAACACCGCCCCTCCTTTGACAACCTGGTGCCTA TCCTGAAGGAGCTGAATTCCTTTAATAACGTGACCGTGACCAAC ATCGACCTGTACGACGACGGCTCCATGGAGTATGTGAACCTGTA
15		
20		
25		

5	TAACTGGAGGGACACCCTGAATAAGACCGACAATCTGAAGATCG GCAAGGACTATCTGGAGGACGTGATCAATGGCATCAATGAGGAC ACCTCCAACACCGGCACCAGCAGCGTGTATAACTGGCAGAAGCT GTACCCTGCTAATTACCACTTTCTGAGGAAGGATTATCTGACCC TGGAGCCTTCCCTGCACGAGCTGAGGGACTACATCGGCGATAGC CTGAAGCAGATGCAGTGGGATGGCTTTAAGAAGTTCAACAGCAA GCAGCAGGAGCTGTTTCTGAGCATCGTGAATTTTGACAAGCAGA AGCTGCAGAACGAGTATAACTCCTCCAATCTGCCTAACTTTGTG TTCACCGGCACCACCGTGTGGGGCGGCAATCACGAGCGGGAGTA CTATGCCAAGCAGCAGATCAACGTGATCAATAATGCCATCAATG AGAGCAGCCCCCACTACCTGGGCAATAGCTACGATCTGTTCTTC AAGGGCCACCCTGGCGGCGGCATCATCAACACCCTGATCATGCA GAACTATCCTTCCATGGTGGATATCCCTAGCAAGATCTCCTTCG AGGTGCTGATGATGACCGACATGCTGCCCCGACGCCGTGGCTGGC ATCGCCTCTAGCCTGTATTTTACCATCCCCGCTGAGAAGATCAA GTTCATCGTGTTTACCAGCACCGAGACCATCACCGACCGGGAGA CCGCCCTGAGGTCCCCACTGGTGCAGGTGATGATCAAGCTGGGC ATCGTGAAGGAGGAGAACGTGCTGTTTTGGGCCGACCTGCCCAA CTGTGAGACCGGCGTGTGTGGCTCCGGCGCTACCAACTTCTCCC TGCTGAAGCAGGCTGGCGATGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATG CGGCTGCGGGAGCCCCTGTTGTCCGGCTCTGCCGCTATGCCCGG CGCTTCCCTGCAGAGAGCCTGTCCGGCTGCTGGTGGCTGTGTGCG CTCTGCACCTGGGCGTGACCCTGGTGTACTATCTGGCTGGCCGG GATCTGAGCCGGCTGCCTCAGCTGGTGGGCGTGAGCACCCCCCT GCAGGGAGGATCCAACCTCCGCCGCTGCCATCGGCCAGTCCTCCG
10	
15	
20	
25	

5	GAGAGCTGCGGACCGGAGGCGCTAGGCCTCCACCACCACTGGGC GCTTCTTCCCAGCCTCGGCCCCGAGGAGATAGCAGCCCCGTGGT GGACTCCGGCCCTGGACCTGCTTCCAACCTGACCAGCGTGCCCG TGCTCACACCACCGCTCTGTCCCTGCCCGCCTGTCCCGAGGAG TCCCCTCTGCTGGTGGGCCCTATGCTGATCGAGTTTAATATGCC TGTGGACCTGGAGCTGGTGGCTAAGCAGAATCCTAACGTGAAGA TGGGCGGCAGGTACGCTCCCAGGGACTGCGTGAGCCCTCACAAG GTGGCCATCATCATCCCTTTCCGGAACCGGCAGGAGCACCTGAA GTACTGGCTGTACTACCTGCACCCTGTGCTGCAGAGGCAGCAGC 10 TGGACTATGGCATCTACGTGATCAACCAGGCCGGCGACACCATC TTTAACCGGGCCAAGCTGCTGAATGTGGGCTTTCAGGAGGCCCT GAAGGATTATGACTACACCTGCTTTGTGTTTAGCGATGTGGATC TGATCCCTATGAACGATCACAACGCCTACCGGTGCTTCAGCCAG CCTCGGCACATCAGCGTGGCCATGGACAAGTTCGGCTTCTCCCT 15 GCCTTACGTGCAGTACTTCGGCGGCGTGTCCGCCCTGTCCAAGC AGCAGTTCCTGACCATCAACGGCTTTCCTAATAACTACTGGGGC TGGGGCGGCGAGGATGATGACATCTTTAATCGGCTGGTGTTTAG GGGCATGAGCATCAGCCGGCCTAACGCCGTGGTGGGCAGGTGCA GGATGATCAGGCACTCCCGGGACAAGAAGAACGAGCCTAATCCT 20 CAGAGGTTTGACAGGATCGCTCACACCAAGGAGACCATGCTGAG CGACGGCCTGAATAGCCTGACCTACCAGGTGCTGGACGTGCAGA GGTACCCTCTGTATACCCAGATCACCGTGGATATCGGCACCCCT AGCTGA
25	SEQ ID NO: 13 PspST ATGAGGCTGCGGGAGCCATTGCTGAGCGGCTCCGCTGCCATGCC TGGCGCTTCTCTGCAGAGGGCTTGTAGGCTGCTGGTGGCCGTGT

5	modificado (Péptido señal B4GALT1), nt	GCGCCCTGCACCTGGGAGTGACCCTGGTGTACTACCTGGCTGGC CGGGACCTGTCCCGGCTGCCTCAGTTGGTGGGCGTGTCCACCCC TCTGCAGGGCGGCGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCG GAGGATCCAATGTGGTGGCCCCTTCCCTGGAGGTGTATGTGGAC CACGCCTCCCTGCCCACCCTGCAGCAGCTGATGGATATCATCAA GAGCGAGGAGGAGAATCCTACCGCCCAGCGGTATATCGCCTGGG GCCGGATCGTGCCTACCGACGAGCAGATGAAGGAGCTGAACATC ACCTCCTTCGCTCTGATCAACAATCACACCCCCGCCGACCTGGT GCAGGAGATCGTGAAGCAGGCCAGACCAAGCACCGGCTGAACG TGAAGCTGTCCTCCAACACCGCCCCTCCTTTGACAACCTGGTG CCTATCCTGAAGGAGCTGAATTCCTTTAATAACGTGACCGTGAC CAACATCGACCTGTACGACGACGGCTCCATGGAGTATGTGAACC TGTATAACTGGAGGGACACCCTGAATAAGACCGACAATCTGAAG ATCGGCAAGGACTATCTGGAGGACGTGATCAATGGCATCAATGA GGACACCTCCAACACCGGCACCAGCAGCGTGTATAACTGGCAGA AGCTGTACCCTGCTAATTACCACTTTCTGAGGAAGGATTATCTG ACCCTGGAGCCTTCCCTGCACGAGCTGAGGGACTACATCGGCGA TAGCCTGAAGCAGATGCAGTGGGATGGCTTTAAGAAGTTCAACA GCAAGCAGCAGGAGCTGTTTCTGAGCATCGTGAATTTTGACAAG CAGAAGCTGCAGAACGAGTATAACTCCTCCAATCTGCCTAACTT TGTGTTACCGGCACCACCGTGTGGGGCGGCAATCACGAGCGGG AGTACTATGCCAAGCAGCAGATCAACGTGATCAATAATGCCATC AATGAGAGCAGCCCCCACTACCTGGGCAATAGCTACGATCTGTT CTTCAAGGGCCACCCTGGCGGCGGCATCATCAACACCCTGATCA TGCAGAACTATCCTTCCATGGTGGATATCCCTAGCAAGATCTCC
10		
15		
20		
25		

5		TTCGAGGTGCTGATGATGACCGACATGCTGCCCCGACGCCGTGGC TGGCATCGCCTCTAGCCTGTATTTTACCATCCCCGCTGAGAAGA TCAAGTTCATCGTGTTTACCAGCACCGAGACCATCACCGACCGG GAGACCGCCCTGAGGTCCCCACTGGTGCAGGTGATGATCAAGCT GGGCATCGTGAAGGAGGAGAACGTGCTGTTTTGGGCCGACCTGC CCAACTGTGAGACCGGCGTGTGT
10	SEQID NO: 14 B4GALT1, nt	ATGAGGCTGCGGGAGCCATTGCTGAGCGGCTCCGCTGCCATGCC TGGCGCTTCTCTGCAGAGGGCTTGTAGGCTGCTGGTGGCCGTGT GCGCCCTGCACCTGGGAGTGACCCTGGTGTACTACCTGGCTGGC CGGGACCTGTCCCGGCTGCCTCAGTTGGTGGGCGTGTCCACCCC TCTGCAGGGCGGAAGCAATAGCGCCGCTGCCATCGGCCAGTCCT CCGGAGAGCTGCGGACCGGAGGCGCTAGGCCACCTCCACCTCTG GGCGCTTCCTCCCAGCCTCGGCCTGGAGGAGATAGCAGCCCCGT GGTGGATAGCGGCCCTGGCCCAGCTTCTAACCTGACCAGCGTG CTGTGCCCCACACCACCGCCCTGAGCCTGCCTGCTTGCCCCGAG GAGTCCCCCCTGCTGGTGGGACCAATGCTGATCGAGTTCAATAT GCCTGTGGATCTGGAGCTGGTGGCCAAGCAGAATCCCAATGTGA AGATGGGCGGCCGGTACGCTCCCCGGGATTGTGTGTCCCCTCAC AAGGTGGCTATCATCATCCCTTTCCGGAACCGGCAGGAGCACCT GAAGTACTGGCTGTATTACCTGCACCCCGTGCTGCAGAGGCAGC AGCTGGACTATGGCATCTACGTGATCAATCAGGCTGGCGACACC ATCTTCAATCGGGCTAAGCTGCTGAACGTGGGCTTTCAGGAGGC TCTGAAGGACTACGACTACACCTGCTTTGTGTTTCAGCGATGTGG ACCTGATCCCCATGAACGACCACAACGCTTATAGGTGCTTCTCC CAGCCTAGGCACATCTCCGTGGCTATGGACAAGTTTGGCTTCTC
15		
20		
25		

5		CCTGCCCTACGTGCAGTATTTTGGCGGCGTGTCCGCCCTGAGCA AGCAGCAGTTTCTGACCATCAATGGCTTTCCTAACAATTACTGG GGCTGGGGCGGCGAGGATGATGACATCTTCAACCGGCTGGTGTT CAGGGGCATGTCCATCAGCAGGCCTAACGCTGTGGTGGGCCGGT GTAGGATGATCAGGCACTCCCGGGACAAGAAGAATGAGCCCAAT CCTCAGCGGTTTGACCGGATCGCCCACACCAAGGAGACCATGCT GTCCGACGGCCTGAATTCCCTGACCTACCAGGTGCTGGACGTGC AGAGGTATCCTCTGTACACCCAGATCACCGTGGATATCGGCACC CCTTCCTGA
10	SEQ ID NO: 15 Endo H, aa	MFTPVRRRVRTAALALSAAAALVLGSTAASGASATPSPAPAPAP APVKQGPTSVAYVEVNNNSMLNVGKYTLADGGGNAFDVAVIFAA NINYDTGTKTAYLHFNENVQRVLDNAVQTQIRPLQQQGIKVLLSV LGNHQGAGFANFPSQQAASAFKQLSDAVAKYGLDGVDFDDEYA EYGNNGTAQPNDSSFVHLVTALRANMPDKIISLYNIGPAASRLS YGGVDVSDKFYAWNPYYGTWQVPGIALPKAQLSPA AVEIGRTS RSTVADLARRTVDEGYGVYLTYNLDGGDRTADVSAFTRELYGSE AVRTP
15		
20	SEQ ID NO: 16 Endo S2, aa	MDKHELLVKRTLGCVCAATLMGAALATHHDSLNTVKAEEKTVQTG KTDQQVGAKLVQEIREGKRGPLYAGYFRTWHDRASTGIDGKQQH PENTMAEVPKEVDILFVFHDHTASDSPFWSELKDSYVHKLHQQG TALVQTIGVNELNGRTGLSKDYPDTPEGNKALAAAIVKAFVTDR GVDGLDIDIEHEFTNKRTPEEDARALNVFKEIAQLIGKNGSDKS KLLIMDTTSLVENNPFIKGAEDLDYLLRQYYGSQGGEAEVDTI NSDWNQYQNYIDASQFMIGFSFFEESASKGNLWFDVNEYDPNNP EKGKDIEGTRAKKYAEWQPSTGGLKAGIFSYAIDRDGVAHVPST
25		

5		YKNRTSTNLQRHEVDNISHTDYTVSRKLKTLMTEDKRYDVIDQK DIPDPALREQIIQQVGQYKGDLELYNKTLVLTGDKIQNLKGLEK LSKLQKLELRQLSNVKEITPELLPESMKKDAELVMVGMTGLEKL NLSGLNRQTLDGIDVNSITHLTSFDISHNSLDLSEKSEDRKLLM TLMEQVSNHQKITVKNTAFENQKPKGYYPQTYDTKEGHYVDNA EHDILTDFVFGTVTKRNTFIGDEEAFAIYKEGAVDGRQYVSKDY TYEAFRKDYKGYKVHLTASNLGETVTSKVTATTDETYLVDVSDG EKVVHHMKLNIGSGAIMMENLAKGAKVIGTSGDFEQAKKIFDGE KSDRFFTGWQTNWIAFDLGEINLAKEWRLFNAETNTEIKTDSSL 10 NVAKGRLQILKDTTIDLEKMDIKNRKEYLSNDENWTDVAQMDDA KAIFNSKLSNVLSRYWRFCVDGGASSYYPQYTELQILGQRLSND VANTLKD
15	SEQ ID NO: 17 Endo H, nt	GACTCGAAGCACTCGCTCGGCGCTTCCGACTGGCGGGGCGCCGA CCATCCCGTTGGGAGACCATCAGCCATGTTCACTCCGGTTCGCA GAAGGGTGCGGACGGCTGCGCTCGCGCTCTCGGCCGCCGCGGCC CTCGTCCTCGGTTCCACCGCCGCGAGCGGCGCGTCAGCGACCCC CTCACCCGCTCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGTGAAGCAGGGGC CGACCTCGGTGGCCTACGTCGAGGTGAACAACAACAGCATGCTC AACGTCGGCAAGTACACCCTGGCGGACGGAGGCGGCAACGCCTT 20 CGACGTAGCCGTGATCTTCGCGGCGAACATCAACTACGACACCG GCACGAAGACGGCCTACCTGCACTTCAACGAGAACGTGCAGCGC GTCCTTGACAACGCTGTCACGCAGATACGGCCGTTGCAGCAACA GGGCATCAAGGTCCTCCTCTCGGTGCTCGGCAACCACCAGGGCG CCGGGTTCGCGAACTTCCCCTCACAGCAGGCGGCTTCGGCGTTC 25 GCGAAGCAGCTCTCGGACGCCGTGGCGAAGTACGGCCTCGACGG

5		CGTCGACTTCGACGACGAATACGCCGAGTACGGCAACAACGGCA CCGCGCAGCCCAACGACAGTTCGTTCGTGCACCTGGTGACGGCA CTGCGCGCGAACATGCCCCGACAAGATCATCAGCCTCTACAACAT CGGCCCGGCCGCGTCCCGCCTGTCTGTACGGCGGTGTCTGACGTCT CCGACAAGTTCGACTACGCCTGGAATCCCTACTACGGCACCTGG CAGGTCCCCGGCATCGCACTGCCCAAGGCGCAGCTGTCTGCCGGC GGCCGTCTGAGATCGGCCGGACCTCACGGAGCACCGTCTGCCGACC TCGCCCGTCTGCACCGTCTGACGAGGGGTACGGCGTCTATCTGACG TACAACCTCTGACGGCGGCGATCGCACCGCCGACGTCTCCGCGTT CACCAGGGAGCTGTACGGCAGCGAGGCGGTCCGGACGCCGTAGG GGCGTCTGGGGCCTGCCGTCTAGTCCAGTACGAAGGTGCCGCCGGC GGTGGTCTGCCTGGCCGTGCCCCGAAAGCGGCCGCCGGCGTCCAGG ATCC
15	SEQ ID NO: 18 Endo S2, nt	GGCGAACTATAGGAATGCGCTTACATAGATGGTATATCAGATGG GAAGCCATGACTTAGTACCAAAAATAAGGAGTGTCCAAATGGAT AAACATTTGTTGGTAAAAAGAACTAGGGTGTGTTTGTGCTGC AACGTTGATGGGAGCTGCCTTAGCGACCCACCATGATTCCTCA ATACTGTAAAAGCGGAGGAGAAGACTGTTCAAACAGGAAAGACA GATCAGCAGGTTGGTGCTAAATTGGTACAGGAAATCCGTGAAGG AAAACGCGGACCACTATATGCTGGTTATTTTAGGACATGGCATG ATCGTGCTTCAACAGGAATAGATGGTAAACAGCAACATCCAGAA AATACTATGGCTGAGGTCCCCAAAAGAAGTTGATATCTTATTTGT TTTTTCATGACCATACAGCTTCAGATAGTCCATTTTGGTCTGAAT TAAAGGACAGTTATGTCCATAAATTACATCAACAGGGAACGGCA CTTGTTTCAGACAATTGGTGTTAACGAATTAAATGGACGTACAGG
25		

5	TTTATCTAAAGATTATCCTGATACTCCTGAGGGGAACAAAGCTT TAGCAGCAGCCATTGTCAAGGCATTTGTAACTGATCGTGGTGTC GATGGACTAGATATTGATATTGAGCACGAATTTACGAACAAAAG AACACCTGAAGAAGATGCTCGTGCTCTAAATGTTTTTAAAGAGA TTGCGCAGTTAATAGGTAAAAATGGTAGTGATAAATCTAAATTG CTCATCATGGACACTACCCTAAGTGTTGAAAATAATCCAATATT TAAAGGGATAGCGGAAGATCTTGATTATCTTCTTAGACAATATT ATGGTTCACAAGGTGGAGAAGCTGAAGTGGATACTATAAACTCT GATTGGAACCAATATCAGAATTATATTGATGCTAGCCAGTTCAT
10	GATTGGATTCTCCTTTTTTTGAAGAATCTGCGTCCAAAGGGAATT TATGGTTTGATGTTAACGAATACGACCCTAACAATCCTGAAAAA GGGAAAGATATTGAAGGAACACGTGCTAAAAAATATGCAGAGTG GCAACCTAGTACAGGTGGTTTAAAAGCAGGTATATTCTCTTATG CTATTGATCGTGATGGAGTGGCTCATGTTTCCTTCAACATATAAA
15	AATAGGACTAGTACAAATTTACAACGGCATGAAGTCGATAATAT CTCACATACTGACTACACCGTATCTCGAAAATTAAAAACATTGA TGACCGAAGACAAACGCTATGATGTCATTGATCAAAAAGACATT CCTGACCCAGCATTAAGAGAACAAATCATTCAACAAGTTGGACA GTATAAAGGCGATTTGGAACGTTATAACAAGACATTGGTGCTTA
20	CAGGAGATAAGATTCAAAATCTTAAAGGACTAGAAAAATTAAGC AAGTTACAAAAATTAGAGTTGCGCCAGCTATCTAACGTTAAAGA AATTACTCCAGAACTTTTGCCGGAAAGCATGAAAAAAGATGCTG AGCTTGTTATGGTAGGCATGACTGGTTTAGAAAACTAAACCTT AGTGGTCTAAATCGTCAAACCTTTAGACGGTATAGACGTGAATAG
25	TATTACGCATTTGACATCATTTGATATTTACATAATAGTTTGG

		TTTGATGACATAAAGCTAAATAATCGTTAGACTACCAGAAAGTG GCGC
5	SEQ ID NO: 19 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - P2A, nt	GGCTCCGGCGCTACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCTGGCGA TGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT
10	SEQ ID NO: 20 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - T2A, nt	GGTTCAGGTGAGGGCCGCGGCAGTCTGCTGACTTGCGGCGACGT CGAGGAGAACCCCGGTCCT
15	SEQ ID NO: 21 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - E2A, nt	GGGAGTGGGCAATGCACTAACTATGCATTGCTTAAGTTGGCTGG TGATGTAGAATCTAATCCTGGGCCC
20	SEQ ID NO: 22 Péptido de Desplazamiento Ribosómico - F2A, nt	GGCAGTGGGGTGAAGCAGACCCTCAATTTTGACTTGTTGAACT CGCAGGCGACGTAGAATCTAACCCCGGACCT
25	SEQ ID NO: 23 SWG-006, nt	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGT ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCC TGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTT

5	AAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGC CAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC
10	CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT GATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG
15	TAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCGCCACCATGATCCACACCAAT CTGAAGAAGAAGTTTAGCTGTTGCGTGCTGGTGTTCCTGCTGTT
20	CGCTGTGATCTGCGTGTTGAAGGAGAAGAAGAAGGGCAGCTATT ATGACTCCTTTAAGCTGCAGACCAAGGAGTTCCAGGTGCTGAAG TCCCTGGGCAAGCTGGCCATGGGCAGCGACTCCCAGTCCGTGAG CTCCTCCAGCACCCAGGACCCCCACCGGGGAAGGCAGACCCTGG GATCCCTGAGGGGCCTGGCTAAGGCCAAGCCTGAGGCTTCCTTC
25	CAGGTGTGGAATAAGGATAGCTCCAGCAAGAACCTGATCCCTAG

5	GCTGCAGAAGATCTGGAAGAACTATCTGAGCATGAACAAGTATA AGGTGAGCTATAAGGGCCCTGGCCCTGGCATCAAGTTCTCCGCC GAGGCCCTGAGGTGCCACCTGAGAGATCACGTGAATGTGAGCAT GGTGGAGGTGACCGACTTCCCTTTTAACACCTCCGAGTGGGAGG GCTACCTGCCCAAGGAGAGCATCCGGACCAAGGCCGGCCCTTGG GGCAGATGTGCCGTGGTGTCCAGCGCCGGCTCCCTGAAGAGCTC CCAGCTGGGCCGGGAGATCGATGACCACGATGCTGTGCTGAGGT TCAATGGCGCTCCTACCGCTAACTTTTCAGCAGGATGTGGGCACC AAGACCACCATCCGGCTGATGAATAGCCAGCTGGTGACCACCGA
10	GAAGCGGTTTCTGAAGGACTCCCTGTACAACGAGGGCATCCTGA TCGTGTGGGACCCCTCCGTGTACCACAGCGACATCCCCAAGTGG TATCAGAACCCCGACTACAACCTTCTTCAATAATTACAAGACCTA CCGGAAGCTGCACCCCAACCAGCCCTTTTATATCCTGAAGCCCC AGATGCCTTGGGAGCTGTGGGACATCCTGCAGGAGATCTCCCCC GAGGAGATCCAGCCTAACCCCCCTAGCAGCGGCATGCTGGGCAT CATCATCATGATGACCCTGTGCGATCAGGTGGATATCTACGAGT TCCTGCCCAGCAAGCGGAAGACCGACGTGTGTTATTATTATCAG AAGTTCTTCGATTCCGCCTGCACCATGGGCGCCTATCACCTCT
15	GCTGTACGAGAAGAATCTGGTGAAGCACCTGAACCAGGGCACCG ACGAGGACATCTATCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGCCCCGGCTTT AGGACCATCCACTGCGGCAGCGGCGCTACCAATTTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGCGATGTGGAGGAGAACCCCGGCCCCATGAGGC TGCGGGAGCCATTGCTGAGCGGCTCCGCTGCCATGCCTGGCGCT TCTCTGCAGAGGGCTTGTTAGGCTGCTGGTGGCCGTGTGCGCCCT GCACCTGGGAGTGACCCTGGTGTACTACCTGGCTGGCCGGGACC
25	

5	TGTCCCGGCTGCCTCAGTTGGTGGGCGTGTCCACCCCTCTGCAG GGCGGAAGCAATAGCGCCGCTGCCATCGGCCAGTCCTCCGGAGA GCTGCGGACCGGAGGCGCTAGGCCACCTCCACCTCTGGGCGCTT CCTCCCAGCCTCGGCCTGGAGGAGATAGCAGCCCCGTGGTGGAT AGCGGCCCTGGCCCAGCTTCTAACCTGACCAGCGTGCCTGTGCC CCACACCACCGCCCTGAGCCTGCCTGCTTGCCCCGAGGAGTCCC CCCTGCTGGTGGGACCAATGCTGATCGAGTTCAATATGCCTGTG GATCTGGAGCTGGTGGCCAAGCAGAATCCCAATGTGAAGATGGG CGGCCGGTACGCTCCCCGGGATTGTGTGTCCCCTCACAAGGTGG CTATCATCATCCCTTTCCGGAACCGGCAGGAGCACCTGAAGTAC TGGCTGTATTACCTGCACCCCGTGCTGCAGAGGCAGCAGCTGGA CTATGGCATCTACGTGATCAATCAGGCTGGCGACACCATCTTCA ATCGGGCTAAGCTGCTGAACGTGGGCTTTCAGGAGGCTCTGAAG GACTACGACTACACCTGCTTTGTGTTCAGCGATGTGGACCTGAT CCCCATGAACGACCACAACGCTTATAGGTGCTTCTCCCAGCCTA GGCACATCTCCGTGGCTATGGACAAGTTTGGCTTCTCCCTGCCC TACGTGCAGTATTTTGGCGGCGTGTCCGCCCTGAGCAAGCAGCA GTTTCTGACCATCAATGGCTTTCCTAACAATTACTGGGGCTGGG GCGGCGAGGATGATGACATCTTCAACCGGCTGGTGTTCAGGGGC ATGTCCATCAGCAGGCCTAACGCTGTGGTGGGCCGGTGTAGGAT GATCAGGCACTCCCGGGACAAGAAGAATGAGCCCAATCCTCAGC GGTTTGACCGGATCGCCCACACCAAGGAGACCATGCTGTCCGAC GGCCTGAATTCCCTGACCTACCAGGTGCTGGACGTGCAGAGGTA TCCTCTGTACACCCAGATCACCGTGGATATCGGCACCCCTTCCT GATGATGACTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA
10	
15	
20	
25	

5	GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG TCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG TGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCT AGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCG CCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCC
10	ACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC TTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA TAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAA TAGTGGA CTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
15	CGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCC TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA TTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCC AGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
20	AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGT CCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTT CCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTAT GCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCC
25	CGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGA

5	TGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG TTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGG CACAAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTG TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTC CGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGT GGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCC GGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
10	CCGGCTACCTGCCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATG ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTC GCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT GACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATG
15	GCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA AGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACG GTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT CTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACC
20	GACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCAC CGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGG ACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAG TTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA CAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTT
25	TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTA

5	TCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC TCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT GCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGT ATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC GGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC 10 ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGC ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA GGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT GCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCG 15 CCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGG CTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTAT CCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG 20 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT ACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTGTGCAAGCAGC AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC 25 TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
---	---

5	AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGG CCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG TCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGT
10	TAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG TGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCC CAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGT TGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
15	TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
20	CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTT ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAA TGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATAC TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA
25	TAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCAC

	CTGACGTC
5	SEQ ID NO: 24 SWG-015, nt GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGT ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCC TGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTT AAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGC CAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC 10 CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAG TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC 15 CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT GATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG 20 TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCGCCACCATGATCCACACCAAC CTGAAGAAGAAGTTCTCCTGCTGTGTGCTGGTGTCTTGCTGTT CGCTGTGATCTGCGTGTGGAAGGAGAAGAAGAAGGGCAGCTATT 25 ATGACAGCTTTAAGCTGCAGACCAAGGAGTTTCAGGTGCTGAAG

5	TCCCTGGGCAAGCTGGCCATGGGCTCCGACTCCCAGTCCGTGTC CAGCTCCAGCACCCAGGATCCTCACCGGGGCAGGCAGACCCTGG GCTCTCTGAGAGGCCTGGCTAAGGCTAAGCCCGGCGGCGGAGGC AGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGAGGATCCAATGTGGTGGC CCCTTCCCTGGAGGTGTATGTGGACCACGCCTCCCTGCCCACCC TGCAGCAGCTGATGGATATCATCAAGAGCGAGGAGGAGAATCCT ACCGCCCAGCGGTATATCGCCTGGGGCCGGATCGTGCCTACCGA CGAGCAGATGAAGGAGCTGAACATCACCTCCTTCGCTCTGATCA ACAATCACACCCCCGCCGACCTGGTGCAGGAGATCGTGAAGCAG
10	GCCCAGACCAAGCACCGGCTGAACGTGAAGCTGTCCTCCAACAC CGCCCCTCCTTTGACAACCTGGTGCCTATCCTGAAGGAGCTGA ATTCTTTAATAACGTGACCGTGACCAACATCGACCTGTACGAC GACGGCTCCATGGAGTATGTGAACCTGTATAACTGGAGGGACAC CCTGAATAAGACCGACAATCTGAAGATCGGCAAGGACTATCTGG
15	AGGACGTGATCAATGGCATCAATGAGGACACCTCCAACACCGGC ACCAGCAGCGTGTATAACTGGCAGAAGCTGTACCCTGCTAATTA CCACTTTCTGAGGAAGGATTATCTGACCCTGGAGCCTTCCCTGC ACGAGCTGAGGGACTACATCGGCGATAGCCTGAAGCAGATGCAG TGGGATGGCTTTAAGAAGTTCAACAGCAAGCAGCAGGAGCTGTT
20	TCTGAGCATCGTGAATTTTGACAAGCAGAAGCTGCAGAACGAGT ATAACTCCTCCAATCTGCCTAACTTTGTGTTACCGGCACCACC GTGTGGGGCGGCAATCACGAGCGGGAGTACTATGCCAAGCAGCA GATCAACGTGATCAATAATGCCATCAATGAGAGCAGCCCCCACT ACCTGGGCAATAGCTACGATCTGTTCTTCAAGGGCCACCCTGGC
25	GGCGGCATCATCAACACCCTGATCATGCAGAACTATCCTTCCAT

5	GGTGGATATCCCTAGCAAGATCTCCTTCGAGGTGCTGATGATGA CCGACATGCTGCCCCGACGCCGTGGCTGGCATCGCCTCTAGCCTG TATTTTACCATCCCCGCTGAGAAGATCAAGTTCATCGTGTTTAC CAGCACCGAGACCATCACCGACCGGGAGACCGCCCTGAGGTCCC CACTGGTGCAGGTGATGATCAAGCTGGGCATCGTGAAGGAGGAG AACGTGCTGTTTTGGGCCGACCTGCCCAACTGTGAGACCGGCGT GTGTGGCTCCGGCGCTACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCTG GCGATGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATGCGGCTGCGGGAGCCC CTGTTGTCCGGCTCTGCCGCTATGCCCGGCGCTTCCCTGCAGAG
10	AGCCTGTCCGGCTGCTGGTGGCTGTGTGCGCTCTGCACCTGGGCG TGACCCTGGTGTACTATCTGGCTGGCCGGGATCTGAGCCGGCTG CCTCAGCTGGTGGGCGTGAGCACCCCCCTGCAGGGAGGATCCAA CTCCGCCGCTGCCATCGGCCAGTCCTCCGGAGAGCTGCGGACCG GAGGCGCTAGGCCTCCACCACCACTGGGCGCTTCTTCCCAGCCT
15	CGGCCCCGAGGAGATAGCAGCCCCGTGGTGGACTCCGGCCCTGG ACCTGCTTCCAACCTGACCAGCGTGCCCGTGCCCTCACACCACCG CTCTGTCCCTGCCCGCCTGTCCCGAGGAGTCCCCTCTGCTGGTG GGCCCTATGCTGATCGAGTTTAATATGCCTGTGGACCTGGAGCT GGTGGCTAAGCAGAATCCTAACGTGAAGATGGGCGGCAGGTACG
20	CTCCCAGGGACTGCGTGAGCCCTCACAAGGTGGCCATCATCATC CCTTTCCGGAACCGGCAGGAGCACCTGAAGTACTGGCTGTACTA CCTGCACCCTGTGCTGCAGAGGCAGCAGCTGGACTATGGCATCT ACGTGATCAACCAGGCCGGCGACACCATCTTTAACCGGGCCAAG CTGCTGAATGTGGGCTTTCAGGAGGCCCTGAAGGATTATGACTA
25	CACCTGCTTTGTGTTTAGCGATGTGGATCTGATCCCTATGAACG

5	ATCACAACGCCTACCGGTGCTTCAGCCAGCCTCGGCACATCAGC GTGGCCATGGACAAGTTCGGCTTCTCCCTGCCTTACGTGCAGTA CTTCGGCGGCGTGTCCGCCCTGTCCAAGCAGCAGTTCCTGACCA TCAACGGCTTTCCTAATAACTACTGGGGCTGGGGCGGCGAGGAT GATGACATCTTTAATCGGCTGGTGTTTAGGGGCATGAGCATCAG CCGGCCTAACGCCGTGGTGGGCAGGTGCAGGATGATCAGGCACT CCCGGGACAAGAAGAACGAGCCTAATCCTCAGAGGTTTGACAGG ATCGCTCACACCAAGGAGACCATGCTGAGCGACGGCCTGAATAG CCTGACCTACCAGGTGCTGGACGTGCAGAGGTACCCTCTGTATA 10 CCCAGATCACCGTGGATATCGGCACCCCTAGCTGACTCGAGTCT AGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCT TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT 15 GGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT GAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGC GCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCT 20 TTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCC CCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGAT GGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCC TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCC 25 AAAGTGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAT
---	---

5	TTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGT GTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCA GAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGT GGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGC CCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCC CATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGC CTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTG
10	GAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCC ATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCAT GATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGG TGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGC TGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCC
15	GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAC TGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC GTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAG GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGT CATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGAT
20	GCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATT CGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGA TGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCAT CAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCG CATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCT
25	GCTTGCCGAATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTC

5	ATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACAT AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAAT GGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGAT TCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG AGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAA CCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAA GGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATC CTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCAA CTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA
10	TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGT TGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTAT ACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG
15	AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTT TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGC TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGC GAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
20	GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT TCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA GGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
25	CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA

5	AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC GGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC CCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG GTAGCGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
10	AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA CGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTC TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA
15	TCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC TGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT CAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
20	CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGT TACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG
25	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC

5		ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCG GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAA GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTC TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAA TAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT CAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTC CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
10		
15	SEQ ID NO: 25 Vector de expresión ST6GAL1	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGT ACAATCTGCTCGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCT GCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTA AGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATC TGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCC AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT AGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG
20		
25		

5	ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGA GTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAAC CCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCGCCACCATGATCCACACCAATC TGAAGAAGAAGTTTAGCTGTTGCGTGCTGGTGTTCCTGCTGTTT GCTGTGATCTGCGTGTGGAAGGAGAAGAAGAAGGGCAGCTATTA
10	TGACTCCTTTAAGCTGCAGACCAAGGAGTTCCAGGTGCTGAAGT CCCTGGGCAAGCTGGCCATGGGCAGCGACTCCCAGTCCGTGAGC TCCTCCAGCACCCAGGACCCCCACCGGGGAAGGCAGACCCTGGG ATCCCTGAGGGGCCTGGCTAAGGCCAAGCCTGAGGCTTCCTTCC AGGTGTGGAATAAGGATAGCTCCAGCAAGAACCTGATCCCTAGG
15	CTGCAGAAGATCTGGAAGAACTATCTGAGCATGAACAAGTATAA GGTGAGCTATAAGGGCCCTGGCCCTGGCATCAAGTTCTCCGCCG AGGCCCTGAGGTGCCACCTGAGAGATCACGTGAATGTGAGCATG GTGGAGGTGACCGACTTCCCTTTTAACACCTCCGAGTGGGAGGG CTACCTGCCCCAAGGAGAGCATCCGGACCAAGGCCGGCCCTTGGG
20	GCAGATGTGCCGTGGTGTCCAGCGCCGGCTCCCTGAAGAGCTCC CAGCTGGGCCGGGAGATCGATGACCACGATGCTGTGCTGAGGTT CAATGGCGCTCCTACCGCTAACTTTCAGCAGGATGTGGGCACCA AGACCACCATCCGGCTGATGAATAGCCAGCTGGTGACCACCGAG AAGCGGTTTCTGAAGGACTCCCTGTACAACGAGGGCATCCTGAT
25	CGTGTGGGACCCCTCCGTGTACCACAGCGACATCCCCAAGTGGT

5	ATCAGAACCCCGACTACAACCTTCTTCAATAATTACAAGACCTAC CGGAAGCTGCACCCCAACCAGCCCTTTTATATCCTGAAGCCCCA GATGCCTTGGGAGCTGTGGGACATCCTGCAGGAGATCTCCCCCG AGGAGATCCAGCCTAACCCCCCTAGCAGCGGCATGCTGGGCATC ATCATCATGATGACCCTGTGCGATCAGGTGGATATCTACGAGTT CCTGCCCAGCAAGCGGAAGACCGACGTGTGTTATTATTATCAGA AGTTCTTCGATTCCGCCTGCACCATGGGCGCCTATCACCTCTG CTGTACGAGAAGAATCTGGTGAAGCACCTGAACCAGGGCACCGA CGAGGACATCTATCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGCCCCGGCTTTA
10	GGACCATCCACTGCTGACTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACC CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT TGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA CTCCCCTGTCTTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT TGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
15	GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG GGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGC TGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACAC TTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCC
20	TTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG ACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCA TCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAC GTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCA
25	ACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG

5	ATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATT TAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCC CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC AACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTC CGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTT TTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATT CCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA
10	AAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAA GAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATT GCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTG TTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGAC
15	CGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGC GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTG CTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGG CGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG
20	CCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCAT ACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACA TCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCG ATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCC GAACTGTTGCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCGACGGCGAGGA
25	TCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGG TGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTG

5	GGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGA TATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCG TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTC TATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTC GAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTT CGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCG TTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTC ATGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTA TAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATA
10	AAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC ATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTA GAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATT GTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA AAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
15	AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGT CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC GGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC GCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
20	GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCG TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA AACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
25	CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGAT ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT

5	AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTC CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCT GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTTC GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
10	CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAA CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCT TCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATC TAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCAT
15	CCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCC
20	TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAG TTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAG GCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTT GTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCA
25	GAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC

5		TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAT ACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCA GCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG AAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT TTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAA AAGTGCCACCTGACGTC
10		
15	SEQ ID NO: 26 Vector de expresión B4GALT1	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGT ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCC TGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTT AAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGC CAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
20		
25		

5	GATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG TAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCGCCACCATGAGGCTGCGGGAG CCATTGCTGAGCGGCTCCGCTGCCATGCCTGGCGCTTCTCTGCA GAGGGCTTGTTAGGCTGCTGGTGGCCGTGTGCGCCCTGCACCTGG
10	GAGTGACCCTGGTGTACTACCTGGCTGGCCGGGACCTGTCCCGG CTGCCTCAGTTGGTGGGCGTGTCCACCCCTCTGCAGGGCGGAAG CAATAGCGCCGCTGCCATCGGCCAGTCCTCCGGAGAGCTGCGGA CCGGAGGCGCTAGGCCACCTCCACCTCTGGGCGCTTCTCTCCAG CCTCGGCCTGGAGGAGATAGCAGCCCCGTGGTGGATAGCGGCCC TGGCCCAGCTTCTAACCTGACCAGCGTGCCTGTGCCCCACACCA CCGCCCTGAGCCTGCCTGCTTGCCCCGAGGAGTCCCCCCTGCTG GTGGGACCAATGCTGATCGAGTTCAATATGCCTGTGGATCTGGA GCTGGTGGCCAAGCAGAATCCCAATGTGAAGATGGGCGGCCGGT
15	ACGCTCCCCGGGATTGTGTGTCCCCTCACAAGGTGGCTATCATC ATCCCTTTCCGGAACCGGCAGGAGCACCTGAAGTACTGGCTGTA TTACCTGCACCCCGTGCTGCAGAGGCAGCAGCTGGACTATGGCA TCTACGTGATCAATCAGGCTGGCGACACCATCTTCAATCGGGCT AAGCTGCTGAACGTGGGCTTTCAGGAGGCTCTGAAGGACTACGA
20	CTACACCTGCTTTGTGTTTCAGCGATGTGGACCTGATCCCCATGA ACGACCACAACGCTTATAGGTGCTTCTCCCAGCCTAGGCACATC
25	

5	TCCGTGGCTATGGACAAGTTTGGCTTCTCCCTGCCCTACGTGCA GTATTTTGGCGGCGTGTCCGCCCTGAGCAAGCAGCAGTTTCTGA CCATCAATGGCTTTCCTAACAATTACTGGGGCTGGGGCGGCGAG GATGATGACATCTTCAACCGGCTGGTGTTCAGGGGCATGTCCAT CAGCAGGCCTAACGCTGTGGTGGGCCGGTGTAGGATGATCAGGC ACTCCCGGGACAAGAAGAATGAGCCCAATCCTCAGCGGTTTGAC CGGATCGCCACACCAAGGAGACCATGCTGTCCGACGGCCTGAA TTCCTGACCTACCAGGTGCTGGACGTGCAGAGGTATCCTCTGT ACACCCAGATCACCGTGGATATCGGCACCCCTTCCTGACTCGAG 10 TCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTT CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTTAATAA AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG 15 AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCT TCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCA CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCT CCTTTCGCTTTCCTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTT 20 TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGT GATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA CTCTTGT TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT 25 GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAA
---	---

5	TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAA TGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAG GCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGG TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAG CATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTC CGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCG CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGC CGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT TTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATA 10 TCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG CATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTT GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATC GGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCG CCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG 15 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACG GGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGG AAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCC TGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCT GATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCC 20 ATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTC GGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGC GCGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATG CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAATGGCCGCTTTTCTGGA 25 TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGA
---	---

5	CATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCG AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC GATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT CTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCC CAACCTGCCATCACGA
10	GATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGG AATCGTTTTTCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGG ATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCAACTTGTTTATTGCA GCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC
15	AAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCT AGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG AAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAA GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC
20	ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAA CCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA GAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACT GACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
25	ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG AACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT

5	CTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGA CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT AGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTT TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG
10	AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAAT CAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAA TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
15	TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTAT CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
20	AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAT TCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCC ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGT TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
25	CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC

5		TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATT GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCT GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGAT CTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAA GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA 10 TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC CCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
15	SEQ ID NO: 27 pcDNA2 TADA (Adalimumab), nt	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGT ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCC TGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTT AAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGC CAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC 20 CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT 25 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT

5	GATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG TAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG GGAGACCCAAGCTAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCCCGCTC AGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCACGATGT GATATCCAAATGACTCAAAGTCCAAGTAGTCTGTCCGCAAGCGT
10	CGGCGATCGCGTGACCATCACATGTAGAGCTTCTCAAGGCATCC GGAACCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTATGCCGCTTCTACCCTCCAGTCCGGCGTGCC TAGCAGATTTTCCGGCTCCGGATCTGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCTCCTCTCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGC
15	CAGCGGTACAACAGAGCCCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAA GGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA
20	GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAGGATCCACTAGTCCA GTGTGGTGGAAATTCAGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGA
25	CTGGATTTCGTGACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCA

5	GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG TCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG TGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAGCTATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT TATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTT
10	GGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGA TTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTG GCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCG CCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC TATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCA
15	CTGAACACAGACCCGCGGCCGCTCGAGGCCGCCACCATGGGTTG GAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGCGTGTCTG AAGTGCAACTAGTGGAAGTGGTGGTGGTCTCGTGCAGCCCGGA AGGTCTCTGCGGCTGTCCTGTGCTGCTTCCGGCTTCACCTTCGA CGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCTGGCAAGGGCC
20	TGGAGTGGGTCTCTGCCATCACCTGGAATTCTGGCCACATCGAC TACGCCGACTCCGTGGAAGGCAGATTTACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCG AGGATACAGCCGTGTACTACTGCGCCAAAGTGTCTTACCTGTCT ACCGCTTCTAGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC
25	CGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG

5	CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTAGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
10	CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
15	ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
20	CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAG TTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
25	CCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG

5	CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAA GAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGC GGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTTCT TCCCTTCCTTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCT CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACG GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA
10	GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAAC AACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGA TTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAA CAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA
15	GGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCC CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCC CCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC
20	TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCT GAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGG CTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTTTCGGAT CTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAA GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
25	ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATG

5	CCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTT GTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGA GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCG CAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG CTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCT TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCAACAA GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGG TCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCG
10	CGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCAGC GGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAA TATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTG GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCT ACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCG
15	CTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCA TCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTC TGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCA CGAGATTTGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTT
20	CGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCG GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATT GCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACC TCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
25	GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCG

5	GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGG AAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG GGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTC ACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
10	GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC CCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC GTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCC
15	CGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTG GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
20	GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTT TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGG AACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTA
25	AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTAC

5	CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT TCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTT TATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCAT TGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTT CATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCC
10	CCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGAT CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGA TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAC
15	GGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACC GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT GATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
20	ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATT GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC