



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 938 626**

⑮ Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2017 PCT/EP2017/060484**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2017 WO17191165**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2017 E 17724770 (7)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2022 EP 3452608**

④ Título: **Modulación del metabolismo de los lípidos para la producción de proteínas**

⑩ Prioridad:

03.05.2016 US 201662330973 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.04.2023

⑦ Titular/es:

LONZA LTD (100.0%)
Lonzastrasse
3930 Visp, CH

⑧ Inventor/es:

BUDGE, JAMES;
SMALES, CHRISTOPHER MARK;
KNIGHT, TANYA y
YOUNG, ROBERT

⑨ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 938 626 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación del metabolismo de los lípidos para la producción de proteínas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente descripción se refiere a métodos y composiciones para modular las rutas del metabolismo de los lípidos de una célula y diseñar células y líneas celulares para la producción de un producto, por ejemplo, una proteína recombinante.

ANTECEDENTES

10 Las proteínas terapéuticas recombinantes se expresan comúnmente en sistemas de expresión de células, por ejemplo, sistemas de expresión de células de mamíferos. En 2014, el número total de productos biofarmacéuticos aprobados para el mercado fue de 212, y el 56 % de los productos terapéuticos aprobados para el mercado por la FDA se producen en líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, el alto coste asociado con la producción contribuye a aumentar los costes de salud global.

15 Además, los productos biológicos de proteínas de próxima generación (NGB), como las proteínas de fusión de próxima generación, las glicoproteínas multiméricas o los anticuerpos de próxima generación, a menudo tienen una estructura compleja y/o no natural y están resultando más difíciles de expresar que moléculas tal como los anticuerpos monoclonales. Las líneas de células huésped actuales no han desarrollado rutas para la síntesis y secreción eficientes de NGB, lo que da como resultado un crecimiento significativamente reducido, baja productividad y, a menudo, productos con atributos de calidad deficientes. Por lo tanto, estos NGB se consideran difíciles de expresar, en los que la productividad y la calidad del producto no satisfacen las necesidades clínicas y de mercado.

20 En consecuencia, existe una necesidad cada vez mayor de desarrollar y producir productos bioterapéuticos recombinantes de forma rápida, eficaz y rentable manteniendo la calidad del producto final.

COMPENDIO

25 La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento de que la modulación de las rutas del metabolismo de los lípidos mediante la sobreexpresión de un componente de una o más rutas del metabolismo de los lípidos aumenta la productividad y la calidad del producto de una célula que produce un producto polipeptídico recombinante. Aquí, se demuestra que la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, mediante la modulación de una o más rutas del metabolismo de los lípidos, se puede utilizar para diseñar células y sistemas libres de células que produzcan mayores rendimientos de productos y productos con una calidad mejorada. Es importante destacar que la presente divulgación presenta la regulación global del metabolismo de los lípidos mediante el uso de reguladores globales que modulan más de un proceso o ruta asociada con el metabolismo de los lípidos, provocando así múltiples efectos posteriores para lograr una mejor producción y calidad del producto. Los métodos y composiciones descritos en este documento son particularmente útiles para mejorar la producción de productos recombinantes o productos biológicos de próxima generación (p. ej., proteínas de fusión, moléculas de anticuerpos biespecíficos o multiformato, proteínas multiméricas y proteínas glicosiladas) y para el desarrollo de sistemas más eficientes para la producción de dichos productos (p. ej., líneas celulares o sistemas libres de células).

30 La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 En un aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para producir un polipéptido recombinante en una célula de mamífero, que comprende:

40 i) introducir en la célula un primer ácido nucleico exógeno que codifica un primer modulador del metabolismo de los lípidos (LMM) que comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1) y un ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante, y

45 ii) cultivar la célula en condiciones donde se expresan el primer LMM y el polipéptido recombinante,

produciendo así el polipéptido recombinante,

en donde el polipéptido recombinante es:

45 i) un polipéptido terapéutico,

ii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o

iii) seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o factor de crecimiento, una proteína de fusión o una vacuna proteica,

en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula de ovario de hámster chino (CHO) que comprende:

5 un primer ácido nucleico que codifica un primer modulador del metabolismo de los lípidos (LMM), en donde el primer LMM comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1), y

un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante,

en donde dichos ácidos nucleicos no se encuentran naturalmente dentro de la célula,

en donde el primer ácido nucleico está integrado en el genoma cromosómico de la célula y en donde la célula expresa el LMM;

10 en donde la célula expresa el polipéptido recombinante y en donde el polipéptido recombinante es:

i) un polipéptido terapéutico humano,

ii) un anticuerpo o fragmento del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o

iii) seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o factor de crecimiento, una proteína de fusión y una vacuna proteica,

15 en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se proporciona un uso de la célula CHO de la invención en la producción de un polipéptido recombinante terapéutico de interés.

20 Además se proporciona un método para producir un polipéptido recombinante que comprende cultivar la célula de mamífero de la invención y recuperar el polipéptido recombinante producido por la célula separando el polipéptido recombinante de la célula o medio de cultivo en el que se cultivó la célula.

25 En otro aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta un método para producir un producto, por ejemplo, un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido recombinante, en un sistema libre de células que comprende: proporcionar un sistema libre de células que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos, p. ej., un sistema libre de células derivado de una célula o línea celular que comprende

30 una modificación que modula el metabolismo de los lípidos y que coloca el sistema libre de células en condiciones adecuadas para la producción del producto; produciendo así el producto, por ejemplo, polipéptido, por ejemplo, polipéptido recombinante. El sistema libre de células puede derivar de una célula o línea celular que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. El sistema libre de células puede comprender uno o más componentes, por ejemplo, un orgánulo o parte de un orgánulo, de una célula o línea celular que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. La modificación puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de lípidos (LMM) y en donde la célula o línea celular expresa un LMM, por ejemplo, un LMM seleccionado del grupo que consiste en SREBF1, SREBF2, SCD1, SCD2, SCD3, SCD4, SCD5, o

35 un fragmento funcional del mismo. El LMM puede alterar una o más características de un sistema libre de células seleccionado del grupo que consiste en: aumenta la producción, por ejemplo, el rendimiento y la tasa de producción, del producto, por ejemplo, polipéptido, por ejemplo, polipéptido recombinante (NGB) producido; y aumenta la calidad, p. ej., disminuye la agregación, disminuye la heterogeneidad de la glicosilación, disminuye la fragmentación y aumenta la proporción del producto correctamente plegado a mal plegado o desplegado, del producto.

40 Los ejemplos de productos que se pueden producir usando cualquiera de los métodos o composiciones descritos en este documento incluyen productos recombinantes o productos en los que al menos una porción o fracción es el resultado de la ingeniería genética. Los productos recombinantes descritos en este documento pueden ser útiles para fines diagnósticos o terapéuticos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, un producto comprende un polipéptido, como una molécula de anticuerpo (p. ej., una molécula de anticuerpo biespecífico o multiformato), una proteína de fusión o un conjugado de proteína; una molécula de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ADN o ARN); o una partícula encapsulada en lípidos (p. ej., un exosoma o una partícula similar a un virus). Los métodos y composiciones descritos en este documento pueden ser particularmente útiles para productos que son difíciles de producir, por ejemplo, en grandes cantidades o con calidad suficiente para uso comercial o terapéutico, como productos biológicos de próxima generación (p. ej., proteínas de fusión, anticuerpos biespecíficos o multiformato), moléculas, proteínas multiméricas y proteínas glicosiladas). En una realización no cubierta por el objeto

45 de las reivindicaciones, una célula como se describe en este documento, por ejemplo, para producir el producto, expresa el producto. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un producto descrito en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido seleccionado de la Tabla 2 o 3. En la sección titulada "Productos" se describen ejemplos adicionales de productos.

Las modificaciones descritas en el presente documento que modulan el metabolismo de los lípidos incluyen agentes o moléculas que aumentan o reducen la expresión de un modulador del metabolismo de los lípidos (LMM) o aumentan o reducen la expresión o la actividad de un componente de una ruta del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación es un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un LMM o un ácido nucleico inhibidor que inhibe o disminuye la expresión de un LMM.

5 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación aumenta la expresión de un LMM y comprende un ácido nucleico exógeno que codifica el LMM. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el método comprende formar, en la célula, un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM o un LMM exógeno. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la formación comprende la introducción

10 de un ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la formación comprende la introducción de un ácido nucleico exógeno que aumenta la expresión de un ácido nucleico endógeno que codifica un LMM. En las secciones tituladas "Modulación del metabolismo de lípidos" y "Moduladores del metabolismo de lípidos" se describen adicionalmente ejemplos de LMM adecuados para su uso en cualquiera de los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

15 De acuerdo con el método reivindicado, el ácido nucleico exógeno codifica un primer LMM que comprende SCD1, en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

20 En una realización, la célula comprende una o más modificaciones. En una realización, la célula comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez modificaciones. En algunas realizaciones, la célula comprende más de una modificación. En algunas realizaciones, la célula comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez modificaciones. En una realización, la célula comprende una o más segundas modificaciones que modulan el metabolismo de los lípidos. En una realización, la segunda modificación comprende un segundo ácido nucleico exógeno que codifica un segundo LMM, por ejemplo, un LMM diferente del LMM de la primera modificación.

25 En una realización, el segundo ácido nucleico exógeno y el primer ácido nucleico exógeno están dispuestos en la misma molécula de ácido nucleico. En una realización, el segundo ácido nucleico exógeno y el primer ácido nucleico exógeno están dispuestos en diferentes moléculas de ácido nucleico. En una realización, la segunda modificación proporciona una mayor producción o una mejor calidad del producto, en comparación con una célula que no tiene la segunda modificación. En una realización, el método comprende formar, en la célula, un segundo ácido nucleico exógeno que codifica un segundo LMM o un segundo LMM exógeno. En una realización, la formación comprende introducir el segundo ácido nucleico exógeno que codifica un segundo LMM. En una realización, la formación comprende la introducción del segundo ácido nucleico exógeno que aumenta la expresión de un ácido nucleico endógeno que codifica un LMM.

30 La modulación del metabolismo de los lípidos mediante cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento puede comprender o dar como resultado la alteración, por ejemplo, el aumento o la disminución, de uno o más de los siguientes:

- 35 i) la expresión (p. ej., transcripción y/o traducción) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- 40 ii) la actividad (p. ej., actividad enzimática) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- 45 iii) la cantidad de lípidos (p. ej., fosfolípidos o colesterol) presentes en una célula;
- 50 iv) la cantidad de balsas lipídicas o la tasa de formación de balsas lipídicas;
- v) la fluidez, permeabilidad y/o espesor de una membrana celular (p. ej., una membrana plasmática, una membrana de vesícula o una membrana de orgánulo);
- 55 vi) la conversión de lípidos saturados en lípidos insaturados o conversión de lípidos insaturados en lípidos saturados;
- 60 vii) la cantidad de lípidos saturados o lípidos insaturados, por ejemplo, lípidos monoinsaturados;
- 65 viii) la composición de lípidos en la célula para lograr una composición favorable que aumente la actividad del ER;
- 70 ix) la expansión del ER (p. ej., el tamaño del ER, la superficie de la membrana del ER o las cantidades de proteínas y lípidos que constituyen y/o residen dentro del ER);
- 75 x) la expansión del Golgi (p. ej., el número y tamaño del Golgi, la superficie del Golgi o el número o cantidades de proteínas y moléculas que residen dentro del Golgi);
- 80 xi) la cantidad de vesículas secretoras o la formación de vesículas secretoras;
- 85 xii) la cantidad o tasa de secreción del producto;
- 90 xiii) la capacidad de proliferación, por ejemplo, la tasa de proliferación;

- xiv) viabilidad del cultivo o supervivencia celular;
- xv) activación de receptores de membrana;
- xvi) la respuesta de proteína desplegada (UPR);
- xvii) el rendimiento o tasa de producción del producto;
- 5 xviii) la calidad del producto (p. ej., agregación, heterogeneidad de glicosilación, fragmentación, plegamiento o ensamblaje adecuados, modificación posttraduccional o codificación de enlaces disulfuro); y/o
- xix) crecimiento/proliferación celular o tasa de crecimiento específica de células.

El aumento o disminución de cualquiera de las características antes mencionadas de la célula se puede determinar por comparación con una célula que no tenga una modificación.

- 10 Los métodos y composiciones descritos aquí dan como resultado una mayor producción del producto en comparación con una célula que no tiene la modificación. Un aumento en la producción se puede caracterizar por mayores cantidades, rendimientos o cantidades de producto producido por la célula y/o mayor tasa de producción, donde la tasa de producción es equivalente a la cantidad de producto a lo largo del tiempo. En una realización, la producción del polipéptido recombinante aumenta dos veces en comparación con la producción de una célula sin modulación del 15 metabolismo de los lípidos.

- 20 Los métodos y composiciones descritos en el presente documento también pueden dar como resultado una calidad mejorada del producto (es decir, calidad del producto) en comparación con una célula que no tiene la modificación. Las mejoras en la calidad del producto (es decir, la calidad del producto) se pueden caracterizar por uno o más de: 25 agregación (p. ej., una disminución en los agregados o agregación); plegado o ensamblaje adecuado (p. ej., una disminución de productos mal plegados o desplegados, o productos parcialmente ensamblados o desensamblados); modificación posterior a la traducción (p. ej., aumento o disminución en la heterogeneidad de la glicosilación, mayor porcentaje de modificaciones posteriores a la traducción deseadas o predeterminadas); fragmentación (p. ej., una disminución en la fragmentación); codificación de enlaces disulfuro (p. ej., una disminución de isoformas o estructuras no deseadas debido a la codificación de enlaces disulfuro). En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la calidad del producto, por ejemplo, polipéptido recombinante, aumenta, por ejemplo, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 85 % o 100 %, p. célula sin modulación del metabolismo lipídico; o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, por ejemplo, en comparación con la calidad del producto producido por una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos.

- 30 En realizaciones, el método para producir un producto como se describe en este documento puede comprender uno o más etapas adicionales, que incluyen, pero no se limitan a: introducir una modificación en la célula que mejora la capacidad de procesamiento de ER (expansión de ER) o secreción; obtener el producto de la célula, o de un descendiente de la célula, o del medio acondicionado por la célula, o de un descendiente de la célula; separar el producto de al menos un componente celular o medio; y/o analizar el producto, por ejemplo, para actividad o para la 35 presencia de una fracción estructural. En una realización, el método comprende además una etapa para mejorar la capacidad de procesamiento de ER (o expansión de ER) mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica PDI, BiP, ERO o XBP1. En una realización, el método comprende además una etapa adicional para mejorar la capacidad secretora o la tasa de secreción mediante la modulación de la maquinaria SNARE u otra maquinaria implicada en la ruta secretora, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica un componente 40 SNARE.

Modulación del metabolismo de los lípidos

- 45 La presente descripción presenta métodos y composiciones para modular el metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación da como resultado la modulación, por ejemplo, el aumento de una o más rutas del metabolismo de los lípidos, que incluyen, pero no se limitan a: lipogénesis de novo, reesterificación de ácidos grasos, saturación o desaturación de ácidos grasos, elongación de ácidos grasos y biosíntesis de fosfolípidos.

- 50 De acuerdo con la invención, el primer LMM comprende SCD1, en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Las modificaciones descritas en este documento son adecuadas para modular metabolismo de lípidos incluyen la introducción de un ácido nucleico exógeno que aumenta o disminuye la expresión o actividad de un componente de una ruta de metabolismo de lípidos o un LMM, un polipéptido LMM u otra molécula que aumenta o disminuye la expresión o actividad de un componente de la ruta del metabolismo de lípidos. La presente descripción presenta el uso de moduladores del metabolismo de los lípidos para modular el metabolismo de los lípidos, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la expresión o la actividad de un componente asociado con el metabolismo de los lípidos.

- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado la regulación global del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la expresión o actividad de un regulador global. Dichos reguladores globales son moléculas que están suficientemente corriente arriba en una o más rutas, de modo que pueden influir en múltiples efectos corriente abajo, 5 por ejemplo, aumentando la expresión o la actividad de más de uno, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más componentes de diferentes procesos o rutas del metabolismo de los lípidos. Un componente de un proceso o ruta del metabolismo de los lípidos puede incluir, pero no se limita a, una enzima, un cofactor u otra molécula que esté implicada en la síntesis, degradación, elongación o conformación estructural de las moléculas de lípidos.
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el regulador global descrito en el presente 10 documento es un factor de transcripción que aumenta, por ejemplo, aumenta la expresión de un componente del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, un producto del gen del metabolismo de los lípidos seleccionado de la Tabla 1. A modo de ejemplo, un regulador global aumenta la expresión de dos o más productos génicos asociados a lípidos, por ejemplo, una enzima implicada en la biosíntesis de lípidos y una enzima implicada en el nivel de saturación de una molécula lipídica.
- 15 En cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, el LMM comprende cualquiera de los siguientes: un regulador global del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, un factor de transcripción que sobreregula los genes del metabolismo de los lípidos, o un componente (p. ej., una enzima, un cofactor o un molécula) que juega un papel en la lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación o desaturación de ácidos grasos, elongación de ácidos grasos o rutas de biosíntesis de fosfolípidos.
- 20 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el modulador del metabolismo de los lípidos comprende un regulador de la transcripción, por ejemplo, un factor de transcripción, que media, por ejemplo, sobreregula la expresión de un producto genético del metabolismo de los lípidos. Los ejemplos de productos génicos del metabolismo de los lípidos incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en la Tabla 1. un regulador global del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, un factor de transcripción que sobreregula los genes del metabolismo de los 25 lípidos.
- En una realización del método reivindicado, la célula comprende además un segundo ácido nucleico exógeno que codifica un segundo LMM que comprende SREBF1 (factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esterolos), y en la etapa (ii) la célula se cultiva en condiciones donde el segundo LMM es expresado, 30 en donde el segundo LMM comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SREBF 1 correspondiente a SEQ ID NO: 1 o 34.
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende cualquiera de los componentes proporcionados en la Tabla 1 o un fragmento funcional del mismo. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los componentes proporcionados en la Tabla 1 o un fragmento funcional del mismo; o 35 difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los componentes provistos en la Tabla 1 o un fragmento funcional del mismo. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de lípidos comprende al menos 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de 40 ácido nucleico que codifica cualquiera de los componentes proporcionados en la Tabla 1 o un fragmento funcional de los mismos.
- En una realización, la modificación comprende un elemento regulador *cis* o *trans* que aumenta la expresión del ácido nucleico que codifica el producto del gen del metabolismo de los lípidos. En una realización, el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de los lípidos comprende un plásmido o un vector. 45
- En una realización, el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de los lípidos se introduce en la célula mediante transfección (p. ej., electroporación), transducción o cualquier otro método de administración descrito en el presente documento.
- En una realización, el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de los lípidos se integra en el genoma cromosómico de la célula. En una realización, el LMM se expresa de forma estable. 50
- En una realización, el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de los lípidos no está integrado en el genoma cromosómico de la célula. En una realización, el LMM se expresa de forma transitoria.

Productos

- Los productos descritos en este documento incluyen polipéptidos, por ejemplo, proteínas recombinantes; moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas de ADN o ARN; proteínas o complejos multiméricos; partículas encapsuladas en lípidos, por ejemplo, partículas similares a virus, vesículas o exosomas; u otras moléculas, por ejemplo, lípidos. Por ejemplo, el polipéptido recombinante puede ser una proteína difícil de expresar o una proteína 55

que tiene estructuras complejas y/o no naturales, como un biológico de próxima generación, por ejemplo, una molécula de anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión o una proteína glicosilada.

De acuerdo con el método reivindicado, el polipéptido recombinante es: un polipéptido terapéutico, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o un factor de crecimiento, una proteína de fusión o una vacuna proteica.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método para producir un producto comprende además introducir en la célula un ácido nucleico exógeno que codifica el producto, por ejemplo, un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido recombinante.

10 En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante se introduce después de proporcionar una célula que comprende el LMM. En otra realización, el ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante se introduce después de cultivar la célula, por ejemplo, en condiciones adecuadas para la modulación del metabolismo de los lípidos mediante la modificación.

15 En una realización, el polipéptido recombinante que codifica el ácido nucleico exógeno se introduce antes de proporcionar una célula que comprende el LMM. En otra realización, el ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante se introduce antes del cultivo de la célula, por ejemplo, en condiciones adecuadas para la modulación del metabolismo de los lípidos mediante la modificación.

20 En una realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífica, p. ej., un BiTE (participante de células T biespecíficas), un DART (reorientación de doble afinidad o célula T redirigida).

25 En algunas realizaciones, la célula expresa de forma estable el producto. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica el producto, por ejemplo, el polipéptido recombinante, se integra en el genoma cromosómico de la célula. Alternativamente, el producto es expresado transitoriamente por la célula. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica el producto, por ejemplo, el polipéptido recombinante, no está integrado en el genoma cromosómico de la célula.

Células huésped

La invención proporciona una célula de ovario de hámster chino (CHO) que comprende:

un primer ácido nucleico que codifica un primer modulador del metabolismo de los lípidos (LMM), en donde el primer LMM comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1), y

30 un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante,

en donde dichos ácidos nucleicos no se encuentran naturalmente dentro de la célula,

en donde el primer ácido nucleico se integra en el genoma cromosómico de la célula y en donde

la célula expresa el LMM;

en donde la célula expresa el polipéptido recombinante y en donde el polipéptido recombinante es:

35 i) un polipéptido terapéutico humano,

ii) un anticuerpo o fragmento del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o

iii) seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o factor de crecimiento, una proteína de fusión y una vacuna proteica,

40 en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se describen en el presente documento, pero fuera del objeto de las reivindicaciones, las células para producir los productos descritos en el presente documento y los métodos de ingeniería de tales células.

En cualquiera de las composiciones, preparaciones o métodos descritos en el presente documento, la célula es una célula de mamífero. En una realización, la célula es una célula de roedor. En una realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Los ejemplos de células CHO incluyen, pero no se limitan a, CHO-K1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, Exceed (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN, o una célula derivada de CHO.

En cualquiera de las composiciones, preparaciones o métodos descritos en este documento, la célula se selecciona del grupo que consiste en HeLa, HEK293, H9, HepG2, MCF7, Jurkat, NIH3T3, PC12, PER.C6, BHK, VERO, SP2/0,

NS0, YB2/0, EB66, C127, células L, COS, p. ej., COS1 y COS7, QC1-3, CHO-K1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, Exceed (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11 y CHOZN.

En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta un método de ingeniería de una célula que tiene una capacidad de producción aumentada y/o una calidad de producción mejorada (p. ej., que produce un producto con una o más calidad de producto mejorada) que comprende introducir en la célula o formar en la célula un ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos, diseñando así una célula que tiene una capacidad de producción aumentada y/o una calidad de producción mejorada. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos se introduce en la célula mediante transfección, transducción, por ejemplo, transducción viral, electroporación, nucleofección o lipofección. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos se integra en el genoma cromosómico de la célula. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el método comprende además introducir en la célula un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido recombinante. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido recombinante se introduce antes de introducir el ácido nucleico exógeno que codifica el LMM. En una realización, el ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido recombinante se introduce después de introducir el ácido nucleico exógeno que codifica el LMM.

En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta una célula CHO modificada para expresar un LMM, en donde el LMM modula una o más características de la célula CHO, en donde la célula CHO modificada se selecciona en función de la modulación de una o más características seleccionadas del grupo que consiste en

- i) la expresión (p. ej., transcripción y/o traducción) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- ii) la actividad (p. ej., actividad enzimática) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- iii) la cantidad de lípidos (p. ej., fosfolípidos o colesterol) presentes en una célula;
- iv) la cantidad de balsas lipídicas o la tasa de formación de balsas lipídicas;
- v) la fluidez, permeabilidad y/o espesor de una membrana celular (p. ej., una membrana plasmática, una membrana de vesícula o una membrana de orgánulo);
- vi) la conversión de lípidos saturados en lípidos insaturados o conversión de lípidos insaturados en lípidos saturados;
- vii) la cantidad de lípidos saturados o lípidos insaturados, por ejemplo, lípidos monoinsaturados;
- viii) la composición de lípidos en la célula para lograr una composición favorable que aumente la actividad del ER;
- ix) la expansión del ER (p. ej., el tamaño del ER, la superficie de la membrana del ER o las cantidades de proteínas y lípidos que constituyen y/o residen dentro del ER);
- x) la expansión del Golgi (p. ej., el número y tamaño del Golgi, la superficie del Golgi o el número o cantidades de proteínas y moléculas que residen dentro del Golgi);
- xi) la cantidad de vesículas secretoras o la formación de vesículas secretoras;
- xii) la cantidad o tasa de secreción del producto;
- xiii) la capacidad de proliferación, por ejemplo, la tasa de proliferación;
- xiv) viabilidad del cultivo o supervivencia celular;
- xv) activación de receptores de membrana;
- xvi) la respuesta de proteína desplegada (UPR);
- xvii) el rendimiento o tasa de producción del producto;
- xviii) la calidad del producto (p. ej., agregación, heterogeneidad de glicosilación, fragmentación, plegamiento o ensamblaje adecuados, modificación postraduccional o codificación de enlaces disulfuro); y/o
- xix) crecimiento/proliferación celular o tasa de crecimiento específica de células.

45 En cualquiera de los métodos o células, por ejemplo, células diseñadas, descritos en el presente documento, la célula expresa o comprende el LMM que se selecciona de un grupo que consiste en SREBF1, SREBF2, SCD1, SCD2, SCD3, SCD4 y SCD5, o un fragmento funcional del mismo.

En cualquiera de los métodos o células, por ejemplo, células modificadas, descritos en este documento, la célula expresa o comprende un producto, por ejemplo, un producto recombinante, por ejemplo, un biológico de próxima generación seleccionado de un grupo que consiste en un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión, o una proteína glicosilada.

- 5 En cualquiera de los métodos o células, p. ej., células modificadas descritas en el presente documento, la célula es una célula CHO seleccionada del grupo que consiste en CHO-K1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, Exceed (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN o una célula derivada de CHO.

Composiciones y Preparaciones

- 10 En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción también presenta una preparación de un producto descrito en este documento hecho por un método descrito en este documento. Al menos el 70, 80, 90, 95, 98 o 99 %, en peso o en número, de los productos en la preparación podrán estar debidamente doblados o ensamblados. Se puede agregar menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación. Menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación pueden ser fragmentos del producto.
- 15 En algunas realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta una preparación de un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de la Tabla 2 o la Tabla 3, elaborado mediante un método descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula utilizada en el método es una célula CHO seleccionada del grupo que consiste en CHOK1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV, CHO GS knockout, CHOK1SV GS-KO, CHOS, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN o célula derivada de CHO.
- 20 En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta una mezcla que comprende una célula descrita en el presente documento, por ejemplo, una célula que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos y un producto producido por la célula. La mezcla puede comprender el producto en una concentración más alta, por ejemplo, al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 % o 30% de concentración más alta, por peso o número, de producto que la que se vería sin la modificación. Al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, en peso o en número, de los productos de la mezcla pueden estar debidamente doblados o ensamblados. Se puede agregar menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la mezcla. Menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la mezcla pueden ser fragmentos del producto. El producto puede ser un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido recombinante de la Tabla 2 o la Tabla 3.
- 25 En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta una preparación de medio condicionado por el cultivo de una célula descrita en el presente documento, en donde la célula comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. El producto puede estar presente en la preparación a una concentración más alta, por ejemplo, al menos, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 % o 30 % de concentración más alta, en peso o número, de lo que se vería sin la modificación. Al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, en peso o número, del producto en la preparación puede estar debidamente doblado o ensamblado. Se puede agregar menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación. Menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación pueden ser fragmentos del producto. El producto puede ser un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido recombinante de la Tabla 2 o la Tabla 3.
- 30 En un aspecto no cubierto por el objeto de las reivindicaciones, la presente descripción presenta una preparación de medio condicionado por el cultivo de una célula descrita en el presente documento, en donde la célula comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. El producto puede estar presente en la preparación a una concentración más alta, por ejemplo, al menos, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 % o 30 % de concentración más alta, en peso o número, de lo que se vería sin la modificación. Al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, en peso o número, del producto en la preparación puede estar debidamente doblado o ensamblado. Se puede agregar menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación. Menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, en peso o número, de los productos en la preparación pueden ser fragmentos del producto. El producto puede ser un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido recombinante de la Tabla 2 o la Tabla 3.
- 35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos. Los títulos, subtítulos o elementos numerados o con letras, por ejemplo, (a), (b), (i), etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura. El uso de encabezados o elementos numerados o con letras en este documento no requiere que las etapas o elementos se realicen en orden alfabético o que las etapas o elementos sean necesariamente independientes entre sí. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones.
- 40
- 45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1 es una serie de imágenes inmunofluorescentes obtenidas de grupos de células manipuladas con Flp-In CHO, transfectadas por separado con un vector de expresión de control (Ctrl) o con los que codifican SCD1 fusionados en su terminal C con una etiqueta de epítopo V5 (SCD1-V5) o SREBF1 fusionado en su terminal C con una etiqueta de epítopo V5 (SREBF1-V5). Se tomaron imágenes de los grupos con un anticuerpo primario anti-V5 y un anticuerpo secundario FITC anti-ratón (imágenes del medio), así como DAPI (imágenes de la izquierda) y se muestra una superposición de las imágenes de la izquierda y del medio (columna de la derecha). Las imágenes se generaron utilizando un microscopio confocal Leica.
- 50
- 55 La Figura 2 muestra una serie de imágenes inmunofluorescentes obtenidas de grupos de células con eliminación de glutamina sintetasa out (GS-KO) de CHOK1SV, transfectadas con un vector de expresión de control (Ctrl) o con los que codifican SCD1-V5 o SREBF1-V5. Se tomaron imágenes de los grupos con un anticuerpo TRITC primario anti-V5 y secundario anti-ratón (imágenes del medio), así como DAPI (imágenes de la izquierda) y también se muestra una

superposición de las imágenes de la izquierda y del medio (columna de la derecha). Las imágenes se generaron utilizando un microscopio confocal Leica.

Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran la determinación de SCD1-V5 y SREBF1-V5 exógenos expresados en grupos de células CHO Flp-In™ después de la transfección transitoria con un plásmido que codifica una proteína de fusión Fc recombinante difícil de expresar (también conocida como proteína de fusión Fc o FP) (Fig. 3A) o eGFP (Fig. 3B). La Figura 3C muestra la determinación de SCD1 y SREBF1 etiquetados con V5 exógenos expresado en grupos de células CHO Flp-In™ de expresión estable no transfectadas. El análisis de transferencia Western se realizó en lisados celulares obtenidos 96 horas después de la electroporación con la proteína de fusión Fc, así como en el grupo de células que expresan únicamente el modulador del metabolismo de lípidos (LMM) marcado con V5 indicado, SCD1 o SREBF1. El anticuerpo primario anti-V5 y el anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-ratón se usaron para detectar la expresión del LMM marcado con V5 y anti-β-actina o anti-L7a (como se indica), seguido de exposición con anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-ratón y anti-conejo respectivamente, se usaron anticuerpos secundarios como controles de carga para la detección de LMM.

La Figura 4 muestra la concentración de células viables, según se determinó usando un contador de células ViCell, de los grupos de células CHO Flp-In diseñadas para sobreexpresar de manera estable LMM SCD1-V5 y SREBF1-V5 después de la transfección con el constructo JB3.3 que contiene eGFP (n= 2).

Las Figuras 5A y 5B muestran la concentración del cultivo celular y la viabilidad del cultivo a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección del control, SCD1-V5, SREBF1-V5 y SREBF410-V5 que sobreexpresan grupos de células CHOK1SV GS-KO con un plásmido que contiene eGFP. La Figura 5A muestra la concentración de células. Las columnas inferiores representan la concentración de células viables, mientras que la columna completa representa la concentración total de células; las barras de error inferiores representan la desviación estándar de las células viables, mientras que las barras de error superiores representan la concentración total de células. La Figura 5B muestra la viabilidad del cultivo en función de los datos descritos en la Figura 5A. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba T de dos colas en comparación con los valores de control de los puntos de tiempo particulares: *Importancia de la concentración de células viables utilizando la prueba T de dos colas [p<0.05]. +Importancia de la concentración celular total utilizando pruebas T de dos colas [p<0.05] (n=3).

Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran datos generados por citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences). Los valores de la mediana (Fig. 6A), la media geométrica (Fig. 6B) y la media aritmética (Fig. 6C) se adquirieron a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección con un plásmido que contenía eGFP donde se tomaron muestras del control, SCD1-V5 o SREBF1-V5 que sobreexpresan grupos de células Flp-In CHO (n=2).

Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran datos generados por citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences). Los valores de la mediana (Fig. 7A), la media geométrica (Fig. 7B) se adquirieron a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección con un plásmido que contenía eGFP donde se tomaron muestras del control, SCD1-V5, SREBF1-V5 o SREBF410-V5 que sobreexpresan células derivadas de CHOK1SV GS-KO. La Figura 7C muestra la fluorescencia total por ml de cultivo calculada multiplicando la fluorescencia media aritmética medida por la concentración celular total ($\times 10^6$ /ml). Las barras de error indican la desviación estándar. La significación estadística se calculó usando una prueba T de dos colas en comparación con los valores de control de los puntos de tiempo particulares (n = 3). *Indica valores estadísticamente significativos [p<0.05]. Los datos se generaron utilizando FACSCalibur (BD Biosciences).

Las Figuras 8A y 8B muestran la producción de anticuerpo A en células CHO Flp-In que sobreexpresan de forma estable SCD1-V5 y SREBF1-V5 después de la transfección transitoria de un constructo de ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo A. La Fig. 8A es una transferencia Western que muestra las bandas correspondientes al anticuerpo A, detectadas usando un anticuerpo primario anti-cadena pesada y un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo. La Fig. 8B muestra el cambio promedio en la producción de anticuerpos en los grupos de células modificadas por ingeniería genética de LMM en comparación con los valores generados a partir del grupo de células de control determinado por HPLC de proteína A.

Las Figuras 9A y 9B muestran la producción de una proteína de fusión Fc en grupos de células CHO Flp-In que sobreexpresan de manera estable SCD1-V5 y SREBF1-V5 después de la transfección transitoria de un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. La Fig. 9A es una transferencia Western que muestra las bandas representativas de la proteína de fusión Fc detectada usando un anticuerpo primario anti-cadena pesada y un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo. La Fig. 9B muestra el cambio promedio en la producción de proteína de fusión Fc en los grupos de células modificadas por ingeniería genética LMM en comparación con los valores generados a partir del grupo de células de control determinado por HPLC de proteína A.

Las Figuras 10A y 10B muestran la producción de un anticuerpo A bien expresado en grupos de células CHO GS KO que sobreexpresan de manera estable SCD1-V5, SREBF1-V5 y SREBF410-V5 después de la transfección transitoria de un constructo de ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo A en 48, 72 y 96 h después de la transfección y en un control, grupo de células Null CHOK1SV GS-KO (un grupo de células de control generado utilizando un plásmido vacío para expresar únicamente el gen GS de selección, sin agentes LMM). La Fig. 10A es una transferencia Western que muestra las bandas representativas del anticuerpo A detectadas usando un anticuerpo

primario anti-cadena pesada y un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo. La Fig. 10B muestra el cambio promedio en la producción de anticuerpos en los grupos de células modificadas por ingeniería genética de LMM en comparación con los valores generados en el grupo de células de control según lo determinado por HPLC de proteína A.

- 5 Las Figuras 11A y 11B muestran la producción relativa de una proteína de fusión Fc difícil de expresar en grupos de células CHOK1SV GS-KO que sobreexpresan de manera estable SCD1-V5 y SREBF1-V5 o en un grupo de células de control después de la transfección transitoria de un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión Fc. La Fig. 11A muestra una transferencia Western de la proteína de fusión producida transitoriamente, detectada usando un anticuerpo primario anti-cadena pesada seguido de exposición con un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo. La Fig. 11B muestra el cambio promedio en la producción de proteína de fusión Fc en el grupo de células modificadas por ingeniería genética LMM en comparación con los grupos de células de control según lo determinado por HPLC de proteína A.

10 Las Figuras 12A y 12B muestran el análisis de la producción de anticuerpo A a partir del sobrenadante recolectado después de 48 y 72 horas de una línea de células CHO que expresaba de manera estable el anticuerpo A que se 15 transfeció transitoriamente con constructos de plásmido que contenían genes de control (vacío), SCD1-V5, SREBF1-V5 o SREBF410-V5. La Fig. 12A muestra una transferencia Western de los sobrenadantes de las células; el anticuerpo A se detectó mediante el uso de un anticuerpo primario anti-cadena pesada seguido de la exposición con un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo. La Figura 12B muestra el análisis de Coomassie en el que las bandas muestran los niveles relativos de anticuerpo A presentes en el sobrenadante 168 horas después de la transfección.

- 20 Las Figuras 13 muestra el análisis de la producción de anticuerpo A a partir del sobrenadante recogido después de 48, 72, 96 y 144 horas de una línea de células CHO que expresaba de forma estable el anticuerpo A que se había 25 transfecido transitoriamente con constructos de plásmido que contenían genes de control (vacío), SCD1-V5, SREBF1-V5 o SREBF410-V5 en los que se utilizó el análisis de octetos de proteína A para determinar la concentración volumétrica de anticuerpos (n=2).

- 25 Las Figura 14 muestra el análisis de una proteína de fusión FC de muestras de sobrenadante recolectadas después de 48, 72, 96 y 144 horas de una línea de células CHO que expresaba de manera estable el anticuerpo A que había sido 30 transfecido transitoriamente con constructos de plásmido que contenían genes de control (vacío), SCD1-V5, SREBF1-V5 o SREBF410-V5 en los que se usaron mediciones del número de células viables y del título de proteína A para determinar la productividad específica de la proteína de fusión FC. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3).

35 Las Figuras 15A y 15B muestran el análisis de la producción de anticuerpo A a partir de muestras de sobrenadante recolectadas después de 48, 72, 96 y 144 horas de grupos de células CHO integradas de forma estable con vectores que contienen control, SCD1-V5 o SREBF1-V5 y posteriormente integradas de forma estable con un constructo de anticuerpo A. La Figura 15A muestra la concentración volumétrica de anticuerpos mientras que la Figura 15B muestra la productividad específica del anticuerpo A. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3).

- 40 Las Figuras 16A y 16B muestran el análisis de la producción de proteína de fusión FC a partir de muestras de sobrenadante recolectadas después de 48, 72, 96 y 144 horas de grupos de células CHO integradas de forma estable con vectores de control, SCD1-V5, SREBF1-V5 o SREBF410-V5 y, posteriormente, de forma estable integrado con un constructo de proteína de fusión FC. La Figura 16A muestra la concentración volumétrica de proteína de fusión FC 45 mientras que la Figura 16B muestra la productividad específica de la proteína de fusión FC. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3).

- 45 La Figura 17A muestra el análisis Western de la expresión de inmunocitoquinas de células CHO GSKO después de la transfección transitoria de un constructo de ácido nucleico que codifica genes apropiados para la expresión de inmunocitoquinas y genes sin LMM (control), SCD1, SREBF1 o SREBF411 a las 48 y 96 h después de la transfección. Las muestras de sobrenadante se redujeron y las bandas presentes se detectaron utilizando un anticuerpo primario 50 anti-cadena pesada seguido de exposición a un anticuerpo secundario conjugado anti-HRP de conejo. La banda inferior representa un anticuerpo nativo de cadena pesada, mientras que la banda superior indica una molécula de cadena pesada fusionada con una citoquina. La Figura 17B muestra la abundancia relativa de inmunocitoquinas de las muestras obtenidas 96 horas después de la transfección.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

A medida que los productos biológicos actuales y de próxima generación continúan ganando utilidad terapéutica en los pacientes, la demanda de grandes cantidades de productos biológicos de próxima generación que tengan un alto grado de calidad para uso terapéutico, así como medios eficientes para la producción y el desarrollo eficiente de la producción de líneas celulares escalar. Además, muchos productos biológicos de próxima generación son difíciles de expresar y producir en líneas celulares convencionales utilizando técnicas de expresión convencionales conocidas en la técnica. Los métodos actuales no son suficientes para producir estos productos en las grandes cantidades y con el alto grado de calidad requerido para el uso clínico. Como tal, la presente descripción presenta métodos y composiciones para obtener mayores rendimientos de un producto, por ejemplo, un producto biológico de próxima

generación, con calidad mejorada en comparación con el rendimiento y la calidad obtenidos con los métodos de producción actuales. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento también son útiles para modificar células o líneas celulares con productividad, calidad del producto, robustez y/o viabilidad de cultivo mejoradas, en comparación con los sistemas de expresión celular utilizados actualmente para producir productos recombinantes.

DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología según cómo se defina, donde se proporciona una definición.

También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente.

Los artículos "un" y "uno, una" se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (*es decir*, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "una célula" puede significar una célula o más de una célula.

"Componente de una ruta de metabolismo de lípidos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula, polipéptido o enzima que, directa o indirectamente, sintetiza un lípido, degrada un lípido, convierte un lípido de una especie de lípido en otra especie de lípido o modifica un lípido. El componente puede ser un sustrato enzimático, un producto de reacción enzimática o un cofactor enzimático.

"Endógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material procedente de un organismo, célula, tejido o sistema, o producido de forma natural dentro de este.

"Exógeno", como se usa aquí, se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema. En consecuencia, "ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico que se introduce o se produce fuera de un organismo, célula, tejido o sistema. En una realización, las secuencias del ácido nucleico exógeno no se producen de forma natural, o no se pueden encontrar de forma natural, dentro del organismo, célula, tejido o sistema en donde se introduce el ácido nucleico exógeno. En las realizaciones, los productos que no se producen de forma natural o los productos que contienen porciones que no se producen de forma natural son materiales exógenos con respecto a las células huésped descritas en el presente documento.

"Formación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción en la célula, la síntesis dentro de la célula o cualquier otro proceso que dé como resultado que el ácido nucleico que codifica un LMM o un LMM exógeno se localice dentro de la célula.

"Heterólogo", como se usa aquí, se refiere a cualquier material de una especie, cuando se introduce en un organismo, célula, tejido o sistema de una especie diferente. El material heterólogo también abarca un material que incluye porciones de una o varias especies o porciones que no se producen de forma natural. A modo de ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión en donde una parte de la proteína de fusión es humana, una parte de la proteína de fusión es una bacteria y una parte de la proteína de fusión no se produce de forma natural, y el ácido nucleico se introduce para una célula humana, el ácido nucleico es un ácido nucleico heterólogo.

"Ruta del metabolismo de los lípidos", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso asociado con la síntesis de un lípido o una molécula asociada a un lípido, el alargamiento de un lípido o una molécula asociada a un lípido, la degradación de un lípido o una molécula asociada a un lípido, la incorporación de un lípido o una molécula asociada a un lípido en una membrana, el estado de saturación de un lípido o una molécula asociada a un lípido (p. ej., saturada o insaturada) o la conversión o modificación de la estructura química (p. ej., reesterificación) de un lípido o molécula asociada a lípidos. La ruta del metabolismo de los lípidos puede resultar en la síntesis de lípidos, elongación de lípidos, degradación de lípidos, cambios en la composición o fluidez de la membrana, formación o modulación de balsas de lípidos, o modificación o conversión de un lípido (p. ej., saturación o insaturación de un lípido, o reesterificación de un lípido). Los ejemplos de las rutas del metabolismo de los lípidos incluyen, pero no se limitan a: lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación de ácidos grasos, desaturación de ácidos grasos, elongación de ácidos grasos, biosíntesis de fosfolípidos y respuesta de proteínas desplegadas.

"Modulador del metabolismo de los lípidos" o "LMM", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula, producto génico, polipéptido o enzima que modula, por ejemplo, aumenta o disminuye, uno o más de los siguientes: la expresión (p. ej., transcripción o traducción) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos; la actividad (p. ej., actividad enzimática) de un componente, p. ej., producto génico, implicado en una ruta de metabolismo de lípidos; el nivel o cantidad de lípidos presentes en una célula; el nivel o la cantidad de balsas lipídicas o la tasa de formación de balsas lipídicas; la fluidez, la permeabilidad o el grosor de una membrana celular, por ejemplo, una membrana plasmática o una membrana de orgánulo; la conversión de lípidos saturados a lípidos insaturados o viceversa; el nivel o cantidad de lípidos saturados o lípidos insaturados en una célula, por ejemplo, lípidos monoinsaturados; composición lipídica para lograr una composición lipídica favorable que tenga un impacto favorable en la actividad del ER; la expansión de la sala de emergencias; la expansión del Golgi; el nivel o cantidad

de vesículas secretoras o formación de vesículas secretoras; el nivel o tasa de secreción; activación o inactivación de los receptores de membrana (p. ej., ATR (ver por ejemplo, El aumento de fosfatidilcolinas de la membrana celular que contienen residuos de ácidos grasos poliinsaturados induce la fosforilación de p53 a través de la activación de ATR. Zhang XH, Zhao C, Ma ZA. *J Cell Sci.* 2007 Dec 1;120(Pt 23):4134-43 PMID: 18032786; La ATR (quinasa relacionada con Rad3 y mutada en ataxia telangiectasia) se activa por hipotermia leve en células de mamífero y posteriormente activa p53. Roobol A, Roobol J, Carden MJ, Bastide A, Willis AE, Dunn WB, Goodacre R, Smales CM. *Biochem J.* 2011 15 de abril; 435 (2): 499-508. doi: 10.1042/BJ20101303. IDPM: 21284603) y SREPB (ver, por ejemplo, *Int J Biol Sci.* 2016 21 de marzo; 12 (5): 569-79. doi: 10.7150/ijbs. 14027. eCollection 2016. La desregulación de la ruta del receptor de lipoproteínas de baja densidad está involucrada en la lesión de órganos mediada por trastornos de lípidos. Zhang Y, Ma KL, Ruan XZ, Liu BC); y receptores adicionales, véase, por ejemplo, *Biochim Biophys Acta.* 17 de marzo de 2016. pii: S1388-1981(16)30071-3. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.019; y/o la respuesta de proteína desplegada (UPR).

De acuerdo con la invención, el primer LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

"Modificación" como se usa en el presente documento en la expresión "modificación que modula el metabolismo de los lípidos" se refiere a un agente que es capaz de efectuar un aumento o disminución en la expresión o actividad de un componente, por ejemplo, un producto génico, de una ruta del metabolismo de los lípidos descrita en el presente documento. En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, la modificación da como resultado el aumento de la expresión o la actividad de un componente de una ruta de metabolismo de lípidos, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 1- aumento de 100 veces, 20 veces, 50 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces o más en la expresión o actividad de un componente de una ruta de metabolismo de lípidos, por ejemplo, en comparación con la expresión o actividad del componente en ausencia de la modificación. En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, la modificación da como resultado la disminución de la expresión o la actividad de un componente de una ruta de metabolismo de lípidos, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 1- aumento de 100 veces, 20 veces, 50 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces o más en la expresión o actividad de un componente de una ruta de metabolismo de lípidos, por ejemplo, en comparación con la expresión o actividad del componente en ausencia de la modificación. En algunas realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones donde la expresión o actividad de un componente de la ruta del metabolismo de los lípidos está disminuida, el componente es un regulador negativo de una ruta del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga o exógena que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación es un modulador exógeno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una molécula pequeña o un polipéptido, que se puede introducir en una célula, por ejemplo, cultivando la célula en presencia de la molécula o polipéptido, para modular el metabolismo lipídico de la célula.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico", como se usan indistintamente en este documento, se refieren a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o una combinación de un ADN o ARN de los mismos, y polímeros de los mismos, en forma de cadena simple, doble o triple. El término "ácido nucleico" incluye, pero no se limita a, un gen, ADNc o ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (p. ej., sintetizada químicamente o artificial) o recombinante. A menos que se limite específicamente, el término abarca moléculas que contienen análogos o derivados de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales o no naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes de la misma modificadas de forma conservadora (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

"Péptido", "polipéptido" y "proteína", como se usan aquí de manera intercambiable, se refieren a un compuesto compuesto por residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos, o por medios distintos a los enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se impone ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. En una realización, una proteína puede comprender más de uno, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más polipéptidos, en los que cada polipéptido está asociado a otro mediante enlaces/interacciones covalentes o no covalentes. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por medios distintos a los enlaces peptídicos. Como se usa en este documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros.

"Producto recombinante" se refiere a un producto que puede ser producido por una célula o un sistema libre de células. El producto puede ser una molécula, un ácido nucleico, un polipéptido o cualquier híbrido de los mismos. Un producto recombinante es aquel en donde al menos un componente del producto o al menos un nucleótido de una secuencia que controla la producción o expresión del producto se formó mediante ingeniería genética. La ingeniería genética, como se usa en el presente documento para generar un producto recombinante o un constructo que codifica un producto recombinante, abarca técnicas de expresión de ADN recombinante conocidas en la técnica (p. ej., como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*); mutagénesis aleatoria, de exploración o dirigida al sitio; estrategias de modificación del genoma que emplean estrategias basadas en CRISPR; y estrategias basadas en nucleasas con dedos de zinc (ZFN). A modo de ejemplo, cuando el producto recombinante es un ácido nucleico, al menos un nucleótido del ácido nucleico recombinante, o al menos un nucleótido de una secuencia que controla la producción, por ejemplo, la transcripción, del ácido nucleico recombinante se formó por ingeniería genética. En una realización, el producto recombinante es un producto natural. En una realización, el producto recombinante es un producto que no se produce de forma natural, por ejemplo, un producto sintético. En una realización, una parte del producto recombinante se produce de forma natural, mientras que otra parte del producto recombinante no se produce de forma natural. En otra realización, una primera porción del producto recombinante es una molécula natural, mientras que otra porción del producto recombinante es otra molécula natural que es diferente de la primera porción.

"Polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido que puede ser producido por una célula descrita en este documento. Un polipéptido recombinante es aquel para el que al menos un nucleótido de la secuencia que codifica el polipéptido, o al menos un nucleótido de una secuencia que controla la expresión del polipéptido, se formó mediante ingeniería genética o manipulación (de la célula o de una célula precursora). Por ejemplo, se alteró al menos un nucleótido, por ejemplo, se introdujo en la célula o es el producto de un reordenamiento modificado genéticamente. En una realización, la secuencia de un polipéptido recombinante no difiere de una isoforma natural o no natural del polipéptido o proteína. En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante difiere de la secuencia de una isoforma natural o no natural del polipéptido o proteína. En una realización, el polipéptido recombinante y la célula son de la misma especie. En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante es la misma o es sustancialmente la misma o difiere en no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de, un polipéptido codificado por el genoma endógeno de la célula. En una realización, el polipéptido recombinante y la célula son de la misma especie, por ejemplo, el polipéptido recombinante es un polipéptido humano y la célula es una célula humana. En una realización, el polipéptido recombinante y la célula son de diferentes especies, por ejemplo, el polipéptido recombinante es un polipéptido humano y la célula no es humana, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, una CHO, otra célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal, una célula fúngica, una célula viral o una célula bacteriana. En una realización, el polipéptido recombinante es exógeno a la célula, en otras palabras, la célula es de una primera especie y el polipéptido recombinante es de una segunda especie. En una realización, el polipéptido es un polipéptido sintético. En una realización, el polipéptido se deriva de una fuente no natural. En una realización, el polipéptido recombinante es un polipéptido o proteína humana que no difiere en la secuencia de aminoácidos de una isoforma natural o no natural del polipéptido o proteína humana. En una realización, el polipéptido recombinante difiere de una isoforma natural o no natural del polipéptido o proteína humana en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 residuos de aminoácidos. En una realización, el polipéptido recombinante difiere de una isoforma natural del polipéptido humano en no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, o el 15% de sus residuos de aminoácidos. En realizaciones donde una porción del polipéptido recombinante comprende una secuencia derivada de una porción de una isoforma natural o no natural de un polipéptido humano, la porción del polipéptido recombinante difiere de la porción correspondiente de la isoforma natural o no natural por no más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 residuos de aminoácidos, o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o 15% de sus residuos de aminoácidos.

"Homólogo", "identidad" o "similitud", como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (p. ej., 9 de 10) coinciden o son homólogas, las dos secuencias tienen una homología del 90%.

El término "producto biológico de próxima generación" o "NGB", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición biológica que comprende una célula o una composición producida por una célula. La composición biológica se selecciona del grupo que consiste en una composición con al menos un componente natural, una composición con al menos un componente natural y al menos un componente no natural, una composición con al menos un componente natural y al menos una estructura natural y una composición con al menos un componente natural y al menos una estructura no natural, o cualquier combinación de los mismos. Los productos biológicos de próxima generación a menudo comprenden estructuras complejas y/o no naturales. Los ejemplos de productos biológicos de próxima generación incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión, enzimas o enzimas recombinantes, proteínas o proteínas recombinantes, factores recombinantes con vidas medias prolongadas, hormonas de crecimiento con terapias de acción prolongada, glicoproteínas multiméricas, anticuerpos de próxima

generación, fragmentos de anticuerpos o proteínas similares a anticuerpos (ALP), vesículas, exosomas, liposomas, virus y partículas similares a virus, mucinas, nanopartículas, extractos de una célula y una célula que se utiliza como reactivo.

MODULACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

5 La presente descripción presenta métodos y composiciones para modular el metabolismo de los lípidos en una célula o en un sistema libre de células, por ejemplo, introduciendo una modificación en la célula o en el sistema libre de células que da como resultado la modulación del metabolismo de los lípidos. La presente descripción presenta el uso de reguladores globales que afectan múltiples aspectos de las rutas o procesos involucrados en el metabolismo de los lípidos, por ejemplo, la lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación o desaturación de ácidos 10 grasos, elongación de ácidos grasos y rutas de biosíntesis de fosfolípidos. A modo de ejemplo, el regulador global está corriente arriba en una o más rutas o procesos del metabolismo de los lípidos, de modo que el regulador global afecta a varios, por ejemplo, dos o más, procesos corriente abajo o componentes corriente abajo del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el regulador global es un factor de 15 transcripción que puede activar la expresión de más de uno, por ejemplo, dos o más, genes diana implicados en diferentes procesos o rutas de metabolismo de lípidos. En consecuencia, sin desear limitarse a ninguna teoría, el uso de un regulador global como se describe en este documento puede resultar en un mayor aumento en la capacidad de producción, robustez y supervivencia de la célula que en comparación con el uso de un efecto corriente abajo que modula solo un único objetivo u otro componente del metabolismo de los lípidos. Si bien no deseamos limitarnos a 20 ninguna teoría, se cree que una modulación global o más generalizada de múltiples rutas del metabolismo de los lípidos aumenta la capacidad de producción de una célula al afectar más procesos involucrados en la mejora de la capacidad de producción, la calidad del producto y la solidez de la célula.

Las rutas del metabolismo de los lípidos, tal como se describen en el presente documento, se refieren a procesos que 25 se relacionan con la síntesis, degradación, conversión o modificación de lípidos o moléculas asociadas a lípidos. Las moléculas lipídicas incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, fosfolípidos, sacarolípidos, esfingolípidos y esteroles lípidos, por ejemplo, colesterol y policétidos. Los ejemplos de las rutas del 30 metabolismo de los lípidos incluyen, entre otros: lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación de ácidos grasos, desaturación de ácidos grasos, elongación de ácidos grasos y biosíntesis de fosfolípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una célula que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. La modificación 35 que modula el metabolismo de los lípidos puede ser un agente que aumente o disminuya la expresión de un componente implicado en el metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modificación que modula el metabolismo de los lípidos comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un modulador del metabolismo de los lípidos (LMM). En dichas realizaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica un LMM se introduce en la célula mediante cualquiera de los métodos o técnicas de suministro de ácido 40 nucleico descritos en el presente documento, por ejemplo, transducción o transfección.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, los métodos descritos en este documento 45 proporcionan una célula que comprende una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez, modificaciones que modulan metabolismo de los lípidos. En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, donde la célula comprende dos o más modificaciones que modulan el metabolismo de los lípidos, cada modificación que modula el metabolismo de los lípidos comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, cada uno de los dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifican un LMM puede ubicarse dentro de la misma molécula de ácido nucleico, o colocarse en dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes. En dichas realizaciones en las que la célula comprende dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican LMM, los LMM son diferentes entre sí, por ejemplo, codifican una secuencia polipeptídica diferente o tienen una función diferente.

La modulación del metabolismo de los lípidos en una célula, por ejemplo, mediante la introducción y expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM descrito en el presente documento, puede alterar, por ejemplo, aumentar o disminuir, uno o más de los siguientes:

- 50 i) la expresión (p. ej., transcripción y/o traducción) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- ii) la actividad (p. ej., actividad enzimática) de un componente implicado en una ruta de metabolismo de lípidos;
- iii) la cantidad de lípidos (p. ej., fosfolípidos o colesterol) presentes en una célula;
- iv) la cantidad de balsas lipídicas o la tasa de formación de balsas lipídicas;
- 55 v) la fluidez, permeabilidad y/o espesor de una membrana celular (p. ej., una membrana plasmática, una membrana de vesícula o una membrana de orgánulo);
- vi) la conversión de lípidos saturados en lípidos insaturados o conversión de lípidos insaturados en lípidos saturados;

- vii) la cantidad de lípidos saturados o lípidos insaturados, por ejemplo, lípidos monoinsaturados;
- viii) la composición de lípidos en la célula para lograr una composición favorable que aumente la actividad del ER;
- ix) la expansión del ER (p. ej., el tamaño del ER, la superficie de la membrana del ER o las cantidades de proteínas y lípidos que constituyen y/o residen dentro del ER);
- 5 x) la expansión del Golgi (p. ej., el número y tamaño del Golgi, la superficie del Golgi o el número o cantidades de proteínas y moléculas que residen dentro del Golgi);
- xi) la cantidad de vesículas secretoras o la formación de vesículas secretoras;
- xii) la cantidad o tasa de secreción del producto;
- xiii) la capacidad de proliferación, por ejemplo, la tasa de proliferación;
- 10xiv) viabilidad del cultivo o supervivencia celular;
- xv) activación de receptores de membrana;
- xvi) la respuesta de proteína desplegada (UPR);
- xvii) el rendimiento o tasa de producción del producto;
- 15 xviii) la calidad del producto (p. ej., agregación, heterogeneidad de glicosilación, fragmentación, plegamiento o ensamblaje adecuados, modificación postraduccional o codificación de enlaces disulfuro); y/o
- xix) crecimiento/proliferación celular o tasa de crecimiento específica de células.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modulación del metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en cualquiera de las propiedades enumeradas anteriormente, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, o más, o al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, aumento de 10, 20, 50 o 100 veces o más en cualquiera de las propiedades enumeradas anteriormente en comparación con una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la modulación del metabolismo de los lípidos da como resultado una disminución de cualquiera de las propiedades enumeradas anteriormente, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, o más, o al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, disminución de 10, 20, 50 o 100 veces o más en cualquiera de las propiedades enumeradas anteriormente en comparación con una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos aumenta o disminuye la expresión o actividad de un componente implicado en una o más rutas del metabolismo de los lípidos. En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, donde la modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en la expresión, por ejemplo, transcripción o traducción, o un aumento en la actividad de un componente de una ruta del metabolismo de los lípidos, el componente es un regulador positivo de la ruta del metabolismo de los lípidos. En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, donde la modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una disminución en la expresión, por ejemplo, transcripción o traducción, o una disminución en la actividad de un componente de una ruta del metabolismo de los lípidos, el componente es un regulador negativo de la ruta del metabolismo de los lípidos. Los ensayos para cuantificar la expresión, p. ej., transcripción y/o traducción, de un gen de la ruta del metabolismo de los lípidos, son conocidos en la técnica e incluyen la cuantificación de la cantidad de ARNm que codifica el gen; o cuantificar la cantidad del producto génico o polipéptido; Ensayos basados en PCR, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real; transferencia Northern; o micromatriz. Los ensayos para cuantificar la actividad de un componente de la ruta del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una enzima de la ruta del metabolismo de los lípidos, serán específicos del componente particular de la ruta del metabolismo de los lípidos.

En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, donde la modulación del metabolismo de los lípidos de una célula da como resultado un aumento en el nivel o la cantidad de lípidos en la célula, el nivel total o la cantidad total de lípidos en la célula puede ser aumentada. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, se puede aumentar el nivel o la cantidad de una o más especies de lípidos, por ejemplo, un fosfolípido o colesterol, en la célula. Un aumento en el nivel o la cantidad de lípidos en la célula (p. ej., el total o una especie de lípido seleccionada) comprende un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, o un aumento de una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces, en el nivel o la cantidad de lípidos en la célula después de la modulación del metabolismo de los lípidos, p. células, en comparación con las células que no comprenden una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. Los ensayos para cuantificar el nivel o la cantidad de lípidos en una célula son conocidos en la técnica e incluyen ensayos enzimáticos y ensayos de oxidación y medición por espectrometría de masas de componentes lipídicos en un compartimento particular (p. ej., orgánulo) o de la célula total.

- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una mayor supervivencia celular. Por ejemplo, la supervivencia celular puede medirse determinando o cuantificando la apoptosis celular, por ejemplo, el número o la cantidad de células que han sido destruidas o han muerto. Un aumento en la supervivencia celular comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, o un aumento de una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces, en el número de células después de la modulación de metabolismo de los lípidos, por ejemplo, células vivas, en comparación con células que no comprenden una modificación que modula el metabolismo de lípidos. Alternativamente, un aumento en la supervivencia celular comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más disminución en el número de células apoptóticas después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con células sin modulación del metabolismo de los lípidos. Los métodos para detectar la supervivencia celular o la apoptosis son conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de anexina V, y se describen aquí en los Ejemplos.
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una mayor viabilidad del cultivo. Por ejemplo, la viabilidad del cultivo se puede medir determinando o cuantificando el número o la cantidad de células vivas, por ejemplo, células vivas en un cultivo o población de células, o células que tienen una característica relacionada con la viabilidad, por ejemplo, marcadores de proliferación, ADN intacto, o no muestran marcadores apoptóticos. Un aumento en la viabilidad del cultivo comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, o un aumento de una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces o más en el número de células, por ejemplo, células vivas, después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con células sin modulación del metabolismo de los lípidos. Los métodos para determinar la viabilidad del cultivo son conocidos en la técnica y se describen aquí en el Ejemplo 3. Otros métodos para evaluar la viabilidad del cultivo incluyen, pero no se limitan a, métodos de exclusión con azul de tripan seguidos de recuento usando un hemocitómetro o Vi-CELL (Beckman-Coulter). Otros métodos para determinar la biomasa viable incluyen métodos que usan impedancia o capacitancia de radiofrecuencia (p. ej., Carvell and Dowd, 2006, Cytotechnology, 50:35-48), o usando espectroscopía Raman (p. ej., Moretto et al., 2011, American Pharmaceutical Review, vol. 14).
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una mayor proliferación celular. Por ejemplo, la capacidad de una célula para proliferar puede medirse cuantificando o contando el número de células, las duplicaciones de células o la tasa de crecimiento de las células. Como alternativa, las células en proliferación pueden identificarse mediante el análisis del contenido genómico de las células (p. ej., ADN en replicación), por ejemplo, mediante análisis de citometría de flujo o la presencia de marcadores de proliferación, por ejemplo, Ki67, complejos de ciclina-CDK fosforilados implicados en el ciclo celular. Un aumento en la capacidad de proliferar comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más, o una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces, o más de aumento en el número de células, o número de células que expresan un marcador de proliferación, después de la modulación del metabolismo de los lípidos. Alternativamente, un aumento en la capacidad de proliferar comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más, o una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces o más de aumento en la velocidad de duplicación o crecimiento de las células después de la modulación del metabolismo de los lípidos. El recuento de células se puede realizar utilizando una máquina de recuento de células o mediante el uso de un hemocitómetro.
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en la capacidad de producción, por ejemplo, el monto, la cantidad o el rendimiento del producto producido, o la tasa de producción. Un aumento en el monto, cantidad o rendimiento del producto producido comprende 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más de aumento en el monto, cantidad o rendimiento del producto producido después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con el monto, cantidad o rendimiento de el producto producido por una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. Un aumento en la tasa de producción comprende 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, o más de aumento en el monto, la cantidad o el rendimiento del producto producido después de la modulación del metabolismo de los lípidos, después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con la tasa de producción de una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la tasa de producción se determina determinando el monto, la cantidad o el rendimiento del producto producido en una unidad de tiempo específica.
- En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en la calidad del producto, por ejemplo, agregación, estado de glicosilación o heterogeneidad, fragmentación, plegamiento o ensamblaje adecuados, modificación postraduccional, o codificación de enlaces disulfuro. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más de: un aumento en el monto o cantidad de producto no agregado, un aumento en la relación de producto no agregado a producto agregado, o disminución en el monto o cantidad de producto agregado, después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en 5 comparación con lo observado en una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más de: un aumento en el monto o cantidad de producto debidamente doblado o ensamblado, un aumento en la relación de producto debidamente doblado o ensamblado a mal doblado, desplegado, parcialmente ensamblado 10 o sin ensamblar producto, o disminución en el monto o cantidad de producto mal plegado, desplegado, parcialmente ensamblado o no ensamblado, después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con lo observado en una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 150 veces o más de: un aumento en el monto o cantidad de producto no fragmentado o de longitud completa, o una disminución en el monto o cantidad de producto fragmentado después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, como en comparación con lo observado en una célula sin modulación del metabolismo lipídico. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 200 veces o más de: un aumento en el monto o cantidad de producto funcional, o una disminución en el monto o cantidad de producto no funcional o disfuncional después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con la observada en una célula sin modulación del metabolismo lipídico. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más de: un aumento o disminución en la heterogeneidad de glicanos después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con la observada en una célula sin modulación del metabolismo de los lípidos. Un aumento de la calidad del producto comprende un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, o por 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más de: un aumento en el monto o cantidad de producto no funcional o disfuncional después de la modulación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en comparación con la observada en una célula sin modulación del metabolismo lipídico.

MODULADORES DEL METABOLISMO LIPÍDICO

Como se describe en el presente documento, la modulación del metabolismo de los lípidos puede lograrse expresando o introduciendo un LMM, o alterando la regulación de un LMM. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, un LMM se sobreexpresa en una célula, por ejemplo, introduciendo un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM o aumentando la expresión introduciendo elementos promotores u otros elementos transcripcionales reguladores. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la expresión o actividad de un LMM se inhibe o disminuye, por ejemplo, mediante la introducción de un inhibidor del LMM o un ácido nucleico inhibidor exógeno, por ejemplo, un agente de interferencia de ARN. Los ejemplos de ácidos nucleicos inhibidores incluyen ARN de interferencia cortos (ARNsi) y ARN de horquilla corta (ARNsh) que se dirigen al LMM, por ejemplo, el ARNm que codifica el LMM. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la actividad o expresión de un LMM aumenta o disminuye alterando las modificaciones postraduccionales u otros mecanismos reguladores endógenos que regulan la actividad o expresión de LMM. La regulación por modificaciones postraduccionales incluye, 35 pero no se limita a, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, acetilación, metilación o glicosilación que pueden aumentar o disminuir la expresión o actividad de LMM. A modo de ejemplo, la regulación de las modificaciones postraduccionales se puede lograr a través de la modulación de la enzima o molécula que modifica el LMM, o la modificación del LMM de manera que la modificación postraduccionales no pueda ocurrir o ocurra más frecuentemente o de manera constitutiva. La regulación de LMM también puede incluir la modulación de mecanismos reguladores endógenos que pueden aumentar o disminuir la expresión o actividad de LMM, por ejemplo, aumentar o disminuir uno o más de: regulación de ARNm, escisión de proteínas, expresión de isoformas específicas, empalme alternativo y degradación.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM modula, por ejemplo, aumenta o disminuye, la expresión, por ejemplo, la transcripción o la actividad de un componente de la ruta del metabolismo de los lípidos. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM modula, por ejemplo, aumenta o disminuye, la síntesis, degradación, elongación o conformación estructural (p. ej., saturación o desaturación, o esterificación) de un lípido o molécula asociada a un lípido. Los LMM ejemplares y/o los componentes de la ruta del metabolismo de los lípidos se enumeran, pero no se limitan a los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Rutas del metabolismo de los lípidos y sus componentes/productos génicos

Ruta	Componente/Producto génico
Reguladores globales del metabolismo de los lípidos	SREBF 1 (factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroles 1)
	SREBF2 (factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroles 2)
	PRMT5
Lipogénesis de novo	FAS (ácido graso sintasa)
	ACC (acetil-coA carboxilasa)
	ACL (ATP citrato liasa)
Reesterificación de ácidos grasos	DGAT (diglicérido aciltransferasa)
	GPAT (glicerol 3-fosfato aciltransferasa)
	LPL (lipoproteína lipasa)
Biosíntesis de fosfolípidos	AGPAT (1-actil-sn-glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa)
	AGNPR (acil/alquilglicerona-fosfato reductasa)
	CCT (fosfocolina citidiltransferasa)
CDS (fosfatidato citidiltransferasa)	CDS (fosfatidato citidiltransferasa)
	CEPT (diacilglicerol colina/etanolaminafosfotransferasa)
	CERT (proteína de transferencia de ceramida)
CGT (N-acilesfingosina galactosiltransferasa)	CGT (N-acilesfingosina galactosiltransferasa)
	CPT (diacilglicerol colina fosfotransferasa)
	CLS (cardiolipina sintasa)
CRD (ceramidasa)	CLS (cardiolipina sintasa)
	KDSR (3-cetoesfinganina reductasa)
	LCS (polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa)
LCS (polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa)	LCS (polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa)
	PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico)
	PEMT (fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa)
PGP (fosfatidilglicerofosfatasa)	PGP (fosfatidilglicerofosfatasa)
	PGS (CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferasa)
	PIS (CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferasa)
PSD (fosfatidilserina descarboxilasa)	PSD (fosfatidilserina descarboxilasa)
	PSS1 (fosfatidilserina sintasa 1)
	PSS2 (fosfatidilserina sintasa 2)
SGMS (ceramida colina fosfotransferasa)	SGMS (ceramida colina fosfotransferasa)
	SNAT (esfingosina N-aciltransferasa)
	SPK (esfinganina quinasa)
SPP (esfingosina-1-fosfato fosfatasa)	SPP (esfingosina-1-fosfato fosfatasa)
	SPT (serina copalmitoiltransferasa)
	SCD1 (estearoil CoA desaturasa-1)
Desaturación de ácidos grasos	SCD2 (estearoil CoA desaturasa-2)

Ruta	Componente/Producto génico
	SCD3 (estearoil CoA desaturasa-3)
	SCD4 (estearoil CoA desaturasa-4)
	SCD5 (Esteoril CoA desaturasa-5)
	PED (plasmaniletanolamina desaturasa)
Regulación del SREBF 1 y otras rutas	S1P (proteasa del sitio 1)
	S2P (proteasa del sitio 2)
	SCAP (proteína activadora de escisión de SREBF)
	INSIG1 (gen 1 inducido por insulina)
	INSIG2 (gen 2 inducido por insulina)
	HMG CoA reductasa (2-hidroxi-3-metilgulatril-CoA reductasa)
	Receptores PPAR, por ejemplo, PPAR α , PPAR γ

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos u homología con un componente, p. ej., producto génico, implicado en una ruta de metabolismo de lípidos,

5 provisto en la Tabla 1, o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un componente, p. ej., producto génico, implicado en la ruta del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, proporcionado en la Tabla 1.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de un componente implicado en la ruta del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, proporcionado en la Tabla 1. Un fragmento funcional de un LMM como se describe en el presente documento puede comprender uno o más dominios funcionales del LMM. A modo de ejemplo, un fragmento funcional de un LMM que es un factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de transactivación. A modo de ejemplo, un fragmento funcional de un LMM que es una enzima comprende un dominio con actividad enzimática. Un fragmento funcional de un LMM como se describe en este documento conserva la actividad funcional, por ejemplo, al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad funcional del LMM de longitud completa. Los fragmentos funcionales de un LMM pueden determinarse experimentalmente por un experto en la materia, o pueden predecirse utilizando algoritmos basados en la homología de secuencia de los dominios funcionales. Los LMM ejemplares se describen adicionalmente a continuación.

10 En cualquiera de las realizaciones de los métodos no cubiertos por el objeto de las reivindicaciones descritas en este documento, el LMM es un regulador transcripcional. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM es un factor de transcripción o activador transcripcional que se une al ADN o se asocia en un complejo que se une al ADN y recluta o se asocia en un complejo que recluta ARN polimerasa para transcripción de uno o más productos génicos implicados en el metabolismo de los lípidos. En una realización, el LMM se une a un elemento de unión a esterolos y/o secuencias promotoras de E-box. En una realización, el LMM comprende el factor de unión del elemento regulador de esterolos 1 (SREBF1) o el factor de unión del elemento regulador de esterolos 2 (SREBF2) o un fragmento funcional o isoforma del mismo.

15 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un activador transcripcional global o factor de transcripción. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM es capaz de modular la transcripción de dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, componentes de una ruta de metabolismo de lípidos, por ejemplo, como se proporciona en la Tabla 1. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM es capaz de modular la transcripción de uno o más, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco o más componentes de dos o más rutas de metabolismo de lípidos, por ejemplo, componentes y rutas como se proporciona en la Tabla 1.

20 El factor de unión del elemento regulador de esterolos 1 (SREBF1) es un activador transcripcional global que sobrerregula la transcripción de genes implicados en la lipogénesis, la reesterificación de ácidos grasos, la desaturación y elongación de ácidos grasos y la biosíntesis de fosfolípidos al unirse al elemento regulador de esterolos (SRE) y Secuencias promotoras E-box (Hagen, Rodriguez-Cuenca et al. 2010) presentes en las regiones promotoras de los genes diana. La transcripción del propio gen SREBF1 está regulada endógenamente por la presencia del elemento regulador de esterolos (SRE) entre otros elementos reguladores de la transcripción en la región promotora del gen. Además de esto, una multitud de mecanismos de regulación postraduccionales que incluyen fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, acetilación, modificaciones mediadas por ácidos grasos y procesamiento proteolítico crean un sistema homeostático estrechamente controlado pero adaptable fijado alrededor de SREBF1.

SREBF1 de longitud completa se sintetiza y se localiza principalmente en el retículo endoplásmico (ER). El SREBF1 integral de membrana forma un complejo con la proteína activadora de escisión de SREBF (SCAP) que puede facilitar la migración de SREBF1 al aparato de Golgi. Sin embargo, cuando hay niveles altos de esteroles (particularmente colesterol), se induce un cambio conformacional en SCAP que ayuda a unirse a la proteína integral de membrana insig (gen inducido por insulina), inhibiendo así la migración de este complejo. En ausencia de esteroles, insig no se une a SCAP, lo que permite la formación de vesículas mediada por COPII y la posterior migración del complejo SREBF: SCAP al aparato de Golgi. La escisión proteolítica secuencial se produce en el aparato de Golgi mediada por las proteínas de la proteasa del sitio 1 (S1P) y la proteasa del sitio 2 (S2P) que liberan la cremallera de leucina de hélice de bucle de hélice básica N-terminal (bHLH) de SREBF 1 que está inmediatamente presente en el citoplasma, pero migra al núcleo. Los residuos de lisina presentes en el SREBF1 escindido son ubiquitinados y degradados por el proteasoma 26S, pero esta ubiquitinación puede inhibirse mediante la acetilación de los residuos de lisina, lo que permite la migración al núcleo. Finalmente, el SREBF1 nuclear puede unirse a secuencias de elementos reguladores de esteroles (SRE) corriente arriba de una serie de genes responsables de lipogénesis *de novo* (ácido graso sintasa (FAS) y acetil coA carboxilasa (ACC)), reesterificación de ácidos grasos (diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), glicerol-3-fosfato (GPAT) y lipoproteína lipasa (LPL)), biosíntesis de fosfolípidos (CTP: fosfocolina citidiltransferasa (CCT)), desaturación de ácidos grasos (estearoil-coA desaturasa 1 (SCD1)). El SREBF1 nuclear también es capaz de activar la transcripción del propio gen SREBF 1 de longitud completa, pero esto también depende de la activación de la secuencia del promotor del receptor X del hígado (LXR) que también se encuentra corriente arriba del gen (Brown, Goldstein 1997-BROWN, MS and GOLDSTEIN, J.L., 1997. La Vía SREBP: Regulación del Metabolismo del Colesterol por Proteólisis de un Factor de Transcripción Unido a la Membrana. *Cell*, 89(3), págs. 331-340) (Hagen, Rodríguez-Cuenca- HAGEN, R.M., RODRIGUEZ-CUENCA, S. and VIDAL-PUIG, A., 2010. An allostatic control of membrana lipid composer by SREBP1. *FEBS letters*, 584(12), pp. 2689-2698).

En una realización, el LMM comprende SREBF 1, como se define en las reivindicaciones. La secuencia de aminoácidos para SREBF1 se proporciona a continuación:

MDELAFGEAALEQT LAEMCELD TAVLND IEDMLQLINNQD SDFPGLDAPYAGGETGDTGPSSPGANSPESFSSASL
 ASSLEAFLGGPKVTPAPLSPPPSAPAALKMYPVSFSPGPGIKEPVPLTILQPAAPQPSPGTLLPPSFPA PPVQL
 SPAPV LGYSSLPSGFGS GTLPGNTQQPSSLPLAPAPGVLP TPA LHTQVQSLIASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQV PV
 VLOPHFIKADSLLLTAVKT DAGATVKTAGI STLA PGTA VQAGPLQTLVSGGT I L ATVPLVVDTDKLP I HRLAAGSKA
 LGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAKAI D YIRFLQHSNQKLKQENLTLRSAH
 KSKSLKDVLVSACGSGGGT DVSMEGMKPEV VETLTPPSDAGSPS QSSPLSFGSRASSGGSDSEPDS PAFEDSQVKA
 QRLPSHSGM LDRSRLA C VLAFLCLTCNPLASLFGWGI LTPS DATGTHRSSGRSM LEAESRDGSNWTQWLLPPLVW
 LANGLLVLACALLFVYGEPVTRPHSGPAVHFWRHRKQADL D LARGDFPQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSL
 LWNLIRHLLQRLWVGRWL AGQAGGLLRDRLRKDARA SARDAAV VYHKLHQLHAMGKYTGHHLAASNL SALNIAE
 CAGDAISMATLAEIYVAALRVKTS LPRALHFLTRFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFFV DGDWAVHG
 APESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFREHLERALN CIAQPS PGADGDREFSDALGYLQI LNSCSDAAGAPACSFV S
 S SMAATTGDP DVPAKWWASLTAVVIHWR RDEEAARLYPLV EHIPQV LQDT DTERPLPRAALYSFKAAR ALLDHRKVES
 SPASLAICEKASGYL RDSL A STPTGS S IDKAMQLLCDL L VARTSLWQRQ S PASVQVAHGT SNGPQASALEL RGF
 QHDLSSLRRLAQSFRPAMRRVFLHEATRLMAGASPARTHQLLDRSLLRRRAGS S GKG GTTAELEPRPTWREHTEALL
 LASCYLPPAFLSAPGQRMSMLAEAARTVEKLGDHRLLLDCQMLLRLGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 1).

La secuencia de nucleótidos para SREBF 1 se proporciona a continuación:

atggacgagctggc ttccgtgaggccgctctggAACAGACACTggccgagatgtgcgaactggacacagccgttt
 gaacgacatcgaagacatgctccagctcatcaacaaccaagacagtactccggccctgtttgacgc cccctatg
 ctgggggtgagacaggggacacaggcccccagcagcccccaggccatctccgtggagatcttcttctgttt
 gcctccctctggAACG CTTCTGGAGGACCCAGGTgacacccctgcacccttgcaccatccggcaccgc
 tgctttaaagatgtaccctgtccgtttcccttggccctggatcaaaggaggccatccggcaccatccggc
 tcctacagccctgcagcgcacagccgtcaccgggacccctgcctccgagctcccccgcaccacccgtacagtc
 acccctgcgc cccgtctgggttaactcgagccctgcaggcttcaggccatccaggaaacactcagcagcc
 accatctagcctgcgcctggccctgcaccaggagtctgcccacccctgcacacccagg tccaaagcttgg
 cctccca gccgcctgcaggccctagaacaaacactgtgacactgcaggccatccggcaggccaccgtgaa
 gtactgcaggcatcagcaccctggctctggcacagccgtgcaggcaggccctggatggaggaa

En una realización, el segundo LMM comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SREBF1 correspondiente a SEQ ID NO: 1 o 34.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 1; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SREBF1, por ejemplo, SEQ ID NO: 1.

10 Las isoformas de SREBF1 son conocidas en la técnica, e incluyen la isoforma a y la isoforma b, así como isoformas específicas de especies o células, por ejemplo, isoformas específicas de células CHO, tales como la isoforma c. A continuación se proporciona la secuencia de aminoácidos para la isoforma a de SREBF1 (número de acceso de GenBank NP_001005291.2).

MDEPPFSEAALEQALGEPCDLDAAIILTDEGEVGAGRGRANGIDAPRAGADRGAMDCTFEDEMLQLINNQD

SDFPGFLFDPPYAGSGAGGTDPSADTSSPGSLSPPPATLSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQQPAPTPLKMP
 PSMPAFAFPGPGLKEESVPLSILQTPQPLPGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLGYPSPPGGFSTGSPGN
 TQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVPQQLLTVTAAPTAAPVTTTVTSQIQQVVPVLIQPHFIKADSL
 LLTAMKTGATVKAAGLSPIVSGTTVQGTGLPLTVSGGTILATVPLVDAEKLPIRNLAAAGSKAPASAQS
 RGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAKAIIDYIRFLQHSNQKLKQENLRLTA
 VHKSKSLKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGSGSGDSEPD
 SPVFFEDSKAKPEQRPSLHSRGMLDRSLALCTLVFLCLSCNPLASLLGARGLPSDFTSVYHSGRNVL
 GTESRDGPWAQWLLPPVWLLNGLLVLVSLVLLFVYGEPVTRPHSGPavyFWRHRKQADLDLARGDFAQ
 AAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLLWNLI RHLQLRVLWGRWLAGRAGGLQQDCALRVDASASARDAA
 LVYHKLHLQHTMGKHTGGHATATNLALSALNLAECAGDAVSVTALAEIYVAAALRVKTSPLRALHFLTRF
 FLSSARQAQCLAQSGSVPPQAMQWLCHPVGHRFFVTDGDSVLSTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLL
 ERALNCVTQPQNPSPGSAGDKEFSDALGQLQNLNSCSDAAGAPAYSFSI SSSMATTGVDPVAKWWASLT
 AVVIHWLRRDEEAAERLCP1VHELPVRLQESERPLPRAALHSFKAA RALLGCAKAESGPASLTIKEKASG
 YLQDSLATTTPASSSIDKAQVQLFLCDLLLWVRTSLWRQQQPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRLLSS
 LRLRLAQSFRPAMRRVFLHEATARIMAGASPTRTHQLLDRSLRRRAGPGKGGA VAELEPRPTRREHAEAL
 LLASCYLLPPGFLSAPQRVGMLAEEARTLEKLGDRRLLHDQCQMLMRLLGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 28)

15 A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico, o secuencia de ARNm, para la isoforma a de SREBF1 (número de acceso de GenBank NM_001005291.2).

ES 2 938 626 T3

CCGTTTCTTCTGGATGGGGACTGGTCCGTGCTCAGTACCCATGGGAGAGCCTGTACAGCTTGGCCGGG
 AACCCAGTGGACCCCTGGCCAGGTGACTCAGTATTCCGGAACATCTTAGAGCAGCACTGAAC
 GTGTGACCCAGCCAACCCAGCCCTGGGTAGCTGATGGGACAAGGAATTCTGGATGCCCTCGGGTA
 CCTGCAGCTGCTGAACAGCTGTTCTGATGCTGCAGGGCTCTGCCTACAGCTTCTCCATCAGTTCCAGC
 ATGGCCACCACCACCGCGTAGACCCGGTGGCCAAGTGGTGGCCTCTGACAGCTGTGGTATCCACT
 GGCAGCAGGGATGAGGAGGCAGCTGAGCAGCTGTGGCCTGGTGGAGCACCTGCCCGGGTGTGCA
 GGAGTCTGAGAGACCCCTGCCAGGGCAGCTCTGACTCCTCAAGGCTGCCGGGCCCTGCTGGCTGT
 GCAAGGCAGAGTCTGGTCCAGCCAGCCTGACCACCTGTGAGAAGGCCAGTGGTACCTGCAGGACAGCC
 TGGCTACCAACCCAGCCAGCAGCTCATTGACAAGGCCAGCAGCTGTTCTGTGACCTGCTTCTTGT
 GGTGCGCACAGCCTGCGCAGCAGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGCAGC
 AGAGCCCAGGCTCCGCCCTGAGCTGCGTGGCTTCAACGGGACCTGAGCAGCCTGAGGCCAGGCCAG
 AGAGCTTCCGGCCGAGCTGGAGCCGCGCCACGCGGGAGCAGCGGGAGGCCCTGCTGCTGGCTCTGCT
 ACCTGCCCGCCGCTTCTGTGCGGCCGGCAGCGCTGGCATGCTGGCTGAGGCCGCGCAGACT
 CGAGAAGCTTGGCGATGCCGGCTGTCAGCAGCTGTCAGCAGATGCTCATGCCCTGGCGGTGGACC
 ACTGTCACCTCAGCTAGACCCCGTGTCCCCGGCTCAGCACCCCTGCTCTAGCCACTTGGTCCCGTG
 CAGCTTCTGCTCTGCGTGAAGCTTGAAGGCCAGGGCAGTGAAGAGACTCTGGCCTCCACAGTCGA
 CCTGCGGCTGCTGTGCGCTCGCGGTGGAAGGCCAGGGGCCGATCTGACCCCTAAGACCGGGGCC
 ATGATGGTGTGACCTCTGGTGGCCGATGGGGCACTGCAAGGGCCAGCCATTGGGGGCCCT
 CTTGCTCTGCAAGCACCTAGTGGCTTTTCTCTGTGTCAGGGAGAGAGGGTACATTCCCTGT
 GCTGACGGAAGCCAACTTGGCTTCCCGACTGCAAGCAGGGCTCTGCCAGAGGCCCTCTCGTC
 GTGGGAGAGAGACGTGTACATAGTGTAGGTGAGCTGAGCTGCTTAGGCTCTGACCTGAGGCTCTGTGCTACT
 TTGCTTTGCAAAACTTATTATTCATAGATTGAGAAGTTGTACAGAGATAAAAATGAAATTATTTA
 TAATCTGGTTTTGTGTCTCAGTGTGGATGTGCTGACTAGTGTGAGCTTGGCCCTCCCCAGCA
 CCTAGGGAAAGGCTTCCCTCCCCCTCCGGCACAGGTACACAACCTTAACCTAGCTCTCCGATGT
 TTGTTTGTAGTGGGAGGAGTGGGGAGGGCTGGCTGTATGGCTCCAGGCTACCTGTTCCCTCTCACCTCCAG
 AGGGCACATGGTGGGCTGTGCAACCTTAGGGCTCCATGGGTCAGTGTCCCTCTCACCTCCAG
 CTCCTGCCCCATCAGGTCCCTGGGTGGCACGGAGGATGGACTGACTTCCAGGACCTGTTGTGACAGG
 AGCTACAGCTGGGTCTCCCTGCAAGAGTCTGGCACGTCTCACCTCCCCATCCGGCCCTGGTCATC
 TCACAGCAAAGAAGCCTCTCCCTCCGACCTGCGCCACACTGGAGAGGGGGCACAGGGGGGGGAGG
 TTCTGTTCTGTGAAAGCCGACTCCCTGACTCATTGATGCCCTCCCCCAGCCCTCCCTCATC
 CCATTCCCCAACCTAAAGCTGGCCGGCTCCAGCTGAATCTGGTGGAAATCCACGGCTGCAGATT
 CCAAAACAATCGTGACTTATTGACTTTTTTTCTGAATGCAATGACTGTTTTAC
 TCTTAAGGAAAATAAACATCTTTAGAAACAAAAAA (SEQ ID NO: 29)

La secuencia de aminoácidos para la isoforma b de SREBF1 (n.º de acceso de GenBank NP_004167.3) se proporciona a continuación.

MDEPPFSEAALEQALGEPCDLDAAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPPYAGSGAGGTDPAСПDTSSPG
 SLSPPPATLSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQPAрTPLKMPSPMAFSPPGPIKEESVPLSILQTPTPQPL
 PGALLPQSFPAрAPPQFSSTPVLGYPSPPGGFSTGSPPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVP
 QQLLTVTAAPTAAPVTTVTSQIQQPVVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDATVKAAGLSPVLSGTTVQTGP
 LPTLVSGGTILATVPLVDAEKLPIRNLAAAGSKAPASAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLV
 VGEAKLNKSAVLRAKAIYDYLFLQHNSQKLQENLRLTAVHKSLSKLDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTE
 VEDTLTPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGSGSDSEPDSFEDSKAKPЕQRPSLHSRGMLDRSRLAL
 CTLVFLCLSCNPLASLLGARGLPSDTSVYHSPGRNVLGTESRDGPFWAQWLLPPVWLLNGLLVLS
 LVLLFVYGEPVTRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLWN
 LIRHLLQRLWGRWLAGRAGGLQDQCALRVDASASARDAALVYHKLHQLHTMGKHTGGHTATNLALSAL
 NLAECAGDAVSATLAEIYVAAALRVKTSLPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPVAMQWLCHPVGHR
 FFVGDGSVLSLTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQPNPSPGSADGDKEFSDALGYL
 QLNNSCSDAAGPAYSFSISSMATTGVDPVAKWWASLTAVIHWLRRDEEAERLCPVЕHLPRVЛQE
 SERPLPRAALHSFAARALLGCAKAESGPASLTICEKASGYLQDSLATTПASSSIDKAVQLFLCDLLLVV
 RTSLWRQQPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRLSSLRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASP
 TRTHQLLDRSLRRRAGPGKGKGGAVAELEPRPTRREHAЕALLIASCYLPPGFLSAPGQRVGMLAEAARTLE
 KLGDRLLHDCQQLMRLGGTTVTSS (SEQ ID NO: 30)

- 5 La secuencia de ácido nucleico, o secuencia de ARNm, para la isoforma b de SREBF1 (n.º de acceso de GenBank NM_004176.4) se proporciona a continuación.

AGCAGAGCTGCGGCCGGGGAAACCCAGTTCCGAGGAACCTTCGCCGGGCCGGGCCCTTGAGGCC
 AGGGCAGGACACGAACGCCGGAGCGCGGGCGGACTGAGAGCCGGGCCGCCGCTCCCTAGGA
 AGGGCGTACGAGGCCGGGCCGCCGGCGCTCCCGAGGGCGCTGCCATGGACGAGCCACCC
 TCAGCGAGGCCGGCTTGGAGCAGGCCGTGGCGAGCCGTGCGATCTGGACGCCGCTGCTGACCGACAT
 CGAAGACATGCTTCAGCTTATCAACAACCAAGACAGTGAACCTCCCTGGCTATTGACCCACCCATGCT
 GGGAGTGGGCAGGGGGCACAGACCCGCCAGCCCCGATACCAGCTCCCAGGCAGCTGTCTCCACCTC
 CTGCCACATTGAGCTCCTCTTGAGGCCCTGCCAGGCAGGCCCTCACCCCTGTCCCC
 TCCCCAGCCTGACCCACTCCATTGAAGATGTACCGTCCATGCCGCTTCTCCCTGGCCTGGTATC
 AAGGAAGAGTCAGTGCCTACTGAGCATCTGCAAGCCCCCACCACAGGCCCTGCCAGGGGCCCTCTGC
 CACAGAGCTTCCCAGCCCCCAGCTCCAGTCCACCCCTGTGTTAGGCTACCCAGGCCCTCC
 GGGAGGCTCTACAGGAAGGCCCTCCGGAACACCCAGCAGGCCCTGCCACTGGCTTCC
 CCCAGGGCTCCCGCCCTCTCTTGACACCCAGTCCAGACTGTGCTCCCCCAGCAGCTACTGACAG
 TCACAGCTGCCCTACGGCAGCCCCCTGAACGACACTGTGACCTCGCAGATCCAGCAGGTCCCCTGC
 GCTGCAGCCCCACTTCATCAAGGCAGACTCGCTGCTCTGACAGCATGAAGACAGACGGAGCCACTGTG
 AAGGCGGCAGGTCTAGTCCCTGGTCTTGGCACCCTGTGAGACAGGGCTTGGCAGCCCTGGTGA
 GTGGCGAACATCTTGGCAACAGTCCACTGGTGTAGATGCCAGAGCTGCCATACACGGCTCGC
 AGCTGGCAGCAAGGCCCGCCTGCCAGAGCGTGGAGAGAAGCGCACAGCCCACACGCCATTGAG
 AAGCGCTACCGCTCTCCATCAATGACAAAATATTGAGCTCAAGGATCTGGTGGTGGCACTGAGCAA
 AGCTGAATAATCTGCTGCTTGCAGGCCATCGACTACATTGCTTCTGCAACACAGCAACCAGAA
 ACTCAAGCAGGAGAACCTAAGTCTGCCACTGCTGTCCACAAAGCAAATCTCTGAAGGATCTGGTGTG
 GCCTGTGGCAGTGGAGGGAACACAGACGTGCTATGGAGGGCGTGAAGACTGAGGTGGAGGACACACTGA
 CCCCACCCCTCGGATGCTGGTCACCTTCCAGAGCAGCCCCCTGTCCTTGGCAGCAGGGCAGTGG
 CAGCGGTGGCAGTGGCAGTGAACCGAGCTGCTGGAGCCAGTCCCGCTGGCCCTGTGCAAGCTGCTTCC
 TCTGCCCTGCTCTGCAACCCCTTGGCCCTCTGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CAGCGTCTACCATAGCCCTGGGCAACGTGCTGGCAGGGCACCGAGAGCAGAGATGGCCCTGGCTGGCCAG
 TGGCTGCTGCCCTCAGTGGCTGGCTGCTCAATGGCTGTTGGCTCGTCTCCTGGCTTCTCTTGT
 TCTACGGTGAGCCAGTCACACGGCCCACTCAGGGCCCGCCGTTGACTCTGGAGGCATCGCAAGCAGGC
 TGACCTGGACCTGGCCGGGGAGACTTGTCCCAGGCTGCCAGCAGCTGGCTGGCCCTGCCACTG
 GGGCGGCCCTGCCACCTCCCACCTGGACCTGGCTGTAGCCTCTGGAACCTCATCCGTACCTGC
 TGCAGCGTCTGGGTGGCGCTGGCTGGCAGGGCGGGCAGGGGGCTGCAAGCAGGACTGTGCTCTGCG
 AGTGGATGCTAGGCCAGCGCCGAGACGCAAGCCCTGGTCTACCATAAAGCTGCACCAAGCTGCACACCAG
 GGGAAAGCACACAGGCCGGCACCTCACTGCCACCAACCTGGCGTAGTGCCTGAACCTGGCAGAGTGTG
 CAGGGGATGCCGTGCTGTGGCAGCCTGGCGAGATCTATGTGGCGCTGCATTGAGAGTGAAGACCAG
 TCTCCCACGGCCTTGACATTCTGACACGCTTCTGAGCAGTGCCTGCCAGGGCTGCCCTGGCACAG
 AGTGGCTCAGTGCCTCTGCCATGCACTGGCTGGCTGCAAGGACTGGCTGGCCACCGTTCTCGTGGATGGGG
 ACTGGTCCGTGCTCAGTACCCCATGGAGAGCCCTGACAGCTGGCCGGGGAAACCCAGTGGACCCCTGGC
 CCAGGTGACTCAGCTATCCGGAACATCTTAAAGCGAGCAGACTGAACCTGTGACCCAGCCAAACCC
 AGCCCTGGGTCACTGGCTGGGAAAGGAATTCTCGGATGCCCTCGGCTACCTGCACTGCTGAACAGCT
 GTTCTGATGCTGCCGGGGCTCTGCCATCAGCTTCTCCATCAGTCCAGCATGGCCACCCACCGCGT
 AGACCCCTGGGCTGGCAAGTGGTGGGGCTGGAGCACCTGCCGGGTGCTGCCAGGAGTCTGAGAGACCCCTGC
 CCAGGGCAGCTGCACTCTCAAGGCTGCCGGCCCTGCTGGCTGTGCCAGGCAGAGTCTGGTCC
 AGCCAGCCTGACCATCTGTGAGAAGGCCAGTGGTACCTGCAGGCAGCAGCTGGCTACACACCAGCAGC
 AGCTCCATTGACAAGGCCGTGAGCTTCTGTGACCTGCTTCTGGTGGCTGCCAGGCCAGCAGCAGGCC
 GGCAGCAGCAGCCCCGGGCCAGCAGGCCAGGGCAGCAGCAGGCCAGGCCAGGCC
 TGAGCTGCGTGGCTTCCAACGGGACCTGAGCAGCCTGCCAGGCCAGGCCAGGCC
 CGGAGGGTGTCTTACATGAGGCCACGGCCGGCTGATGGCGGGGCCAGCCCCACAGGACACACCAGC
 TCCCTGACCAGCTGAGGCCGGGAGCAGCGGAGGCCCTGCTGCCCTGCTACCTGCC
 GCGGCCACGCCGGGAGCAGCGGAGGCCCTGCTGCCCTGCTACCTGCC
 TCGCGCCCGGGCAGCGCTGGCATGCTGGCTGAGGCCGCCACACTCGAGAAGCTGGCGATGCC
 GGCTGCTGCACGACTGTCACTGAGATGCTCATGCCCTGGCGGTGGGACCACTGTCACTCCAGCTAGAC

CCCGTGTCCCCGGCCTAGCACCCCTGCTCTAGCCACTTGGTCCCGTGCAGCTCTGCCTGCGTCGA
AGCTTGAGGCCAAGGCAGTCAAGAGACTCTGGCTCCACAGTCACCTGCGGCTGCTGTGCCT
TCGGCGATCGGGCACTGCAGGGGCCAGGGCGCATCTGACCCATAAGACCGCGGCCATGAGGCTGACCTCTGG
TGGCGATCGGGCACTGCAGGGGCCAGGGCGCATCTGACCCATAAGACCGCGGCCATGAGGCTGACCTCTGG
CTGGCGATCGGGCACTGCAGGGCTCTGCCAGAGGCCCTCTCTCCGTCGAGGAGAGACGTGTACA
TAGTGTAGGTAGCGTCTAGCCTCTGACCTGAGGCTCTGTGCTACTTTGCTTTGCAAACCTTAT
TTCATAGATTGAGAAGTTGTACAGAGAATTAATGAAATTATTTATAATCTGGTTTGTCCT
CAGCTGATGGATGTGCTGACTAGTGAGAGTGCTTGGCCCTCCCCCAGCACCTAGGGAAAGGCTTCC
CCCCCTCCGCCACAAGGTACACAACCTTAACCTAGCTCTTCCGATGTTGTTGTTAGTGGGAGGAG
TGGGAGGGCTGGCTGTATGGCTCCAGCCTACCTGTTCCCCCTGCTCCAGGGCACATGGTGGCTGT
GTCACACCTTAAGGGCTCCATGGGTCACTGTCCTTCACCTCCCAGCTCTGCCCCATCAGGCTCC
TGGTGGCACGGGAGGATGGACTGACTCCAGGACCTGTTGTCGACAGGAGCTACAGCTGGTCTCCC
TGAAGAAGTCTGGCACGCTCACCTCCCCATCCGGCCCTGGTCATCTCACAGCAAAGAACCT
CCCTCCGACCTGCCGACACTGGAGAGGGGCACAGGGGGGGAGGTTCTGTTGTGAAAGGC
CGACTCCCTGACTCCATTATGCCCCCCCCCAGCCCCCTCCATTCCATTCCCCAACCTAACGCC
TGGCCGGCTCCAGCTGAATCTGGTCCAATCACGGCTGCAGATTCCAAAATCGTTGATCT
TTATTGACTTTTTTTTTCTGAATGCAATGACTGTTTTACTCTTAAGAAAATAAACATC
TTTAGAAACAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 31)

La secuencia de ácido nucleico, o CDS, para la isoforma c de SREBF1 (número de acceso de GenBank NM_001244003) se proporciona a continuación.

ATGGACGAGCTGCCTTCGGTGAGGGCTGTGGAACAGGCCTGGACGAGCTGGCGAACACTGGACGCCACTGCT
GACCGACATCCAAGACATGCTTCAGCTCATCAACACCAAGACAGACTGACTTCCCTGGCTGTTGATTCCCCCTATG
CAGGGGGCGGGGAGGACACAGAGCCCACCAGCCCTGGTGCAACTCTCTGAGAGCTGCTTCTCTGCTTCC
CTGGGTTCTCTGGAAGCCTCTGGGAACCCAAGGCAACACCTGCATCCTGCTCCCTGTGCCGTCTGCATC
CACTGCTTAAAGATGTACCCGTCTGTGCCCCCTCTCCCTGGCCTGGAATCAAAGAAGGCCAGTGCACACTCA
CCATCCTGCAGCCCCCAGCAGCACAGCCATCACAGGGACCTCCTGCCCTGAGTTCCCTCCACCAACCCCTGCAG
CTCAGCCGGCTCTGTGCTGGTATTCTAGCCTCCCTCAGGCTTCTCAGGGACCTCCTGGAAATACCAACA
GCCACCATCTAGCCTGCACTGGCCTCTGCACCAAGGAGCTCGCCCATCTTACACACCCAGGTCCAGAGCTCAG
CCTCCCAGCAGCCACTGCCAGCCTCAACAGCCCCTAGAACAAACACTGTGACCTCACAGATCCAGGGTCCCAGTC
GTACTGCAGCCACATTCATCAAGGAGATTCACTGACTGACAACAGTAAAAACAGATAACAGGAGGCCACGATGAA
GACGGCTGGCATCAGTACCTTAGCCCCCTGGCACAGCGTGCAGGAGGCCCTGCAAGACCTGGTGAATGGTGGGA
CCATCCTGGCACAGTACCATGGTGTGGATACAGACAAACTGCCATCCATGACTGGCAGTGGCAGCAAGGCC
CTGGGCTCAGCTCAGAGCGTGGTGAAGAGCGCACAGCCCACAAATGCCATTGAGAAGCGTACCGTCTCTATCAA
TGACAAGATTGTGGAGCTAAAGACCTGGTGGCAGTGGCAAAGCTGAATAATCTGCCGTCTGCGCAAGG
CCATCGACTATATCCGCTCTTACAGCACAGCAACCAGAGCTCAAGCAGGAGAACCTGGCCCTGCGAAATGCCGCT
CACAAAACCAATCCCTGAAGGACCTGGTGTGCCCTGTGGCAGTGCAGGAGGCACAGATGTGGTATGGAGGTGT
GAAGCCTGAGGTGGTACGAGCAGTGGTGGCAGTGAACCTGGCAGTGGCAGCTGGCTGCCCTGGAGTAGCCCTGTCCC
TCGGCAGCAGAGGTAGCAGCAGTGGTGGCAGTGAACCTGGCAGTGGCAGCTGGCTGCCCTGGAGTAGCCCTGGTGGAAA
GCCCAACGGCTGCACAGTCATGGCATGCTGGACCGCTCCCGCTAGCCCTGTGCGCTGGTCTTCCGTGCTGAC
CTGCAACCCCTGGCATCACTGTTGGCTGGGCACTCCCGCTCCAGTGCCTCTGGCAGCACACCACAGCTCTG
GGCGTAGCATGCTGGAGGCCAGAGCAGAGATGGCTTAATTGGACCCAGTGGTGTGCCACCCCTAGTCTGGCTG
GCCAATGGACTACTAGTGTGGCCTGCCCTGGCTCTTGTCTATGGGAAACCTGTGACCCGGCACACACTAG

ES 2 938 626 T3

CCCAGCTGTACACTTCTGGAGACATCGAAACAGGCTGACCTGGACTGGCTGGGGAGATTTGCCAGGCTGCTC
AGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAGGCATTGGACGGCCCTGCCACCTCGAACCTAGACTTGGCCTGCAGCCTGCTT
TGGAACCTCATCCGCCACCTGCTGCAGCGTCTGGGTTGGCCGCTGGCTGGCAGGCCCCCTGGGGCTTGCAGGAG
AGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACGTGCCAGTGCTCGAGATGCGCTCTCGTCTACCATAGCTGCACCAGCTGC
ATGCCATGGCAAATACACAGGAGGGCACCTCATTGCTTAACCTGGCACTGAGTGCCCTGAACCTGGCAGTGC
GCAGGAGATGCTGTATCCATGGCAACGCTGGCAGAGATCTATGGCTGCTGCCCTGAGGGTCAAGACCAGTCTCCC
AAGAGCCTTGCACTTTTGACACGTTCTCCTGAGTAGTGCCGCCAGGCCTGCCACAGAGTGCTCAGTGC
CTCTGCCATGCAGTGGCTCTGCCACCCGTAGGCCACCGTTCTCGTGGATGGGACTGGCTGTGCATGGGCC
CCACAGGAGAGCCTGTACAGCGTGGCTGGAAACCCAGTGGATCCCTGCCAGGTGACTCGACTATTGCGAAC
TCTCTGGAGAGAGCACTGAACGTATTGCTCAACCCAGCCCCGGGACAGCTGATGGAGACAGGGAGTTCTGACG
CACTTGGATACTGCAGTGCTAAATCGCTGCTGTGATGCTGCTGGGACTCCTGCCCTGAGCTCTGTGAGCTCC
AGCATGGCTTCCACCACCGCACAGACCCAGTGGCAAGTGGTGGGCTCACTGACGGCTGTGGTATCCACTGGCT
GCCGGGGATGAAGAGGCAGCTGAGGCCCTATACCGCTGGTAGAGCGTATGCCCTGCTGCAGGGAGACTGAGA
GACCCCTGCCAAGGCAGCTGTACTCCTCAAGGCTGCCGGCTCTGGTGGACACAGAAAAGTGGAGTCTGGC
CCAGCCAGCCTGGCCATCTGTGAGAAGGCCAGCGGGTACTTGCGGGACAGCTTAGCCGCTCCACCAACTGGCAGCTC
CATTGACAAGGCCATGCAGCTGCTCTGTGATCTACTTCTGTGGCCCGACTAGTATGTGGCAGCGCCAGCAGT
CACCAAGCCTCAGCCAGGTAGCTCACAGTGCCAGCAATGGATCTCAGGCCCTCGTGGAGCTTCGAGGTTCAA
CAGGACCTGAGCAGCCTGAGGCCCTGGCACAGAACTTCCGGCTGCTATGAGGAGGTGTTCTACACGAGGCCAC
AGCTCGGCTGATGGCAGGGCAAGTCTGCCGGACACACCAGCTCTGGACCGAAGTCTGGGAGGCCGGCT
CCAGTGGCAAGGAGGCAGTGTAGCTGAGCTGGAGCCTGACCCACATGGGGAGCACACAGAGGCCCTGCTGCTG
GCCTCCTGCTATCTGCCACCTGCCCTCTGTGGCCCGACTGGACAGCAAATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCAGC
TGTAGAGAAGCTTGGTATCGCTACTGCTGACTGCCAGCAGATGCTCTGCCCTGGCGGTGGGACCACTG
TCACCTCCAGCTAA (SEQ ID NO: 32)

La secuencia de ácido nucleico, o secuencia de ARNm, para la isoforma c de SREBF1 (n.º de acceso de GenBank NM_001244003) se proporciona a continuación.

CTCCTGCGAAGCCTGGCGGGCGCCGCGCCATGGACGAGCTGCCCTTCGGTGAGGGCTGTGGAACAGGCCTGG
CGAGCTGGCGAAGTGGACGCCGACTGCTGACCGACATCCAAGACATGCTCAGCTCATCAAACAAAGACAGTG
ACTTCCCTGCCCTGTTGATTCCCCCTATGCAGGGGGCGGGCAGGAGACACAGAGCCACCCAGGCCCTGGTGC
TCTCCTGAGAGCTTGTCTCTGCCCTGGTGGCTCTCTGGAAAGCCTCCTGGGGAAACCAAGGCAACACC
TGCATCCTGCCCCCTGTGCCGTCTGCATCCACTGCTTAAAGATGTACCCGTCTGTGCCCTCTCTCCCCCTGG
CTGGAATCAAAGAAGAGCCAGTGCCACTCACCACCTGCAGCCCCAGCAGCACAGCCATCACCAGGGACCC
CCTCCGAGTTCCCTCCACCAACCCCTGCAGCTCAGCCGGCTCTGTGCTGGGTATTCTAGCCTCCTCAGGCT
CTCAGGGACCTTCCCTGGAAATACCAACAGCCACCATCTAGCCTGTCACTGCCCTGCACCAGGAGTCTGCC
TCTCTTACACACCCAGGTCCAGAGCTCAGCCTCCCAGCAGCCACTGCCAGCCTAACAGCCCTAGAACAA
GTGACCTCACAGATCCAGCGGGTCCCAGTCGTACTGCAGCCACATTCATCAAGGCAGATTCACTGCTACT
TGAAAAACAGATAACAGGAGGCCAGATGAAGACGGCTGGCATCAGTACCTAGCCCTGGCACAGCGTGCAGG
CAG

ES 2 938 626 T3

GCCCCTTGCAGACCCTGGTGAGTGGTGGGACCATCCTGGCCACAGTACCAATTGGTGGAACAGACAAACTGCC
ATCCATCGACTGGCAGCTGGCAGCAAGGCCCTGGCTCAGCTCAGAGCCGTGGTGAGAACGCACAGCCCACAATGC
CATTGAGAAGCGTACCGTCTCTATCAATGACAAGATTGGAGCTCAAAGACCTGGTGGGGCACTGAGGCAA
AGCTGAATAAATCTGCCGCTTGCAGCAAGGCCATCGACTATATCCGCTTACAGCACAGCAACCAAGAGCTCAAG
CAGGAGAACCTGGCCCTGCGAAATGCCGCTCACAAAAGCAAATCCCTGAAGGACCTGGTGTGGCCTGTGGCAGTGC
AGGAGGCACAGATGTGGCTATGGAGGGTGTGAAGCCTGAGGTGGATACGCTGACCCCTCCACCCCTCAGACGCTG
GCTCGCCCTCCCAGAGTAGCCCCTGTCCTCGGCAGCAGAGTAGCAGCAGTGGTGGCAGTGACTCGGAGCCTGAC
AGCCCAAGTCTTGAGGATAGCCAGGTGAAAGCCAAACGGCTGCACAGTCATGGCATGCTGGACCGCTCCCGCTAGC
CCTGTGTGCGCTGGTCTTCTGTGACCTGCAACCCCTGGCATCACTGTTGGCTGGGATCCCCGGTCCCT
CCAGTGCCTCTGGTGCACACCACAGCTCTGGCGTAGCATGCTGGAGGCCAGAGCAGAGATGGCTCTAATTGGACC
CAGTGGTTGCTGCCACCCCTAGTCTGGCTGGCCAATGGACTACTAGTGTGGCCTGCCCTGGCTCTCTCTTGTCTA
TGGGGAACCTGTGACCCGCCACACACTAGCCCAGCTGTACACTTCTGGAGACATGCAAACAGGCTGACCTGGACT
TGGCTCGGGGAGATTGGCCAGGCTGCTCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGAGGATTGGACGGCTGGGCCCTGCCACC
TCGAACCTAGACTTGGCCTGCAACCTGGCTGCTTGGAACCTCATCCGCCACCTGCTGCAAGCTGGCTCTGGGTTGGCCGCTG
GCTGGCAGGCCGGCTGGGGCTTGCGGAGAGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACGTGCCAGTGCTGAGATGCC
CTCTCGTCTACCATAAGCTGCACCAGCTGCATGGCAAATACACAGGAGGGCACCTCATGGCTCTAACCTG
GCACTGAGTGCCCTGAACCTGGCGAGTGCAGCAGGAGATGCTGTATCCATGGCAAACGCTGGCAGAGATCTATGTGGC
TGCTGCCCTGAGGGTCAAGACCAGTCTCCAAGAGCCTGCACTTTTGACACGTTCTTGAGTGTAGTGTGGC
AGGCCTGCCTGGCACAGAGTGGCTAGTGCCTTGCCATGCAGTGGCTTGCCACCCGTAGGGATCCCT
GTGGATGGGACTGGCTGTGCATGGGCCACAGGAGAGGACTGAACATCTCTGGAGAGAGACTGAACGTGATTGCTCAACCCAGGCC
CGCCCAAGGTGACTCGACTATTCTGCAGACATCTCTGGAGAGAGACTGAACGTGATTGCTCAACCCAGGCC
CAGCTGATGGAGACAGGGAGTTCTGACGCACCTGGATACCTGCAGTTGCTAAATCGCTGCTGTGATGCTGCGG
ACTCCCTGCCTGCACTGGCTCTGTCACTGGCTCCAGCATGGCTTCCACCCAGGGCACAGACCCAGTGCCAGTGG
CTCACTGACGGCTGTGGTGTGCATGGCTGGCGGGATGAAGAGGAGCTGAGCGCTTACCCGCTGGTAGAGC
GTATGCCAACGTGCTGCAGGAGACTGAGAGACCCCTGCCAAGGAGCTCTGACTCCTCAAGGCTGCCGG
CTGCTGGACCACAGAAAAGTGGAGTCTGGCCAGCCAGCTGCACTGGCTGGCCATCTGTGAGAAGGCCAGCGGG
CAGCTTAGCCGCTCCACCAACTGGCAGCTCCATTGACAAGGCCATGCAGCTGCTCTGTGATCTACTCTGTGG
CCCGCACTAGTATGTGGCAGGCCAGCAGTCACCAGCCTCAGCCAGGTAGCTCACAGTGCAGCAATGGATCTCAG
GCCTCCGCTTGGAGCTTCGAGGTTCCAACAGGACCTGAGCAGCCTGAGCGCTTGGCACAGAACCTCCGGC
TATGAGGAGAGTGTGCTACAGAGGCCACAGCTGGCTGATGGCAGGGCAAGTCTGCCCCGACACACCAGCTCC
TGGACCGAAGTCTGCGGAGGGCGGGCTCCAGTGGCAAAGGAGGACTGTAGCTGAGCTGGAGCCTCGACCCACA
TGGCGGGAGCACACAGAGGCCCTGCTGCTGGCCTCTGCTATCTGCCACCTGCCCTCTGTGCGGCC
AATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCACCACTGTAGAGAACGTTGGTGTACCGCTACTGCTGACTGCCAGCAG
TGCTTCTGCGCTGGCGGTGGGACCACTGTCACTTCCAGCTAAACCTTGGATGGTCTCCCGAGTATTAGAGGCC
TAAGGACCTTGTCACTGGCTGTGGCGTCCAGAGAGGGTGAGCCTGACAAGCAATCAGGATCATGCCACCTCTAG
TGACAAATCTAGAAATTGCAAGAGGCTGCAGTGGCCAATGCCACCCCTCTGTGCTGTAGGACCTTTCTGT
ATGGAAAGGAACCTTCCCTAGCTGAGGGCCACCCCTGTGCTGAGGCTCTACCCACTCCTGGAAAGACTGTATATA
GTGTAGATCCAGCTGAGCCAGTTCTGTGCAGGCTCATGTAACCTTAACCTTGCAAACCTTATTTCATAGGT
TGAGAAATTGTACAGAAAATTAAAAAGTGAATTATTTATA (SEQ ID NO: 33)

La secuencia de aminoácidos para la isoforma c de SREBF1 (n.º de acceso de GenBank NM_001244003) se proporciona a continuación.

MDELPGGEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQDSDFPGLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPESLSSPAS
 LGSSLEAFLGEPKATPASLSPVPSASTALKMYPVPPFSPGPGIKEEPVPLTILQPPAAQPSPGTLLPPSFPPPLQ
 LSPAPVVLGYSSLPSGFGSGTLPGNTQPPPSSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQQPLPASTAPRTTVTSQIQRVPV
 VLQPHFIKADSLLTTVKTDTGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDLPIHRLAAGSKA
 LGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAIDYIRFLQHSNQKLKQENLALRNAA
 HKSLSKDLVSAACGSAGGTDVAMEGVKPEVVDLTPPPSDAGSPSQQPLSLSGSRGSSGGSDSEPDSPVFEDSQVK
 AQLRHSHGMLDRSRALCALVFLCLTCNPLASLFGWGPSSASGAHHSSGRSMLEAESRDGSNWTQWLLPPLVWL
 ANGLLVLACLAFLVYGEPVTRPHTSPAVHFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSL
 WNLRHLLQRLWVGRWLAGRAGGLRRDCGLRMDARASARDAALVYHKLHQLHAMGKYTGGLIASNLALSALNIAEC
 AGDAVSMATLAEIYVAAALRVKTSPLRALHFLTRFLSSARQACLAQSGSVPILAMQWLCHPVGHRFFVDGDWAVHGA
 POESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFCHELLERALNCIAQPSPGTADGDREFSDALGYLQLLNRCSDAVGTPACSFVSS
 SMASTTGDPVAKWWASLTAVVIHWLRRDEEAERLYPLVERMPHLQETERPLPKAALYSFKAARALLDHRKVESG
 PASLAICEKASGYLRDLSLAAPPTGSSIDKAMQLLCDLLLARTSMWQRQSPASAQVHSASNGSQASALELRGFQ
 QDLSSLRRLAQNFRPAMRRVFLHEATARLMAGASPARTHQLLDRSLRRAGSSGKGGTVAELEPRPTWREHTEALL
 ASCYLPAPFLSAPGQQMSMLAEEARTVEKLGDHRLLLDCQQMLLRLGGGTTVTS (SEQ ID NO: 34)

La secuencia de ácido nucleico, o secuencia de ARNm, para la isoforma c de SREBF1 truncada (n.º de acceso de GenBank NM_001244003), por ejemplo, SREB411, se proporciona a continuación.

atggacgagctgccttcggtgaggccgctgtggAACAGGGCCTGGACGAGCTGGCGAAACTGGACGCCGACTGCT
 gaccgacatccaagacatgcttcagctcatcaacaaccaagacagtgacttccctggcctgtttgattccccctatg
 caggggggcggggcaggagacacagagccccaccagccctggccactctcctgagacttgcatttttttttttttt
 ctgggttcctctggaaaggcccttcggggaaaccaaggcaacacctgcatttttttttttttttttttttttttttt
 cactgcttaaagatgtacccgtctgtcccccccttctccctggcctggaaatcaaagaagagccagtgcactca
 ccatttcgcagccccccagcagcacagccatcaccaggacccttcgcctccggatccatccatccatccatccat
 ctcagccggcctgt
 gtcacccatcttcgttcactggccttcgcaccaggatctcgccttcgcaccatcttcgcaccatcttcgcacc
 cttcccgccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat
 gtactgcagccacatcatcaaggcagatttcactgtactgacaactgtaaaaacagatacaggagccacgtgaa
 gacggctggcatcgt
 ccatttcgcacatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat
 ctgggttcagtcagagccgtggtgagaagcgcacagcccaatgcattggaaagcgcctaccgttccttatcaa
 tgacaagattgtggagctaaagacctgggtggactgaggcaagctgaaataatctggcgtttgcgaagg
 ccatttcgcactatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat
 cacaagcaatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat
 g (SEQ ID NO: 35)

La secuencia de aminoácidos para la isoforma c de SREBF1 truncada (n.º de acceso de GenBank NM_001244003), por ejemplo, SREB411, se proporciona a continuación.

MDELPGGEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQDSDFPGLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPESLSSPAS
 LGSSLEAFLGEPKATPASLSPVPSASTALKMYPVPPFSPGPGIKEEPVPLTILQPPAAQPSPGTLLPPSFPPPLQ
 LSPAPVVLGYSSLPSGFGSGTLPGNTQPPPSSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQOPLPASTAPRTTVTSQIQRVPV
 VLQPHFIKADSLLTTVKTDTGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDLPIHRLAAGSKA
 LGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRAIDYIRFLQHSNQKLKQENLALRNAA
 HKSLSKDLVSAACGSAGGTDVAMEGV (SEQ ID NO: 36)

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de una isoforma de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 28, 30, 34 o 36; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de una isoforma de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 28, 30, 34 o 36.

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 34; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SREBF1, por ejemplo, SEQ ID NO: 34.

En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SREBF1 o una isoforma del mismo, por ejemplo, un SREBF1 truncado. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SREBF1, por ejemplo, un fragmento funcional de SEQ ID NO: 1 o 34, o un fragmento funcional de una isoforma SREBF1, por ejemplo, SEQ ID NO: 28, 30 ó 36. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un dominio funcional de SREBF1, por ejemplo, el dominio de transactivación de SREBF1. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende el dominio hélice-bucle-hélice (HLH) de SREBF1. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SREBF1 que es capaz de trasladarse al núcleo y/o capaz de iniciar la transcripción de los genes diana de SREBF1.

15 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende los 410 aminoácidos N-terminales de SREBF1 (también denominado en el presente documento como SREBF410), por ejemplo, los aminoácidos 1-410 de SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de los 410 aminoácidos N-terminales de SREBF1 se proporciona a continuación:

MDELAFGEAALEQT LAEMCELD TAVLNDI E DMLQLINNQD SDFP GLFDAP YAGGETG DTGPSSPG ANSPESFSSA SL
ASSLEAFLGGPKVTPAPLSPPPSAPAALKM YPSVSPFSPGPGI KEEPVPLT I LQPAAPQ PSPGTLLPPSF PAPPVQL
SPAPV LGYSSLP SGSGT LPGNTQQP PSSLPLAPAPGV LPTPALHTQV QSLASQQPLPASAAPRTNTV TSQVQ QV PV
VLQPHFIKADSL LTA VKT D AGATV KTAGI ST LAPG TAVQAGPLQ TLVSGGT I LATVPLVVD TDKLPIHRLAAGSKA
LGSAQSRGEKRTA HNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRA KAI DYI RFLQHSNQKLQENLTLSAH
KS KSLKDLV SACGSGGGT DVSMEGM (SEQ ID NO: 26)

20 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de los 410 aminoácidos N-terminales de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 26; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de los 410 aminoácidos N-terminales de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 26.

25 En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende los aminoácidos 91-410 de SREBF1, por ejemplo, los aminoácidos 91-410 de SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de los aminoácidos en las posiciones 91-410 de la SREBF1 se proporciona a continuación:

MPAPLSPPPSAPAALKM YPSVSPFSPGPGI KEEPVPLT I LQPAAPQ PSPGTLLPPSF PAPPVQLS PAPV LGYSSLPS
GFSGT LPGNTQQP PSSLPLAPAPGV LPTPALHTQV QSLASQQPLPASAAPRTNTV TSQVQ QV PV LQPHFIKADSL L
LTAVKT D AGATV KTAGI ST LAPG TAVQAGPLQ TLVSGGT I LATVPLVVD TDKLPIHRLAAGSKA LGSAQSRGEKRTA
HNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRA KAI DYI RFLQHSNQKLQENLTLSAH KSKSLKDLV SACG
SGGGT DVSMEGM (SEQ ID NO: 27)

30 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos en las posiciones 91-410 de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 27; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 91-410 de SREBF1; por ejemplo, SEQ ID NO: 27. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico que codifica SREBF 1 o un fragmento funcional de la misma; por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional de la misma. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 2.

40 En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SREBF2 o un fragmento funcional del mismo; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de SREBF2 o un fragmento funcional del mismo.

45 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende una enzima. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende una enzima que convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos insaturados. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM

comprende una enzima que convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados, por ejemplo, ácidos grasos con un doble enlace. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende una enzima que convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, ácidos grasos con más de uno, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, enlaces dobles. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende estearoil CoA desaturasa 2 (SCD2), estearoil CoA desaturasa 3 (SCD3), estearoil CoA desaturasa 4 (SCD4), estearoil CoA desaturasa 5 (SCD5), un isoforma del mismo, o un fragmento funcional del mismo.

De acuerdo con la invención, el primer LMM comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1) que comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

10 SCD1 es la enzima limitante de la velocidad responsable de la conversión de ácidos grasos saturados (SFA) a ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). Se ha puesto mayor atención en SCD1 en los últimos años debido a los estudios que relacionan la expresión de este gen con el aumento de las propiedades de supervivencia celular, proliferación y tumorigénesis (Angelucci, Maulucci et al. 2015) (Igal 2011). También se ha demostrado que SCD1 desempeña funciones clave tanto en el control de la tasa metabólica celular como en la lipogénesis general. Este último se controla 15 a través de interacciones directas con un importante regulador de la ruta biosintética, la acetil-CoA carboxilasa (ACC), así como la conversión de SFA a MUFA que, dado que se sabe que SFA inhibe la ACC, facilita la funcionalidad de la enzima para aumentar la biosíntesis de lípidos (Igal 2010). La principal regulación de SCD1 es a través de la activación transcripcional mediante la cual los factores de transcripción, como SREBF1, se unen a la secuencia SRE en la región 20 promotora del gen. SCD1 se localiza endógenamente en el ER como una proteína integral de membrana, donde SCD1 lleva a cabo su función enzimática de catalizar la conversión de SFA a MUFA. Su papel en la conversión de SFA a MUFA (p. ej., la sobreregulación de la relación de MUFA a SFA) puede regular una disminución en los dominios de balsa de lípidos, lo que a su vez puede resultar en una mayor fluididad de la membrana. Este cambio en la fluididad de la membrana y la composición lipídica de la membrana también puede tener implicaciones en la formación de vesículas y, por lo tanto, en la comunicación celular y el tamaño o la morfología del ER (p. ej., expansión del ER). También se 25 ha demostrado que la eliminación del gen SCD1 aumenta la respuesta de la proteína desplegada (Ariyama, Kono et al. 2010). Además, SCD1 regula negativamente el ácido palmítico celular que, a su vez, es un fuerte regulador negativo de ACC. SCD1 también controla el estado de fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), reduciendo en consecuencia su capacidad para fosforilar y, por lo tanto, inhibir ACC; una enzima limitante de la velocidad en el proceso de síntesis de lípidos. Por último, la desaturación de SFA evita su acumulación, lo que puede 30 causar la muerte celular. Como tal, la modulación de SCD1 da como resultado un aumento de la biosíntesis de lípidos, la supervivencia celular y las tasas de proliferación. (Hagen, Rodríguez-Cuenca et al.), (Scaglia, Chisholm et al. 2009).

La secuencia de aminoácidos de SCD1 se proporciona a continuación:

MPAHMLQEISSYTTTTITAPPSGNEREKVKTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDPTYQDEEGPPPKEYVWRN
IILMVLLHLGGLYGIILVPSCKLYTCLFGIFYYMTSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLIIANTMAF
QNDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFSHVGWLLVRKHPAVKEGGKLDMSDLKAEKLVMFQRRY
YKPGLLLMLCFILPTLVPWYCWCGETFVNSLFVSTFLRYTLVLNATWLNSAHLGYRPyDKNIQSRENILV
SLGAVGEGFHNYHHTFPFDYSASEYRWHINFTEFIDCMAALGLAYDRKKVSKATVLARIKRTGDGSHKSS
(SEQ ID NO: 3)

La secuencia de nucleótidos de SCD1 se proporciona a continuación:

atgccggcccacatgctccaagagatctccagttttcacacgaccaccaccatcactgcacccctcc
ggaaatgaacgagagaaggtaagacggtgccctccaccttgcgaagaagacatccgtctgaaatgaaaagaa
gatattcacgacccccacccatcaggatgaggaggaccccccggcaagctggagttacgtctggaggaaacatc
attctcatggccctgctgcacttggaggccctgtacggatcatactggttccctcctgcaagctctacacc
tgcctctcggtatttctactacatgaccagcgctctggcatcacagccggcgtcatcgccctctggagc
cacagaacttacaaggcacggctgcccctgcggatcttcattatgcacaccatggcggtccagaat
gacgtgtacgaatggcccgagatcaccgcgcaccacaaggcttcagaaacacacgcggaccctcacaat
tcccgccgtgcttcttcacgtgggtggctgtgcacaaacaccggctgtcaaagagaag
ggcggaaaactggacatgtctgacccatggaaagccgagaagctgtgtatgtttccagaggaggtactacaagccc
ggcctctcgctgtgtgccttcacccacgcgtggactctgtggggcgagactttgtaaac
aggctgttcgttagcaccccttgcgatacactctgggtctcaacgccacccgtggtaacagtgcgc
catctctatggatatgcgcctacgacaagaacattcaatccggagaatatcctgggttccctgggtgcc
gtggcgagggttccacaactaccaccacaccccttcgactactctgccagtggatccgc
atcaacttcaccacgttcatcgactgcacggctccctggcgttacgaccggaaagttct
aaggctactgtcttagccaggattaagagaactggagacgg ggtcacaagagtagctga
(SEQ ID NO: 4)

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SCD1; por ejemplo, SEQ ID NO: 3; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más

de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SCD1, por ejemplo, SEQ ID NO: 3. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SCD1, por ejemplo, un fragmento funcional de SEQ ID NO: 3.

- 5 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de ácido nucleico que codifica SCD1 o un fragmento funcional de la misma; por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o un fragmento funcional de la misma. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.
- 10 En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SCD2, SCD3, SCD4, SCD5, o un fragmento funcional de los mismos; o difiere en 1, 2 o 3 o más residuos de aminoácidos pero no más de 50, 40, 30, 20, 15 o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SCD2, SCD3, SCD4, SCD5 o un fragmento funcional del mismo.
- 15 En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SCD1, SCD2, SCD3, SCD4 o SCD5, por ejemplo, un SCD1, SCD2, SCD3, SCD4 o SCD5 truncado. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de SCD1, SCD2, SCD3, SCD4 o SCD5, por ejemplo, un fragmento funcional de SEQ ID NO: 3. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el LMM comprende un dominio funcional de SCD1, SCD2, SCD3, SCD4 o SCD5, por ejemplo, un dominio que tiene actividad enzimática para convertir ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados.

20 El porcentaje de identidad en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., 60 % de identidad, opcionalmente 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 % o 99 % de identidad en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia, cuando se compara y alinea para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. secuencias, o la similitud de la secuencia se puede determinar a través de una región que incluye los espacios o secuencias insertadas. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos alrededor de 50 aminoácidos o nucleótidos, 100 aminoácidos o nucleótidos, 150 aminoácidos o nucleótidos, de longitud. Más preferiblemente, la identidad existe en una región que tiene una longitud de aproximadamente 200 o más aminoácidos o nucleótidos, o aproximadamente 500 o 1000 o más aminoácidos o nucleótidos.

25 Para la comparación de secuencias, una secuencia normalmente actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan una o más secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 30 mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (consulte, por ejemplo, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology). Se pueden realizar múltiples alineaciones de secuencias mediante algoritmos como ClustalW, Clustal Omega y MAFFT. Otros algoritmos para comparar relaciones entre dos o más secuencias incluyen los modelos ocultos de Markov. Un modelo oculto de Markov es un modelo que describe la probabilidad de que un tipo particular de nucleótido (o aminoácido) siga a otro (la vía de probabilidad está oculta). Es realmente un modelo probabilístico, no un algoritmo. Ejemplo de un algoritmo (o programa que implementa el algoritmo) podría ser HMMER (<http://hmmer.org/>).

35 Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; and Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

PRODUCTOS

40 En el presente documento se describen y/o reivindican métodos y composiciones para diseñar o fabricar una célula o un sistema de expresión libre de células capaz de producir altos rendimientos de un producto y/o mejorar la calidad

del producto. Los productos descritos en este documento incluyen polipéptidos, por ejemplo, proteínas recombinantes; moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas de ADN o ARN; proteínas o complejos multiméricos; partículas encapsuladas en lípidos, por ejemplo, partículas similares a virus, vesículas o exosomas; u otras moléculas, por ejemplo, lípidos. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto es un polipéptido. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto es un exosoma. Por ejemplo, el polipéptido recombinante puede ser una proteína difícil de expresar o una proteína que tiene estructuras complejas y/o no naturales, como un biológico de próxima generación, por ejemplo, una molécula de anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión o una proteína glicosilada.

En realizaciones, la célula o línea celular generada por los métodos o composiciones descritos en el presente documento produce un polipéptido recombinante como se define en las reivindicaciones, útil en el tratamiento de una condición médica, trastorno o enfermedad. Los ejemplos de condiciones médicas, trastornos o enfermedades incluyen, entre otros, enfermedades o trastornos metabólicos (p. ej., deficiencias de enzimas metabólicas), trastornos endocrinos (p. ej., deficiencias hormonales), desregulación de la hemostasia, trombosis, trastornos hematopoyéticos, trastornos pulmonares, gastroenteritis -trastornos intestinales, enfermedades autoinmunes, inmunodesregulación (p. ej., inmunodeficiencia), infertilidad, trasplante, cáncer y enfermedades infecciosas.

En realizaciones, el producto es una proteína exógena, p. ej., una proteína que la célula no expresa naturalmente. En una realización, la proteína es de una especie mientras que la célula es de una especie diferente. En otra realización, la proteína es una proteína de origen no natural.

En otras realizaciones, el producto es una proteína que la célula expresa de forma endógena. En una realización, el producto es una proteína que la célula expresa endógenamente a niveles endógenos o naturales. Los presentes métodos y composiciones descritos en el presente documento se utilizan para aumentar la producción y la calidad del producto endógeno, p. ej., un producto de origen natural producido naturalmente por la célula. El ácido nucleico exógeno que codifica la proteína se introduce y expresa en la célula. En otra realización, el ácido nucleico exógeno aumenta la expresión de un producto que la célula expresa endógenamente y se introduce en la célula. A modo de ejemplo, el ácido nucleico exógeno comprende una secuencia que activa el promotor (p. ej., la secuencia del promotor SRF, véase, por ejemplo, El factor de transcripción Ap-1 regula la actividad del promotor de la 20 α -hidroxiesteroid deshidrogenasa de mono en células CHO. Nanjidsuren T, Min KS. BMC Biotecnología. 30 de julio de 2014; 14:71. doi: 10.1186/1472-6750-14-71. PMID: 25073972) que controla la expresión de un producto endógeno de la célula.

El producto recombinante puede ser un producto terapéutico o un producto de diagnóstico, por ejemplo, útil para el cribado de fármacos. El producto terapéutico o de diagnóstico puede incluir, entre otros, una molécula de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión, una hormona, una citoquina, un factor de crecimiento, una enzima, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína indicadora, un péptido terapéutico o un fragmento estructural y/o funcional o un híbrido de cualquiera de estos. En otras realizaciones, el producto terapéutico o de diagnóstico es un polipéptido sintético, por ejemplo, en donde el polipéptido completo o partes del mismo no se deriva de ningún polipéptido de origen natural ni tiene ninguna secuencia o similitud estructural con él, por ejemplo, un polipéptido de origen natural descrito anteriormente.

En una realización, el producto recombinante es una molécula de anticuerpo. En una realización, el producto recombinante es una molécula de anticuerpo terapéutico. En otra realización, el producto recombinante es una molécula de anticuerpo de diagnóstico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal útil para técnicas de formación de imágenes o pruebas de diagnóstico.

Una molécula de anticuerpo, como se usa aquí, es una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. La molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos y las proteínas multiformato pueden ser inmunoglobulinas policlonales o monoclonales, de cadena única o múltiple o intactas, y pueden derivar de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgG, IgD o IgE. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

"Fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo intacto, o variantes recombinantes del mismo, y se refiere al dominio de unión al antígeno, por ejemplo, una región variable determinante antigénica de un anticuerpo intacto, que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica de el fragmento de anticuerpo a un objetivo, como un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, anticuerpos lineales, anticuerpos de un solo dominio como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra y una CDR aislada u otros fragmentos de un anticuerpo que se unen al epítopo. Un fragmento de unión a antígeno también se puede incorporar en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (ver, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden injetar

en andamios basados en polipéptidos como la fibronectina tipo III (Fn3) (ver U.S. Patent No.: 6,703,199, que describe minicuerpos de polipéptido de fibronectina).

Los productos recombinantes ejemplares que se pueden producir usando los métodos descritos en el presente incluyen, entre otros, los proporcionados en las tablas a continuación.

5

Tabla 2. Productos recombinantes ejemplares

Tipo de proteína terapéutica	Terapéutico	Nombre comercial
Hormona	Eritropoyetina, Epoéina- α Darbepoetina- α Insulina Hormona del crecimiento (GH), somatotropina	Epogen, Procrit Aranesp Humulin, Novolin Genotropin, Humatropo, Norditropin, NovIVitropin, Nutropin, Omnitrope, Protoprin, Siazen, Serostim, Valtropin
	Hormona folículo estimulante humana (FSH)	Gonal-F, Follistim
	Gonadotropina coriónica humana	ovidrel
	Lutropina- α	Luveris
	Glucagón	GlcaGen
	Liberación de la hormona del crecimiento	geref
	hormona (GHRH) secretina	ChiRhoStim (péptido humano), SecreFlo (péptido porcino)
	Hormona estimulante de la tiroides (TSH), tirotropina	Tirogen
Factores coagulación/coagulación sanguínea	Factor VIIa	NovoSeven
	Factor VIII	Bioclate, Helixate, Kogenate, Recombinate, ReFacto
	Factor IX	Benefix
	Antitrombina III (AT-III)	Trombato III
	Concentrado de proteína C	ceprotina
Citoquina/Factor de crecimiento	Interferón alfa tipo I	Infergen
	Interferón- α n3 (IFN α n3)	Alferón N
	Interferón- β 1a (rIFN- β)	Avonex, Rebif
	Interferón- β 1b (rIFN- β)	Betaseron
	Interferón- γ 1b (IFN γ)	Actimune
	Aldesleucina (interleucina 2 (IL2),	proleucina
	factor activador de hemocito epidérmico; ETAF	Kepivanza
	Palifermin (factor de crecimiento de queratinocitos; KGF)	RegranexAnril, Kineret
	Becaplermin (factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGF)	
	Anakinra (antagonista de IL1 recombinante)	
Moléculas de anticuerpos	Bevacizumab (VEGFA mAb)	Avastin
	Cetuximab (EGFR mAb)	Erbitux
	Panitumumab (EGFR mAb)	Vectibix
	Alemtuzumab (CD52 mAb)	Campamento

Tipo de proteína terapéutica	Terapéutico	Nombre comercial
	Rituximab (Ab químérico CD20)	Rituxan
	Trastuzumab (HER2/Neu mAb)	herceptina
	Abatacept (fusión CTLA Ab/Fc)	Orencia
	Adalimumab (TNF α mAb)	húmira
	Infliximab (mAb químérico TNF α)	
	Alefacept (proteína de fusión CD2)	Remicade
	Efalizumab (CD11a mAb)	amevive
	Natalizumab (mAb de la subunidad α 4 de la integrina)	Raptiva Tysabri
	Eculizumab (C5mAb)	Soliris
	Muromonab-CD3	Ortoclon, OKT3
Otros: Proteínas fusión/Vacunas proteicas/Péptidos	de Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)	Engerix, Recombivax HB
	vacuna contra el VPH	Gardasil
	OspA	LYMErix
	Inmunoglobulina anti-Rhesus (Rh)	Rhophylac
	G	Fuzeon
	enfuvirtida	QMONOS
	Seda de araña, por ejemplo, fibrión	Enbrel
	Etanercept (receptor de TNF/fusión Fc)	
	Cergutuzumab Amunaleukina	

Tabla 3. Productos recombinantes ejemplares adicionales: formatos biespecíficos

Nombre (otros nombres, organizaciones patrocinadoras)	formato BsAb	Objetivos	Mecanismos de acción propuestos	Etapas de desarrollo	Enfermedades (o voluntarios sanos)
Catumaxomab (Removab [®] , Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: Triomab	CD3, EpCAM	Redirección de células T al tumor, funciones efectoras mediadas por Fc	Aprobado en la UE	Ascitis maligna en tumores EpCAM positivos
Ertumaxomab (Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: Triomab	CD3, HER2	Redireccionamiento células T al tumor	Fase I/II	Tumores sólidos avanzados
Blinatumomab (Blincyto [®] , AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BITE	CD3, CD19	Redireccionamiento células T al tumor	Aprobado en EE. UU.	Célula B precursora
				TODOS	
				Fase II y III	TODOS
				Fase II	DLBCL
				Fase I	NHL
REGN1979 (Regeneron)	BsAb	CD3, CD20			
Solitomab (AMG 110, MT110, Amgen)	BITE	CD3, EpCAM	Redireccionamiento células T al tumor	Fase I	Tumores sólidos

Nombre (otros nombres, organizaciones patrocinadoras)	formato BsAb	Objetivos	Mecanismos de acción propuestos	Etapas de desarrollo	Enfermedades (o voluntarios sanos)
MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BITE	CD3, CEA	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I	Adenocarcinoma gastrointestinal
RO6958688 (Roche)	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BITE	CD3, PSMA	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I	Cáncer de próstata
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I	LMA
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I	Cáncer de colonrectal
MGD011 (Macrogenics)	DART	CD19, CD3			
SCORPION (Emergent Biosolutions, Trubion)	BsAb	CD3, CD19	Redireccionamiento de células T al tumor		
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I	NHL y TODOS
AFM12 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD19, CD16	Redireccionamiento de células NK a células tumorales		
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	Redireccionamiento de células NK a células tumorales	Fase II	Linfoma de Hodgkin
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, GD2	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I/II	Neuroblastoma y osteosarcoma
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, Her2	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase II	Cáncer de mama metastásico
EGFRBi-armed autologous activated T cells (Roger Williams Medical Center)	Células T precargadas con BsAb	CD3, EGFR	Células T activadas autólogas para tumor EGFR positivo	Fase I	Pulmón y otros tumores sólidos
Anti-EGFR-armed activated T-cells (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, EGFR	Células T activadas autólogas para tumor EGFR positivo	Fase I	Cánceres de colon y páncreas
rM28 (University Hospital Tübingen)	scFv en tandem	CD28, MAPA	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase II	Melanoma metastásico
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3, péptido MHC	Redireccionamiento de células T al tumor	Fase I/II	Melanoma metastásico
DT2219ARL (NCI, University of Minnesota)	2 scFv vinculados a la toxina diftérica	CD19, CD22	Orientación de la toxina proteica al tumor	Fase I	Leucemia o linfoma de células B
XmAb5871 (Xencor)	BsAb	CD19, CD32b			

Nombre (otros nombres, organizaciones patrocinadoras)	formato BsAb	Objetivos	Mecanismos de acción propuestos	Etapas de desarrollo	Enfermedades (o voluntarios sanos)
NI-1701 (NovImmune)	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (Merrimack)	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (Merrimack)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (Merus)	BsAb	HER2, HER3			
NA (Merus)	BsAb	CD3, CLEC12A			
NA (Merus)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (Merus)	BsAb	PD1, no divulgado			
NA (Merus)	BsAb	CD3, no divulgado			
Duligotuzumab (MEHD7945A, Genentech, Roche)	DAF	EGFR, HER3	Bloqueo de 2 receptores, ADCC	Fase I y II Fase II	Cáncer de cabeza y cuello Cáncer colorrectal
LY3164530 (Eli Lilly)	No divulgado	RFCE, MET	Bloqueo de 2 receptores	Fase I	Cáncer avanzado o metastásico
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	cuerpo HSA	HER2, HER3	Bloqueo de 2 receptores	Fase II Fase I	Cáncer gástrico y esofágico Cáncer de mama
MM-141, (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	Bloqueo de 2 receptores	Fase I	Tumores sólidos avanzados
RG7221 (RO5520985, Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Bloqueo de proangiogénicos	2 Fase I	Tumores sólidos
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Bloqueo de proangiogénicos	2 Fase I	AMD húmeda
OMP-305B83 (OncoMed)	BsAb	DLL4/VEGF			
TF2 (Immunomedics)	Dock and lock	CEA, HSG	Predirecccionamiento del tumor para PET o radioimagen	Fase II	Cáncer colorrectal, de mama y de pulmón
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias	Fase II	Osteoartritis
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	FNT, IL-17A	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias	Fase II	Artritis Reumatoide
COVA322	IgG-fynomeric	TNF, IL17A	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias	Fase I/II	Soriasis en placas
SAR156597 (Sanofi)	IgG en tandem biespecífico tetravalente	IL-13, IL-4	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias	Fase I	Fibrosis pulmonar idiopática
GSK2434735 (GSK)	Dominio de orientación dual	IL-13, IL-4	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias	Fase I	(Voluntarios sanos)

Nombre (otros nombres, organizaciones patrocinadoras)	formato BsAb	Objetivos	Mecanismos de acción propuestos	Etapas de desarrollo	Enfermedades (o voluntarios sanos)
Ozoralizumab (ATN103, Ablynx)	nanocuerpo	TNF, HSA	Bloqueo de citoquinas proinflamatorias, se une a HSA para aumentar la vida media	Fase II	Artritis Reumatoide
ALX-0761 (Merck Serono, Ablynx)	nanocuerpo	IL-17A/F, HSA	Bloqueo de 2 citoquinas proinflamatorias, se une a HSA para aumentar la vida media	Fase I	(Voluntarios sanos)
ALX-0061 (AbbVie, Ablynx;	nanocuerpo	IL-6R, HSA	Bloqueo de citoquinas proinflamatorias, se une a HSA para aumentar la vida media	Fase I/II	Artritis Reumatoide
ALX-0141 (Ablynx, Eddingpharm)	nanocuerpo	RANKL, HSA	Bloqueo de la resorción ósea, se une a HSA para aumentar la vida media	Fase I	Pérdida ósea posmenopáusica
RG6013/ACE910 (Chugai, Roche)	ART-Ig	Factor IXa, factor X	coagulación plasmática	Fase II	Hemofilia

En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto difiere de un polipéptido de la Tabla 2 o 3 en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 residuos de aminoácidos. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto difiere de un polipéptido de la Tabla 2 o 3 en no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9%, 10% o 15% de sus residuos de aminoácidos.

5 En una realización, no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto es una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, o un híbrido de las mismas. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto es una molécula de ácido nucleico de origami, por ejemplo, un ADN de origami, en donde la molécula de ácido nucleico tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria predeterminada. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico de origami tiene actividad funcional. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el producto comprende una molécula de ácido nucleico de origami encapsulada en una membrana lipídica. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la membrana lipídica comprende la membrana celular o los componentes de la membrana celular de la célula huésped a partir de la cual se produjo. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el ADN encapsulado en lípidos es como se describe en "Cloaked DNA nanodevices survive pilot mission", 22 de abril de 2014, sitio web del Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering en la Universidad de Harvard.

10 Otros productos recombinantes incluyen andamios sin anticuerpos o andamios proteicos alternativos, tales como, entre otros: DARPin, affibodies y adnectins.

15 Otros productos terapéuticas o de diagnóstico ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cualquier proteína descrita en las Tablas 1-10 de Leader et al., "Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification", Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7:21-39 y como se describe en Walsh, "Biopharmaceutical benchmarks 2014", Nature Biotechnology, 2014, 32:992-1000; o cualquier conjugado, variante, análogo o fragmento funcional de los polipéptidos recombinantes descritos en el presente documento.

ÁCIDOS NUCLEICOS

20 También se describen aquí, pero fuera del objeto de las reivindicaciones, los ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos exógenos, que codifican los moduladores del metabolismo de lípidos y los productos recombinantes descritos aquí. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el LMM deseado o el producto recombinante, p. ej., polipéptidos recombinantes, se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan la secuencia de ácido nucleico deseada, p. ej., gen, derivando la secuencia de ácido nucleico de un vector que se sabe que incluye la misma, o aislando directamente de células y tejidos que la contienen, usando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el LMM o el polipéptido recombinante se puede producir sintéticamente, en lugar de clonarlo. Las técnicas y la tecnología del ADN recombinante son muy avanzadas y están bien establecidas en la técnica. En consecuencia, el experto en la materia que tenga conocimiento de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido recombinante descrito en el presente documento puede visualizar o generar fácilmente la secuencia de ácido nucleico que codificaría el LMM o el polipéptido recombinante.

Las secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican LMM SREBF 1 y SCD1 se proporcionan como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, en este documento.

La expresión de un polipéptido deseado, p. ej., un LMM o un polipéptido recombinante, normalmente se logra uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado o porciones del mismo a un promotor, e incorporando el constructo en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en células eucariotas o procariotas. Los vectores de clonación típicos contienen otros elementos reguladores, como terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación, promotores, marcadores de selección o etiquetas útiles para la regulación o identificación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

10 La secuencia de ácido nucleico que codifica el LMM o el polipéptido recombinante se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero no se limita a, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación. El vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasas de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables (p. ej., WO 01/96584; WO 01/29058; y Pat. U.S.No. 6,326,193). Los vectores derivados de virus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas.

15 Un vector también puede incluir uno o más de los siguientes: una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación, un terminador de la transcripción (p. ej., del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la replicación en procariotas (p. ej. origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica), y/o elementos para permitir la selección, p. ej., un marcador de selección o un gen informador.

20 25 30 35 40 El vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, por ejemplo, un LMM o un polipéptido recombinante, puede comprender además una secuencia promotora responsable del reclutamiento de la polimerasa para permitir el inicio de la transcripción para la expresión del polipéptido, por ejemplo, el LMM o el polipéptido recombinante. Las secuencias promotoras adecuadas para los métodos descritos en el presente documento se asocian normalmente con potenciadores para impulsar grandes cantidades de transcripción y, por lo tanto, suministrar grandes copias del ARNm exógeno diana. El promotor puede comprender promotores tempranos inmediatos principales de citomegalovirus (CMV) (Xia, Bringmann et al. 2006) y el promotor SV40 (Chernajovsky, Mory et al. 1984), ambos derivados de sus virus homónimos o promotores derivados de los mismos. Se han empleado con éxito varios otros promotores virales menos comunes para impulsar la transcripción al incluirlos en un vector de expresión en células de mamíferos, incluidos Repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR) y virus de *Leucemia murina de Moloney* (MoMLV) LTR (Papadakis, Nicklin et al. 2004). También se pueden utilizar promotores de mamíferos endógenos específicos para impulsar la transcripción constitutiva de un gen de interés (Pontiller, Gross et al. 2008). El promotor del factor de elongación 1-alfa (CHEF1 α) de hámster chino específico de CHO ha proporcionado una alternativa de alto rendimiento a las secuencias basadas en virus (Deer, Allison 2004).

45 50 55 También se conocen en la técnica otros promotores adecuados para la expresión en células que no son de mamíferos, por ejemplo, células de hongos, insectos y plantas. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped fúngica o de levadura incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos de los genes fúngicos de *trichoderma reesei*, alcohol oxidasa inducible por metanol (promotor AOX), biosíntesis de triptófano *Aspergillus nidulans* (promotor trpC), *Aspergillus niger* var. *awamori* flucoamilasa (glaA), *Saccharomyces cerevisiae* galactoquinasa (GAL1), *Kluyveromyces lactis* promotor Plac4-PBI, o los descritos en PCT Publication WO 2005/100573. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula de insecto incluyen, pero no se limitan a, el promotor T7 lac y el promotor de polihedrina. Un ejemplo de un promotor adecuado para dirigir la transcripción en una célula vegetal incluye, pero no se limita a, el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico en una célula huésped procariótica, por ejemplo, una célula bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, el promotor tac de *E. coli* (promotor híbrido, DeBoer y otros, PNAS, 1983, 80:21-25), *E. coli* rec A, *E. coli* araBAD, *E. coli* tetA, y beta-lactamasa procariótica. Otros ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores virales, tales como promotores de bacteriófagos, incluidos un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, un promotor M13 y un promotor SP6.

60 Además de los promotores, los vectores descritos en el presente documento pueden comprender además una región potenciadora como se describe anteriormente; una región de motivo de nucleótidos específica, próxima al promotor central, que puede reclutar factores de transcripción para sobreregular la tasa de transcripción (Riethoven 2010). Al igual que las secuencias promotoras, estas regiones a menudo se derivan de virus y están incluidas dentro de la secuencia promotora, como secuencias potenciadoras de hCMV y SV40, o pueden incluirse adicionalmente, como secuencias derivadas de adenovirus (Gaillet, Gilbert et al. 2007).

El vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, por ejemplo, un LMM o un producto recombinante, descrito en el presente documento puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección. El marcador seleccionable puede comprender glutamina sintetasa (GS); dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo, una enzima que confiere resistencia al metotrexato (MTX); o un marcador antibiótico, por ejemplo, una enzima que confiere resistencia a un antibiótico tal como: higromicina, neomicina (G418), zeocina, puromicina o blasticidina.

5 El vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto recombinante descrito en este documento puede comprender un marcador de selección que es útil para identificar una célula o células que contienen el ácido nucleico que codifica un producto recombinante descrito en este documento. El marcador de selección es útil para identificar o seleccionar una célula o células que contienen la integración de la secuencia de ácido nucleico que codifica el producto recombinante en el genoma, como se describe en el presente documento. La identificación de una célula o células que han integrado la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante puede ser útil para la selección y la ingeniería de una célula o línea celular que exprese de forma estable el producto.

10 15 El vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un LMM descrito en el presente documento puede comprender un mecanismo para la integración específica del sitio de la secuencia de ácido nucleico que codifica el LMM. Por ejemplo, el vector es compatible con el Flp-In™ y comprende dos sitios FRT (que comprenden una secuencia de nucleótidos específica) que, en presencia de la recombinasa Flp, dirige la recombinación y la posterior integración de la secuencia deseada, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el LMM, en el sitio deseado, por ejemplo, entre los dos sitios FRT, presentes en el genoma de una célula Flp-In, por ejemplo, una célula 20 CHO Flp-In. En la técnica se conocen otros sistemas utilizados para la integración específica de sitio de ácidos nucleicos que codifican un producto deseado, por ejemplo, el sistema de recombinasa Cre-lox o estrategias mediadas por CRISPR/CAS.

25 Los vectores adecuados para su uso están disponibles comercialmente e incluyen vectores asociados con el sistema de expresión GS™, GS Xceed™ Sistema de Expresión Génica, o Potelligent® Tecnología CHOK1SV disponible de Lonza Biologics, Inc, por ejemplo, vectores pCon. Los vectores adicionales incluyen, pero no se limitan a, otros vectores comercialmente disponibles, como pcDNA3.1/Zeo, pcDNA3.1/CAT, pcDNA3.3TOPO (Thermo Fisher, anteriormente Invitrogen); pTarget, HaloTag (Promega); pUC57 (GenScript); pFLAG-CMV (Sigma-Aldrich); pCMV6 (Origen); o pBK-CMV/pCMV-3Tag-7/pCMV-Tag2B (Stratagene).

CÉLULAS Y CULTIVO CELULAR

30 La presente descripción se refiere a métodos y composiciones para diseñar o fabricar una célula o línea celular que produce un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante como se describe en el presente documento. La presente descripción también se refiere a métodos y composiciones para la ingeniería o la fabricación de una célula o línea celular con productividad y calidad del producto mejoradas, por ejemplo aumentadas. Las características asociadas con la mejora de la productividad y la calidad del producto se describen aquí, por ejemplo, en la sección titulada "Modulación del metabolismo de los lípidos".

35 40 En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, la célula es una célula no mamífera, por ejemplo, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula vegetal, una célula de arquea, por ejemplo, una célula de una especie de *arqueas*, o una célula bacteriana. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es de perro, pato, caballo, loro, hurón, pez o gato. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es una célula animal. De acuerdo con el método de la invención, la célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana o una célula de roedor, por ejemplo, una célula de hámster, una célula de ratón o una célula de rata.

45 En una realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una realización, la célula es CHO-K1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, Exceed (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN o una Célula derivada de CHO. La célula con eliminación de CHO FUT8 es, por ejemplo, el Potelligent® CHOK1 SV (Lonza Biologics, Inc.).

50 55 En otra realización del método de la invención, la célula es HeLa, HEK293, HT1080, H9, HepG2, MCF7, Jurkat, NIH3T3, PC12, PER.C6, BHK (célula de riñón de hámster bebé), VERO, SP2/0, NS0, YB2/0, Y0, EB66, C127, células L, COS, p. ej., COS1 y COS7, QC1-3, CHO-K1, CHOK1SV, Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO), CHO GS-KO, Exceed (CHOK1SV GS-KO), CHO-S, CHO DG44, CHO DXB11, CHOZN o una célula derivada de CHO, o cualquier célula derivada de las mismas. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es una célula madre. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es una forma diferenciada de cualquiera de las células descritas en el presente documento. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es una célula derivada de cualquier célula primaria en cultivo.

60 65 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es cualquiera de las células descritas en el presente documento que produce un producto, por ejemplo, un producto como se describe en el presente documento. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula es cualquiera de las células descritas en el presente documento que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido

recombinante, por ejemplo, expresa un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido recombinante seleccionado de la Tabla 2 o 3.

En una realización, el cultivo celular se lleva a cabo como un cultivo por lotes, un cultivo por lotes alimentados, un cultivo de extracción y llenado o un cultivo continuo. En una realización, el cultivo celular es un cultivo adherente. En una realización, el cultivo celular es un cultivo en suspensión. En una realización, la célula o cultivo celular se coloca *in vivo* para la expresión del polipéptido recombinante, por ejemplo, colocado en un organismo modelo o un sujeto humano.

En una realización, el medio de cultivo está libre de suero.

Otros medios y métodos de cultivo adecuados para líneas celulares de mamíferos son bien conocidos en la técnica, como se describe en la Pat. U.S. No. 5,633,162 por ejemplo. Ejemplos de medios de cultivo celular estándar para matraces de laboratorio o cultivos celulares de baja densidad y que se adaptan a las necesidades de tipos de células particulares son, por ejemplo: medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Morre, G., The Journal of the American Medical Association, 199, p. 519 f. 1967), medio L-15 (Leibovitz, A. et al., Amer. J. de Higiene, 78, 1p. 173 ss., 1963), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio F12 de Ham (Jamón, R. et al., Proc. nacional Academia Sc.53, p288 ss. 1965) o DMEM modificado de Iscoves sin albúmina, transferrina y lecitina (Iscoves et al., J. Exp. Med 1, pág. 923 y ss., 1978). Por ejemplo, los medios F10 o F12 de Ham se diseñaron especialmente para el cultivo de células CHO. Otros medios especialmente adaptados al cultivo de células CHO se describen en EP-481 791. El experto en la materia conoce otros métodos de cultivo adecuados y pueden depender del producto de polipéptido recombinante y de la célula huésped utilizada. Está dentro de la experiencia de un experto en la materia determinar u optimizar las condiciones adecuadas para la expresión y producción del producto, por ejemplo, el polipéptido recombinante, para ser expresado por la célula.

MÉTODOS PARA INGENIERÍA DE UNA CÉLULA Y PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para diseñar una célula o línea celular con productividad mejorada y calidad de producto mejorada. Una célula se modifica de manera que se modula el metabolismo de los lípidos de la célula. Por ejemplo, se introduce en la célula un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM. La célula se cultiva posteriormente en condiciones adecuadas para la expresión de LMM y la modulación del metabolismo de lípidos mediada por LMM. Las características de una célula que tiene modulado su metabolismo de lípidos se describen aquí, por ejemplo, en la sección titulada "Modulación del metabolismo de lípidos".

Como se define en las reivindicaciones, la célula comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido recombinante. En una realización, la célula comprende además un ácido nucleico exógeno que aumenta la expresión de un producto endógeno. En cualquiera de dichas realizaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica un producto o aumenta la expresión de un producto endógeno se introduce antes de la modificación del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, la introducción de un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM descrito en el presente documento. Alternativamente, en otras realizaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica un producto o aumenta la expresión de un producto endógeno se introduce después de la modificación del metabolismo de los lípidos. En cualquiera de las realizaciones, el producto es una proteína terapéutica o de diagnóstico.

Los métodos para modificar o manipular genéticamente una célula para expresar un polipéptido o una proteína deseada, por ejemplo, un LMM descrito en este documento o un producto descrito en este documento, son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, transfección, transducción (p. ej., transducción viral) o electroporación.

Los métodos físicos para introducir un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico exógeno o un vector descrito en el presente documento, en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 - 4, Cold Spring Harbor Press, NY).

Los medios químicos para introducir un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico exógeno o un vector descrito en el presente documento, en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluidas emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (p. ej., una vesícula de membrana artificial). Están disponibles otros métodos de administración dirigida de ácidos nucleicos de última generación, como la administración de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de administración de tamaño submicrónico adecuado.

Los ácidos nucleicos que contienen la secuencia de un polipéptido deseado, por ejemplo, un LMM y/o el producto descrito en el presente documento, se administran a una célula y pueden integrarse en su genoma mediante recombinación. Las células recombinantes resultantes son entonces capaces de una expresión estable del polipéptido deseado, por ejemplo, un LMM y/o el producto descrito en el presente documento, lo que permite una producción de proteína consistente y eficiente durante largos períodos de tiempo. Varias ventajas acompañan a la integración estable de un gen de interés, incluido el hecho de que solo se requiere un único proceso de administración de ADN para inducir la expresión prolongada, ya que el gen de interés se replica simultáneamente con los cromosomas del huésped;

5 esto significa que el gen se transfiere de una generación a la siguiente sin necesidad de maquinaria adicional. Esto también, en teoría, produce un producto y un rendimiento más consistentes en las fermentaciones de lote a lote. De acuerdo con esto, los métodos de expresión estables son capaces de generar altos rendimientos de productos en comparación con los generados sin una modificación que module el metabolismo de los lípidos descrita en este documento, por ejemplo, la introducción de un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM.

10 Los protocolos para establecer líneas de células recombinantes que sobreexpresen de forma estable los polipéptidos deseados, por ejemplo, un LMM y/o el producto descrito en este documento, generalmente implican la integración de ADN linealizado (generalmente basado en plásmidos) en sitios aleatorios en el genoma huésped facilitado por recombinación aleatoria. También se han desarrollado e implementado protocolos específicos del sitio que promueven la integración de un casete de expresión en regiones específicas del genoma huésped (O'Gorman, Fox et al. 1991). Estos protocolos a menudo aprovechan las recombinasas capaces de una recombinación específica del sitio e incluyen, pero no se limitan a, al sistema Flp-In™ (p. ej., utilizando células Flp-In CHO), línea celular CHOK1SV Flp (Lonza) (como se describe en Zhang L. et al. (2015). Biotechnol. Prog. 31:1645-5), o el sistema Cre-lox.

15 Como se describió anteriormente, en algunas realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, el vector que comprende un ácido nucleico que codifica un producto y/o un LMM, comprende además un marcador de selección para facilitar la selección de células que se expresan con éxito de un grupo transfectedo (Browne, Al-Rubeai 2007). Aunque hay numerosos métodos de selección disponibles comercialmente, los más utilizados son el metotrexato (MTX) y el sistema de glutamina sintetasa (GS) de Lonza (Bebbington, Renner et al. 1992, Lai, Yang et al. 2013). La dihidrofolato reductasa (DHFR) es una proteína responsable de la conversión de ácido fólico en tetrahidrofolato y es necesaria para las rutas biosintéticas esenciales que producen glicina, purinas y ácido timidílico. El MTX se puede usar para inhibir la actividad de DHFR y, por lo tanto, se puede usar la inclusión de DHFR en un cultivo transfectedo de manera estable para seleccionar células integradas de manera estable; solo aquellas células que expresen con éxito suficiente DHFR recombinante sobrevivirán a la selección usando MTX (Cacciatore, Chasin et al. 2010). Otro método de selección comúnmente empleado es el uso de GS; una enzima responsable de la síntesis de glutamina a 20 partir de glutamato y amoníaco y, dado que la glutamina es vital para la supervivencia de las células de mamíferos, las células que carecen de suficiente GS no sobrevivirán en cultivo. Inicialmente, la adición de metionina sulfoximina (MSX), un inhibidor de GS asegura que la presencia de GS endógena en las células CHOK1SV no sea adecuada para mantener la supervivencia celular y, por lo tanto, solo las células que expresan GS adicional provocada por la 25 integración estable de un constructo recombinante sobreviven al proceso de selección. Lonza y otros ahora han establecido líneas de células huésped CHO en las que el gen GS endógeno ha sido anulado/eliminado de tal manera que perecen todas las células que no se integran con éxito con el constructo de interés sin la presencia de glutamina exógena en el medio (Fan, Kadura et al. 2012). Están disponibles muchos otros métodos de selección que provocan una resistencia a un agente de selección particular de manera que sólo las células que albergan el gen de resistencia sobrevivirán al proceso de selección; estos incluyen higromicina, neomicina, blasticidina y zeocina (Browne, Al-Rubeai 30 2007). En realizaciones no cubiertas por el objeto de las reivindicaciones, el vector que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM y el vector que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante como se describe en el presente documento, comprenden además diferentes marcadores de selección.

35 Despues de la recuperación exitosa de grupos de células que se expresan de manera estable, el aislamiento de clones individuales, que se originan a partir de una sola célula, facilita la selección de líneas celulares que son capaces de producir altos rendimientos y calidad del producto, o las líneas celulares con la mayor capacidad de alto rendimiento de producto y producto de alta calidad. Las diferencias en las propiedades celulares probablemente estén asociadas con la heterogeneidad observada en las células y tanto con el número como con los sitios de integración específicos del ADN recombinante. Por lo tanto, se han desarrollado propiedades de cribado clonal para evaluar rápidamente múltiples clones y, posteriormente, seleccionar células de alta expresión. La clasificación de células activadas por 40 fluorescencia (FACS) es un método que puede clasificar rápidamente las células en función de la intensidad de la fluorescencia y, por lo tanto, puede emplearse para seleccionar clones de alta expresión. Se han establecido varios protocolos que implican el marcado fluorescente de la proteína de interés (Powell, Weaver 1990), el marcado fluorescente de moléculas de la superficie celular coexpresadas con el gen recombinante (Holmes, Al-Rubeai 1999) y la detección de la intensidad de la fluorescencia basada en expresión eGFP coexpresada con el gen de interés (Meng, Liang et al. 2000). Una alta intensidad de fluorescencia observada con estos métodos sugiere un alto nivel de producción de proteínas recombinantes y, por lo tanto, estas células pueden seleccionarse preferentemente de un grupo de células recombinantes. Los métodos de selección basados en FACS para aislar clones recombinantes de alta expresión son más adecuados para los productos recombinantes que permanecen asociados con la célula y, dado 45 que los productos de proteínas recombinantes bioterapéuticas expresados en mamíferos son secretados, se han desarrollado métodos que son más apropiados para la selección de clones para las proteínas recombinantes secretadas. Por ejemplo, ClonePix es un método automatizado de selección de colonias que selecciona clones cultivados en un medio semisólido basado en la secreción de productos recombinantes en el medio que rodea la colonia y se asocia con fluorescina isotiocianato (FITC), creando así un halo fluorescente alrededor de las colonias (Lee, Ly et al. 2006). Los clones se seleccionan en función de la intensidad de fluorescencia del halo que rodea la colonia. Se han establecido muchos otros protocolos de selección de clones que aislan rápidamente las células recombinantes en función de las propiedades biológicas deseadas con especial interés en la productividad y se revisan 50

en Browne y Al-Rubeai (Browne, Al-Rubeai 2007). La expansión de un clon seleccionado como se describe aquí da como resultado la producción de una línea celular.

Los métodos descritos en este documento pueden producir una célula con productividad mejorada. La productividad o capacidad de producción mejorada de una célula incluye un mayor rendimiento o cantidad de producto que se produce y/o una mayor tasa de producción (determinada por el rendimiento o la cantidad de producto producido durante una unidad de tiempo). En una realización, la mejora de la productividad de una célula, por ejemplo, la capacidad para producir un producto, da como resultado un aumento de 2 veces en el nivel o la cantidad del producto producido, por ejemplo, en comparación con la cantidad, el nivel o la cantidad de producto producido por una célula que no tiene una ruta de metabolismo de lípidos modulada. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la mejora de la productividad de una célula, por ejemplo, la tasa de producción del producto, da como resultado un aumento, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de aumento; o de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces, o más de aumento, en la tasa de producción del producto, por ejemplo, en comparación con la tasa de producción del producto producido por una célula que no tiene modulada una ruta de metabolismo de lípidos.

Los métodos descritos en el presente documento para diseñar una célula producen una célula de alta producción o una línea celular de alta producción. Una célula o línea celular de alta producción es capaz de producir mayores rendimientos de un producto de polipéptido recombinante que en comparación con una célula de referencia o una célula que no ha sido seleccionada o manipulada mediante los métodos descritos en el presente documento. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una línea celular de alta producción es capaz de producir 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L o 100 g/L o más de un producto, por ejemplo, un producto de polipéptido recombinante. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, una línea celular de alta producción produce 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L o 100 g/L o más de un producto, por ejemplo, un producto de polipéptido recombinante. La cantidad de producto producido puede variar según el tipo de célula, por ejemplo, la especie, y el producto, por ejemplo, el polipéptido recombinante, que se va a expresar. A modo de ejemplo, una célula CHO de alta producción que expresa un anticuerpo monoclonal puede producir al menos 1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, o 25 g/L de un anticuerpo monoclonal.

En el presente documento se describen métodos y composiciones que pueden ser particularmente útiles para la expresión de productos que son difíciles de expresar o producir en células o sistemas libres de células utilizando los métodos convencionales actualmente conocidos en la técnica. Como tal, una línea celular de producción que produce productos tan difíciles de expresar, por ejemplo, los productos biológicos de próxima generación descritos en este documento, puede producir al menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L, 50 mg/L, 55 mg/L, 60 mg/L, 65 mg/L, 70 mg/L, 75 mg/L, 80 mg/L, 85 mg/L, 90 mg/L, 95 mg/L o 100 mg/L o más. La capacidad de producción (p. ej., rendimiento, monto o cantidad de producto o tasa de producción de producto) lograda por los métodos y composiciones descritos en este documento para proteínas difíciles de expresar se puede aumentar en un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más, o 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces o más, en comparación con la capacidad de producción de una célula o sistema que no tiene una modificación que module el metabolismo de los lípidos como se describe en el presente documento.

Los ensayos para cuantificar la cantidad, el nivel o la cantidad de producto producido o secretado, por ejemplo, secretado en los medios de cultivo, incluyen ensayos de cuantificación de proteínas, como el ensayo de proteínas de Bradford, análisis SDS-PAGE, inmunotransferencia, por ejemplo, transferencia Western y medios automatizados, por ejemplo, usar un dispositivo nanodrop. Otros métodos para medir el aumento de la producción de proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un aumento en la producción de proteínas recombinantes podría determinarse a pequeña escala midiendo la concentración en medio de cultivo de tejidos mediante ELISA (Smales et al. 2004 Biotechnology Bioengineering 88:474-488). También se puede determinar cuantitativamente con ForteBio Octet, por ejemplo, para la determinación de alto rendimiento de la concentración de anticuerpos monoclonales recombinantes (mAb) en medio (Mason et al. 2012 Biotechnology Progress 28: 846-855) o a mayor escala por proteína A HPLC (Stansfield et al. 2007 Biotechnology Bioengineering 97:410-424). Otros métodos para determinar la producción de un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante descrito en este documento, pueden referirse a la tasa de producción específica (qP) del producto, en particular, el polipéptido recombinante en la célula y/o a una integral de tiempo de concentración de células viables (CIV). En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el método para determinar la producción incluye la combinación de determinación de qP e IVC. La producción o productividad del polipéptido recombinante, definida como la concentración del polipéptido en el medio de cultivo, es función de estos dos parámetros (qP y IVC), calculados según Porter et al. (Porter et al. 2010 Biotechnology Progress 26: 1446-1455). Los métodos para medir la producción de proteínas también se describen con mayor detalle en los ejemplos proporcionados en este documento.

Los métodos descritos en este documento pueden producir una célula con una calidad de producto mejorada. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la mejora de la calidad del producto da como resultado el aumento, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, o más, aumento en la calidad del producto; o de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces, o más de aumento en la calidad del producto, por ejemplo, en comparación con la cantidad, el nivel o la cantidad de producto producido por una célula que no tiene modulada una ruta de metabolismo de lípidos. Dichos aumentos en la calidad del producto se pueden ejemplificar, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes:

- 5 10 i) un aumento en el monto o cantidad de producto no agregado (o una disminución en el monto o cantidad de producto agregado);
- ii) un aumento en el monto o cantidad de producto debidamente doblado o ensamblado (o una disminución en el monto o cantidad de producto mal doblado, desplegado, parcialmente ensamblado o no ensamblado), o un aumento en la proporción de producto debidamente doblado o ensamblado producto a producto desplegado, mal plegado, parcialmente ensamblado o sin ensamblar;
- 15 iii) un aumento en el monto o cantidad de producto completo (o una disminución en la fragmentación del producto);
- iv) un aumento en las modificaciones postraduccionales deseadas (o una disminución en el producto no modificado o modificado incorrectamente);
- v) un aumento o disminución de la heterogeneidad de los glicanos (p. ej., para productos glicosilados);
- 20 vi) un aumento en el monto o cantidad de producto funcional (o una disminución en el monto o cantidad de un producto no funcional o disfuncional), o un aumento en la relación de función a producto no funcional o disfuncional; y/o
- vii) un aumento o disminución de la codificación de enlaces disulfuro (p. ej., un aumento o disminución de la isoforma o estructura deseada como resultado del aumento o disminución de la codificación de enlaces disulfuro, p. ej., para productos de moléculas de anticuerpos).

25 Los métodos para medir la calidad del producto, por ejemplo, la mejora de la calidad del producto, de una célula o línea celular generada como se describe en este documento, son conocidos en la técnica. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, se conocen en la técnica métodos para determinar la fidelidad de la secuencia primaria del producto polipeptídico recombinante expresado, por ejemplo, espectrometría de masas. Se puede determinar un aumento en la cantidad o concentración del producto debidamente plegado, por ejemplo, polipéptido recombinante expresado, mediante dicroísmo circular o evaluando la fluorescencia intrínseca del polipéptido recombinante expresado. Un aumento en la cantidad o concentración de producto funcional puede probarse usando varios ensayos funcionales dependiendo de la identidad del producto recombinante, por ejemplo, polipéptido recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos pueden analizarse mediante ELISA u otro ensayo de inmunoafinidad. Otros métodos para determinar un aumento en la calidad del producto, por ejemplo, determinación 30 de agregación, modificaciones postraduccionales, codificación de enlaces disulfuro, pueden evaluarse mediante métodos de cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución, enfoques de dispersión 35 de luz dinámica (DLS) y electroforesis de proteínas (PAGE).

40 En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, los métodos para producir un producto, por ejemplo, como se describe en el presente documento, comprenden proporcionar una célula diseñada para comprender una modificación que modula el metabolismo de los lípidos, como se describe anteriormente. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, la célula que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante como se describe en el presente documento. En una realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante 45 descrito en el presente documento, se introduce en la célula manipulada que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. En otra realización no cubierta por el objeto de las reivindicaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante descrito en el presente documento, se introduce en una célula antes de la introducción de un ácido nucleico exógeno que codifica un LMM como se describe 50 en el presente documento. El ácido nucleico exógeno que codifica un producto comprende además un marcador de selección, para la selección eficiente de células que expresan de manera estable, por ejemplo, sobreexpresan, el producto como se describe en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, se pueden realizar etapas adicionales para mejorar la expresión del producto, por ejemplo, transcripción, traducción y/o secreción del producto, o la calidad del producto, por ejemplo, plegamiento adecuado y/o fidelidad de la secuencia primaria. Dichas etapas adicionales incluyen la introducción de un agente que mejora la expresión del producto o la calidad del producto. En una realización, un agente que mejora la expresión del producto o la calidad del producto puede ser una molécula pequeña, un polipéptido o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que mejora el plegamiento de proteínas, por ejemplo, una proteína chaperona. En una realización, el agente que ayuda en el plegamiento de proteínas comprende un ácido nucleico que codifica una proteína chaperona,

por ejemplo, BiP, PD1 o ERO1 (Chakravarthi & Bulleid 2004; Borth et al. 2005; Davis et al. 2000). Otras etapas adicionales para mejorar el rendimiento y la calidad del producto incluyen la sobreexpresión de factores de transcripción como XBP1 y ATF6 (Tigges & Fussenerger 2006; Cain et al. 2013; Ku et al. 2008) y de proteínas chaperonas de unión a lectina como calnexina y calreticulina. (Chung et al. 2004). La sobreexpresión de los agentes 5 que ayudan o mejoran el plegamiento de proteínas, la calidad del producto y el rendimiento del producto descritos en el presente documento se puede lograr mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos que codifican el agente. En otra realización, el agente que mejora la expresión del producto o la calidad del producto es una molécula pequeña 10 que se puede agregar al cultivo celular para aumentar la expresión del producto o la calidad del producto, por ejemplo, DMSO. En una realización, cultivar las células a una temperatura más baja, por ejemplo, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10°C más bajo que la temperatura a la que normalmente se cultivan las células puede mejorar 15 la productividad.

Cualquiera de los métodos descritos aquí puede incluir además etapas de selección adicionales para identificar células 15 que tienen alta productividad o producen productos de alta calidad. Por ejemplo, la selección FACS se puede utilizar para seleccionar células específicas con las características deseadas, por ejemplo, mayor expresión de una proteína que se pliega, por ejemplo, chaperonas.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos que incluyen una etapa para recuperar o recobrar el producto de 20 polipéptido recombinante. En realizaciones donde el polipéptido recombinante es secretado por la célula, los métodos pueden incluir una etapa para recuperar, recolectar o separar el polipéptido recombinante de la célula, la población celular o el medio de cultivo en donde se cultivaron las células. En realizaciones donde el polipéptido recombinante 25 está dentro de la célula, la purificación del producto polipeptídico recombinante comprende la separación del polipéptido recombinante producido por la célula de uno o más de cualquiera de los siguientes: proteínas de la célula huésped, ácidos nucleicos de la célula huésped, lípidos de la célula huésped, y/u otros desechos de la célula huésped.

En realizaciones, el proceso descrito en este documento proporciona un producto proteico sustancialmente puro. 30 Como se usa aquí, "sustancialmente puro" significa sustancialmente libre de materiales pirógenos, sustancialmente libre de ácidos nucleicos y/o sustancialmente libre de proteínas celulares endógenas, enzimas y componentes de la célula huésped, tales como polimerasas, proteínas ribosómicas y proteínas chaperonas. Un producto de proteína sustancialmente pura contiene, por ejemplo, menos del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de proteína, ácido nucleico u otra macromolécula endógena contaminante de la célula huésped.

35 Los métodos para recuperar y purificar un producto, por ejemplo, un polipéptido recombinante, están bien establecidos en la técnica. Para recuperar el producto de polipéptido recombinante, se usa un método físico o químico o físico-químico. El método físico o químico o físico-químico puede ser un método de filtración, un método de centrifugación, un método de ultracentrifugación, un método de extracción, un método de liofilización, un método de precipitación, un método de cromatografía o una combinación de dos o más métodos de los mismos. En una realización, el método de cromatografía comprende uno o más de cromatografía de exclusión por tamaño (o filtración en gel), cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de afinidad, 40 cromatografía de interacción hidrofóbica y/o cromatografía multimodal.

EJEMPLOS

La invención se describe más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

45 Sin más descripción, se cree que un experto normal en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente varios aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1: Generación de células estables que sobreexpresan un modulador del metabolismo de lípidos

50 Con el fin de investigar el efecto de la sobreexpresión de dos moduladores del metabolismo de los lípidos, SCD1 y SREBF1, en células CHO, estos genes se clonaron con éxito y se integraron de manera estable en células CHO Flp-In adherentes utilizando un enfoque dirigido al sitio y células CHO con eliminación de GS en suspensión (GSKO) utilizando un enfoque de integración aleatoria.

Clonación molecular de SCD1 y SREBF1 que contienen vectores FRT

55 La clonación molecular se llevó a cabo para generar vectores basados en FRT que facilitan la expresión de las proteínas SCD1 y SREBF1 con y sin una etiqueta V5/His en el C-terminal de cada proteína. El uso de estos vectores, junto con el grupo de células CHO huésped Flp-In comercialmente disponible de Thermo Fisher, permitió la integración específica del sitio de los genes de interés para generar grupos de células adherentes a CHO estables. Los cebadores descritos en la Tabla 4 se usaron en un Phusion® Reacción de PCR basada en polimerasa para amplificar estos genes, de modo que se produjeron fragmentos de ADN de doble cadena flanqueados por los sitios de restricción que también se detallan en la Tabla 4. Los genes SCD1 y SREBF1 se amplificaron a partir de ADNc derivado de P19 de ratón y del clon de ADNc de ratón Origene (Nº de acceso de NCBI NM_011480), respectivamente.

Después de la amplificación exitosa de los genes diana, se realizaron digestiones de doble restricción en vectores FRT-V5, así como en los productos de PCR generados previamente de los genes de interés utilizando las enzimas de restricción apropiadas. Las ligaciones se incubaron durante la noche antes de las transformaciones posteriores y se llevó a cabo la purificación miniprep en las colonias resultantes.

5 **Generación de SCD1 y SREBF1 que sobreexpresan células CHO Flp-In adherentes**

Los constructos basados en FRT antes mencionados se usaron junto con las células CHO Flp-In adherentes disponibles comercialmente de Thermo Fisher para generar grupos de células estables. Los vectores FRT que contenían los genes de interés y un constructo FRT vacío (usado para generar un grupo de células de control) se cotransfectaron con recombinasa que contenía el vector pOG44 en células Flp-In. Los sitios de recombinasa presentes en los vectores FRT y el genoma Flp-In CHO inician la recombinación específica del sitio y los clones exitosos pueden aislarse usando higromicina como agente de selección. Se generaron conjuntos de células adherentes de CHO recombinantes que expresan de manera estable de una manera específica del sitio de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por ejemplo, como se describe en el manual Flp-In de Thermo Fisher, por ejemplo, disponible en el sitio web de referencias y protocolos de Thermo Fisher. Este método se usó para generar y recuperar grupos de células policlonales de control, SCD1-V5 y SREBF1-V5 Flp-In CHO.

Clonación molecular de SCD1 y SREBF1 en vectores pcDNA3.1

Se generaron vectores de expresión para integrar de manera estable y, por lo tanto, sobreexpresar, en células en suspensión CHO industrialmente relevantes con uno de SCD1, SREBF1 o un gen SREBF1 truncado. El vector pcDNA3.1V5-His/TOPO consiste en un promotor de CMV apropiado y un sitio de clonación múltiple corriente abajo, lo que facilita la expresión del gen de interés, al tiempo que incluye elementos que permiten la expresión de un gen de neomicina que se puede utilizar para la selección de clones exitosos después de la integración de ADN en el genoma.

Inicialmente, el protocolo de PCR Phusion® se usó para amplificar SCD1, SREBF1 y un truncamiento de SREBF1 usando los cebadores indicados en la Tabla 4, diseñados para que los sitios de restricción se agregaran simultáneamente a los costados de los productos de PCR resultantes. El vector SCD1-FRT generado previamente se usó como plantilla para amplificar los genes SCD1, mientras que el ADNc de ratón Origene (NCBI número de acceso NM_011480) se usó para amplificar el gen SREBF1 y su truncamiento. El truncamiento de SREBF1, denominado en este documento SREB410, codifica una secuencia polipeptídica de 410 aminoácidos de longitud, que incluye el dominio hélice-bucle-hélice (HLH) de SREBF1. Este dominio se escinde endógenamente de la proteína de longitud completa, lo que permite la migración de este fragmento al núcleo y la posterior activación de la transcripción del gen, como se describió anteriormente. Se diseñaron cebadores para amplificar esta región con el objetivo de expresar una proteína (codificada por esta secuencia) que se localiza directamente en el núcleo y así llevar a cabo su función como activador transcripcional sin necesidad de procesamiento endógeno.

Se llevaron a cabo digestiones de doble restricción en productos de PCR purificados según corresponda (véase la Tabla 4) y pcDNA3.1/V5-His/TOPO, donde los cebadores amplificaron un gen sin codón de parada, para permitir la lectura en una secuencia marco que codifica una etiqueta V5 y His. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron para producir vectores que contenían los genes SCD1, SREBF1 o SREB410 con una etiqueta V5-His. Estas reacciones se transformaron y se llevaron a cabo minipreparaciones en varias de las colonias resultantes. Se llevaron a cabo digestiones de restricción y los fragmentos de ADN resultantes se ejecutaron en un gel de agarosa para determinar qué muestras tuvieron éxito.

Generación de células CHO GS-KO en suspensión que sobreexpresan SCD1 y SREBF1

Se generaron conjuntos de células de suspensión CHOK1SV GS-KO cultivadas en medios químicamente definidos, libres de proteínas y suero, transfectados de manera estable con los constructos derivados de pcDNA3.1V5-His/TOPO sintetizadas previamente para investigar el efecto de la expresión constitutiva de los genes insertados en una línea celular industrialmente relevante. Para lograr esto, se llevó a cabo una integración estable utilizando la línea de células huésped CHOK1SV GS-KO de Lonza. Inicialmente, los constructos SCD1-V5, SREBF1-V5, SREB410-V5 y control (pcDNA3.1V5-His/TOPO vacío) se linealizaron mediante digestión durante la noche con la enzima de restricción PvuI (NEB). Despues de la linealización, el ADN se purificó mediante precipitación con etanol y las células CHOK1SV GS-KO se electroporaron utilizando 20 µg de ADN y 1×10^7 células viables antes de la transferencia inmediata a matraces T75 que contienen medio CD-CHO (Thermo Fisher) a 37 °C para obtener un volumen final de 20 ml. Los matraces se colocaron en una incubadora estática humidificada a 37°C con un 5% de CO₂ en atmósfera de aire durante 24 horas. Se diluyó una reserva concentrada del agente de selección G418 (Melford) en medio CD-CHO y se añadieron 5 ml de esta reserva a los matraces T75 y se mezcló suavemente para producir una concentración final de 750 µg/ml en un volumen total de 25 ml. Se realizaron recuentos de células cada 3-4 días para determinar el crecimiento y la viabilidad del cultivo y se renovaron 750 µg/ml de G418 en medio CD-CHO aproximadamente cada 6 días mediante centrifugación y resuspensión. Las células se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 ml y se estableció un cultivo celular en suspensión de rutina una vez que las células alcanzaron una concentración de 2×10^5 células viables/mL.

Tabla 4: Compendio de secuencias de cebador

Nombre de cebador	Secuencia de cebador (5'-3')	Sitios de Restricción	SEQ ID NO:
eGFP SV40 For	TAT GCTAGC GGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	<u>NheI</u> , <u>KpnI</u> *	5
SREBF1 For FRT	TAT GGTACC ATGGACGAGCT	<u>KpnI</u>	6
SREBF1 Rev FRT	ATA GGGCCC TTAGCTGGAA	<u>Apal</u>	7
SREBF1 V5 For FRT	TAT GCGGGCGC ATGGACGAG	<u>NotI</u>	8
SREBF1 V5 Rev	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	<u>Apal</u>	9
SCD1 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	<u>KpnI</u>	10
SCD1 Rev FRT	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	<u>Xhol</u>	11
SCD1 V5 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	<u>KpnI</u>	12
SCD1 V5 Rev FRT	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	<u>Xhol</u>	13
SREBF1 For 3.1	TAT GCGGGCGC ATGGACGAG	<u>NotI</u>	14
SREBF1 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTAGCTGGAAGTGACGGTGGTCC	<u>XbaI</u>	15
SREBF1 V5 For 3.1	TAT GCGGGCGC ATGGACGAG	<u>NotI</u>	16
SREBF1 V5 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTGCTGGAAGTGACGGTGGTCC	<u>XbaI</u>	17
SREB410 For 3.1	TAT GCGGGCGC ATGGACGAG	<u>NotI</u>	18
SREB410 Rev 3.1	ATA TCTAGA TCACATGCCCTCCATAGACACATCTGTG	<u>XbaI</u>	19
SREB410 V5 For	TAT GCGGGCGC ATGGACGAG	<u>NotI</u>	20
SREB410 V5 Rev	ATA TCTAGA CTGCTGGAAGTGACGGTGGTCC	<u>XbaI</u>	21
SCD1 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	<u>KpnI</u>	22
SCD1 Rev 3.1	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	<u>Xhol</u>	23
SCD1 V5 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	<u>KpnI</u>	24
SCD1 V5 Rev 3.1	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	<u>Xhol</u>	25

Ejemplo 2: Análisis de expresión de LMM en células estables que sobreexpresan un LMM

Tras el establecimiento de grupos de células Flp-In CHO estables integrados de forma estable con un control (pcDNA5 FRT vacío), SCD1-V5 o SREBF1 V5, se llevó a cabo la inmunofluorescencia para confirmar tanto la expresión de los genes integrados exógenos estables como, además, la ubicación intracelular de las proteínas expresadas. Las líneas celulares de control, SCD1-V5 y SREBF1-V5 se sembraron a 2×10^5 células viables por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio Ham Nutrient Mix F12 suplementado con FBS al 10%. Las muestras se fijaron en metanol y se expusieron primero a anticuerpos anti-V5 (producidos en ratones- *Sigma V8012*) y sucesivamente conjugado secundario FITC anti-ratón (levantado en *cabra-Sigma F0257*). Además, las células se expusieron a tinción con DAPI (10 μ g/mL de solución de trabajo) para teñir el ADN celular resaltando así los núcleos. Las imágenes inmunofluorescentes resultantes se muestran en la Figura 1.

La presencia de las tinciones FITC en las líneas celulares SCD1-V5 y SREBF1-V5 muestra que los genes exógenos/recombinantes se expresaron con éxito y, además, la localización celular de las proteínas SCD1-V5 y SREBF1-V5 fue claramente evidente. La proteína SCD1-V5 expresada constitutivamente estaba presente y era abundante en toda la célula, y las imágenes mostraban que su localización estaba en el citoplasma y en el ER. Por el contrario, la proteína SREBF1-V5 se expresó en una cantidad mucho menor, pero se ubicó de manera muy prominente en el perinúcleo formando un anillo alrededor de los núcleos. Es importante considerar que la secuencia del epítopo V5 se agregó al extremo 3' del gen y, debido a la regulación natural de SREBF1, los dominios específicos se escinden y se reubican dentro de la célula. La región bHLH (hélice de bucle de hélice básica) madura y escindida es de particular importancia ya que es responsable de la activación transcripcional de muchos genes con implicaciones en la biosíntesis y conformación de lípidos. Debido a que esta región está codificada en el extremo 5' del gen, esta región no se detectaría al teñir la etiqueta 3' V5 y, por lo tanto, es imposible determinar si alguna de las partes escindidas expresadas constitutivamente de la proteína traducida está presente. en las células de la imagen.

Se llevó a cabo la tinción de proteínas estables etiquetadas con V5 intracelulares para determinar la presencia de SCD1-V5 y SREBF1-V5 en líneas celulares en suspensión CHOK1SV GS-KO diseñadas por ingeniería. Para adherir estas células a un cubreobjetos en una placa de 24 pocillos, primero se trataron los cubreobjetos con poli-L-lisina y las células se sembraron a 2×10^5 células por pocillo y se dejó incubar a 37 °C en un 5% de CO₂ ambiente incubadora humidificada estática durante la noche. Despues de la fijación y permeabilización del metanol, anti-V5 (producido en ratón - *Sigma V8012*) fue conjugado con anticuerpo secundario anti-ratón TRITC (producido en cabra- *T5393*). Las imágenes resultantes se muestran en la Figura 2.

Se realizaron transferencias Western usando un anticuerpo anti-V5, un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-ratón y el sistema de detección apropiado para confirmar aún más la expresión de los constructos lipídicos con la etiqueta V5. Se cargaron cantidades equivalentes de proteína total (determinadas usando el ensayo de Bradford) para SDS-PAGE seguido de transferencia Western en nitrocelulosa. Las transferencias resultantes se muestran en las Figuras 3A, 3B y 3C con la etiqueta V5 detectada solo en aquellas células que expresan el constructo SCD1. Sin embargo, los bajos niveles de expresión logrados con el constructo SREBF1 pueden explicar la falta de detección de V5 en las líneas celulares que expresan este constructo.

Ejemplo 3: Características de crecimiento de células estables que sobreexpresan un LMM

En este ejemplo, las características de crecimiento, como el recuento de células viables, el número de células y la viabilidad del cultivo, se evaluaron en dos líneas celulares diferentes diseñadas para sobreexpresar LMM, un CHO Flp-In™ y las líneas celulares CHOK1SV GS-KO (Lonza Biologics). Las líneas celulares diseñadas por LMM se generaron como se describe en el Ejemplo 1. Las líneas celulares de control se diseñaron para expresar un vector de expresión marcado con V5 vacío. Un vector de expresión que codifica eGFP se transfeció en las líneas celulares diseñadas por LMM mediante electroporación. Las electroporaciones se llevaron a cabo usando 1×10^7 células viables Flp-In CHO diseñadas con LMM o células CHOK1 SV GS-KO y 20 µg de ADN plasmídico (vector de expresión que codifica eGFP) y estas células se diluyeron hasta un volumen final de aproximadamente 20 o 32 mL en medio Ham Nutrient Mix F12. Las concentraciones de células viables se determinaron utilizando un contador de células ViCell y se registraron a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección del vector de expresión que codifica eGFP.

Los resultados de las células Flp-In™ diseñadas para expresar SCD1 y SREBF1 se muestran en la Figura 4. Las células que sobreexpresan SCD1 y SREBF1 generalmente mostraron cierto aumento en la concentración de células viables en comparación con las células de control en todos los puntos de tiempo.

Los resultados de las células CHOK1SV GS-KO diseñadas para expresar SCD1, SREBF1 y SREBF410 se muestran en las Figuras 5A y 5B. La concentración de células viables en comparación con la concentración total de células se muestra en la Figura 5A, con la concentración de células viables representada por la columna inferior y la columna completa representando el número total de células contadas. Como se muestra en la Figura 5A, la expresión de LMM (SCD1 y SREBF1) da como resultado un aumento general en el número de células viables y totales en todos los puntos de tiempo. A las 48, 72 y 96 horas, la concentración de células viables y totales fue significativamente mayor en las células modificadas con SCD1 y SREBF1. A las 96 horas, los recuentos de células viables para las células modificadas con SCD1 y SREBF1 fueron más de 1×10^6 células/mL mayor que las células de control. También se calculó la viabilidad del cultivo y se muestra en la Figura 5B. Las células modificadas por ingeniería genética con LMM generalmente mostraron un aumento en la viabilidad del cultivo en comparación con las células de control.

Ejemplo 4: aumento de la fluorescencia inducida por eGFP en células estables que sobreexpresan un LMM

En este ejemplo, la capacidad de producción para producir una proteína recombinante se evaluó en el CHO-Flp-In™ y las líneas celulares CHOK1SV GS-KO que se diseñaron para expresar LMM de manera estable, como se describe en el Ejemplo 1. Las células modificadas por ingeniería genética con LMM se transfecaron con un vector de expresión que codifica eGFP como se describe en el Ejemplo 3, y la capacidad de producción se evaluó midiendo la cantidad de eGFP producido por citometría de flujo a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección. Se utilizó un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) para medir la fluorescencia de las células mediada por eGFP y generar los datos que se muestran aquí.

La producción de eGFP se midió en células Flp-In diseñadas para expresar SCD1 y SREBF1 etiquetados con V5. Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran la mediana de la fluorescencia, la media geométrica de la fluorescencia y la media aritmética de la fluorescencia, respectivamente, de las células Flp-In diseñadas por LMM registradas mediante citometría de flujo en los puntos de tiempo especificados. Estos valores aumentan en las células que sobreexpresan SCD1 para la fluorescencia media, la fluorescencia media geométrica y la fluorescencia media aritmética, lo que demuestra que las células que expresan SCD1 de forma estable son capaces de producir más eGFP en comparación con las células de control.

La producción de eGFP se midió en células CHOK1SV GS-KO diseñadas para expresar SCD1, SREBF1 y SREBF410 etiquetados con V5. La fluorescencia media se muestra en la Figura 7A y la fluorescencia media geométrica se muestra en la Figura 7B. Se observó un aumento de la fluorescencia mediana y la fluorescencia media geométrica en las células diseñadas para sobreexpresar SREBF1.

Para tener en cuenta las diferencias en la concentración celular y las propiedades de proliferación observadas en las líneas celulares derivadas de CHOK1SV GS-KO. La fluorescencia total por mL de cultivo se calculó multiplicando la fluorescencia media aritmética medida por la concentración celular total ($\times 10^6$ por mL), y los valores calculados se muestran en la Figura 7C. Como se muestra en la Figura 7C, las células que sobreexpresan SCD1 produjeron una cantidad significativamente mayor de proteína recombinante (eGFP) 24 horas después de la transfección en comparación con las células de control. Las células que sobreexpresan SREBF1 generalmente produjeron una mayor cantidad de eGFP en todos los puntos de tiempo probados en comparación con las células de control, y cantidades significativamente mayores a las 72 y 96 horas después de la transfección.

En conjunto, estos datos muestran que la ingeniería de células para expresar un LMM, como SCD1 y SREBF1, aumenta la capacidad de producción de una proteína recombinante expresada transitoriamente como eGFP. Además, como lo demuestra la fluorescencia medida, las células produjeron un aumento de eGFP funcional y plegada correctamente en comparación con las células que no tenían una modificación que modula el metabolismo de los lípidos, lo que demuestra que la modulación del metabolismo de los lípidos aumenta tanto el rendimiento como la calidad de la producción.

Ejemplo 5: Productividad mejorada en células estables que sobreexpresan un LMM

De manera similar a los experimentos descritos en el Ejemplo 4, se evaluó la capacidad de producción de diferentes productos de las líneas celulares que expresan LMM de manera estable, como una molécula de anticuerpo IgG4 modelo (denominada en el presente documento como anticuerpo A) y una proteína de fusión (denominada en el presente documento como proteína Fc o FP).

Se sometieron a electroporación células Flp-In que expresaban de manera estable SCD1 y SREBF1 marcado con V5 (diseñadas como se describe en el Ejemplo 1) con vectores de expresión que codifican el anticuerpo A o una proteína de fusión Fc. Después de la electroporación, se determinó la cantidad de anticuerpo recombinante A y FP en el sobrenadante del cultivo a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la electroporación mediante transferencia Western. Se usaron un anticuerpo primario anti-cadena pesada, un anticuerpo secundario conjugado anti-HRP de conejo y el reactivo de detección apropiado para detectar el anticuerpo A (Figura 8A) y la proteína de fusión Fc (Figura 9A). El cambio promedio en la producción de la proteína de fusión del anticuerpo A y Fc se determinó mediante HPLC de proteína A, y se muestra en las Figuras 8B y 9B, respectivamente. Las líneas celulares que expresan SCD1 exógena demostraron una mayor productividad en comparación con las líneas celulares de control con ambas proteínas recombinantes. Además, este efecto fue consistente en los puntos de tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas analizados.

Las células CHOK1SV GS-KO de Lonza (Xceed™) que expresan de manera estable los constructos SCD1, SREBF1 y SREBF410 (diseñadas como se describe en el Ejemplo 1) se transfecaron transitoriamente con dos proteínas recombinantes; un modelo IgG4 (anticuerpo A) y una proteína de fusión Fc. Después de la electroporación, la cantidad de anticuerpo recombinante A y FP en el sobrenadante del cultivo se determinó cada 24 horas hasta 96 horas mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo primario anti-cadena pesada, un anticuerpo secundario conjugado anti-HRP de conejo y el reactivo de detección apropiado. (Figuras 10A y 11A). El cambio promedio en la producción de la proteína de fusión del anticuerpo A y Fc se determinó mediante HPLC de proteína A, y se muestra en las Figuras 10B y 11B, respectivamente. Las líneas celulares CHOK1SV GS-KO que expresan SCD1, SREBF1 y SREBF410 exógenos demostraron una mayor productividad en comparación con las líneas celulares de control con ambas proteínas recombinantes (Figuras 10B y 11B). Además, este efecto fue consistente en los puntos de tiempo de 48, 72 y 96 horas analizados.

Las células CHOK1SV GS-KO de Lonza (Xceed™) que expresan de manera estable los constructos SCD1, SREBF1 y SREBF410 (diseñadas como se describe en el Ejemplo 1) se transfecaron de manera estable con dos proteínas recombinantes; un modelo IgG4 (anticuerpo A) y una proteína de fusión Fc. Las Figuras 15A y 16A muestran la productividad volumétrica de la proteína de fusión del anticuerpo A y FC respectivamente a las 48, 96, 144 y 192 horas después de la siembra inicial a $0,2 \times 10^6$ células viables/ml. Los resultados muestran que los grupos de células que sobreexpresan SCD1 mejoran el rendimiento absoluto de ambas moléculas recombinantes. Además, tras los cálculos para incluir el número de células, la productividad específica de ambas moléculas recombinantes también aumentó considerablemente en los grupos de células que sobreexpresan SCD1 (Figura 15B y 16B).

Estos resultados muestran colectivamente que la ingeniería de células para expresar un LMM, como SCD1, SREBF1 y un fragmento funcional de SREBF1 (SREBF410) aumenta la capacidad de producción de proteínas recombinantes expresadas transitoriamente, como moléculas de anticuerpos y proteínas de fusión.

Ejemplo 6: Mejora de las líneas celulares de producción establecidas

Los ejemplos 4 y 5 demuestran que las líneas celulares que expresan LMM de manera estable tienen una producción mejorada cuando expresan transitoriamente un producto recombinante, como una GFP, una molécula de anticuerpo o una proteína de fusión. En este ejemplo, se realizó un análisis para determinar el efecto de los LMM en la mejora de los rendimientos estables existentes de un producto recombinante en líneas celulares establecidas.

Se utilizaron células CHO121 que se habían modificado previamente para expresar de manera estable una molécula de anticuerpo IgG4 modelo (anticuerpo A). Los constructos que codifican SCD1 marcado con V5, SREBF1 y un SREBF1 truncado (SREBF410) se expresaron transitoriamente en las células que expresan de forma estable el anticuerpo A. Las células de control se transfecaron con un vector de etiqueta V5 vacío. Los sobrenadantes de las células se recogieron a las 48, 72 y 168 horas. Se realizó un análisis de transferencia Western para determinar la cantidad de anticuerpo A producido mediante el uso de un anticuerpo primario anti-cadena pesada (Sigma 19764), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo (Sigma A6154), y los resultados se muestran en la Figura 12A. Como se muestra, la expresión de los LMM SCD1 y SREBF410 dio como resultado un aumento en la cantidad de anticuerpo A producido por las células en comparación con el control a las 48 y 72 horas después de la introducción de los LMM. Los sobrenadantes de las células se sometieron a análisis de Coomassie para mostrar la

- cantidad de anticuerpo A producido después de 168 horas después de la introducción de los LMM y demostrar que la expresión transitoria de LMM (SCD1 y SREBF410) dio como resultado una producción mejorada de la proteína recombinante (Figura 12B). La Figura 13 muestra el análisis cuantitativo del anticuerpo A usando proteína A HPLC que destaca un marcado aumento en el título promedio del producto después de transfecciones transitorias con 5 plásmidos que contienen SCD1 y SREBF410 a las 48, 72, 96 y 144 horas después de la transfección. La Figura 14 muestra el análisis cuantitativo de la proteína de fusión FC utilizando el análisis de la proteína A para determinar los títulos del producto y el número de células viables para determinar la productividad específica. Estos datos muestran un aumento en la productividad específica promedio de células transfectadas transitoriamente con vectores que contienen elementos LMM y el constructo que contiene SREBF1 produce el valor promedio más alto.
- 10 Estos resultados muestran que la modulación del metabolismo de los lípidos en líneas celulares establecidas puede mejorar aún más la capacidad de producción en comparación con los rendimientos establecidos.
- Ejemplo 7: Productividad mejorada mediante la introducción simultánea de genes recombinantes y LMM**
- 15 Se generaron plásmidos/constructos que comprenden genes para la expresión apropiada tanto de una inmunocitoquina ejemplar como de un control (sin LMM), SCD1, SREBF1 o SREBF411 (las secuencias derivadas de SREBF1 eran específicas de CHO; NM_001244003, SEQ ID NO: 34 y 36). Estos constructos se usaron luego para transfectar transitoriamente las células CHOK1SV GS-KO de Lonza. La Figura 17A muestra el análisis Western de los sobrenadantes recogidos a las 48 y 96 horas después de la transfección. Se redujeron las muestras de sobrenadante utilizadas y se detectó el producto transitorio sondando con un anticuerpo primario anti-cadena pesada y un secundario anti-conejo conjugado con HRP para resaltar una cadena pesada nativa (banda inferior) y una cadena pesada fusionada con citoquina (banda superior). La inclusión de los genes SCD1, SREBF1 y SREBF411 en el 20 constructo transfectado dio como resultado un aumento en las intensidades de ambas bandas tanto a las 48 como a las 96 horas después de la transfección. Además, la Figura 17B muestra el análisis cuantitativo de muestras obtenidas 96 horas después de la transfección usando análisis de proteína A. Las abundancias relativas de la inmunocitoquina respaldan los datos presentados en el análisis western (Figura 17A).
- 25 Estos datos muestran que la inclusión simultánea de un LMM, como SCD1, SREBF 1 y un fragmento funcional de SREBF1 (SREBF411), con genes de productos recombinantes puede mejorar la capacidad de producción.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para producir un polipéptido recombinante en una célula de mamífero, que comprende:

5 i) introducir en la célula un primer ácido nucleico exógeno que codifica un primer modulador del metabolismo de lípidos (LMM) que comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1); y un ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante; y

10 ii) cultivar la célula en condiciones donde se expresan el primer LMM y el polipéptido recombinante, produciendo así el polipéptido recombinante,

15 en donde el polipéptido recombinante es:

10 i) un polipéptido terapéutico,

15 ii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o

20 iii) seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o factor de crecimiento, una proteína de fusión o una vacuna proteica;

25 en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el primer LMM proporciona un mayor rendimiento o tasa de producción del polipéptido recombinante en comparación con una célula que no tiene el primer LMM.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula comprende además un segundo ácido nucleico exógeno que codifica un segundo LMM que comprende SREBF1 (factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteróoles), y en la etapa (ii) la célula se cultiva en condiciones en las que se expresa el segundo LMM;

en donde el segundo LMM comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SREBF1 correspondiente a SEQ ID NO: 1 o 34.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la producción del polipéptido recombinante aumenta dos veces en comparación con el nivel o la cantidad de polipéptido recombinante producido por una célula sin el primer LMM.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico que codifica el modulador del metabolismo de los lípidos se integra en el genoma cromosómico de la célula, en donde el LMM se expresa de forma estable.

30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula es una célula CHO.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además separar el polipéptido de al menos un componente celular o medio.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido recombinante se introduce después de introducir el primer ácido nucleico exógeno que codifica el primer LMM.

35 9. Una célula CHO que comprende:

un primer ácido nucleico que codifica un primer modulador del metabolismo de lípidos (LMM), en donde el primer LMM comprende estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1); y

un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante,

40 en donde dichos ácidos nucleicos no se encuentran naturalmente dentro de la célula;

en donde el primer ácido nucleico está integrado en el genoma cromosómico de la célula y en donde la célula expresa el LMM;

en donde la célula expresa el polipéptido recombinante y en donde el polipéptido recombinante es:

45 i) un polipéptido terapéutico humano,

ii) un anticuerpo o fragmento del mismo, un anticuerpo monoclonal o una molécula biespecífica, o

iii) seleccionado de una hormona, un factor de coagulación o coagulación de la sangre, una citoquina o factor de crecimiento, una proteína de fusión y una vacuna proteica;

en donde el LMM comprende al menos 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

- 5 10. La célula de la reivindicación 9, en donde el primer LMM proporciona un mayor rendimiento o tasa de producción del polipéptido recombinante en comparación con una célula que no tiene el primer LMM.
- 11. Uso de la célula de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 en la producción de un polipéptido recombinante terapéutico de interés.
- 10 12. Método para producir un polipéptido recombinante que comprende cultivar la célula de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y recuperar el polipéptido recombinante producido por la célula separando el polipéptido recombinante de la célula o medio de cultivo en donde se cultivó la célula.

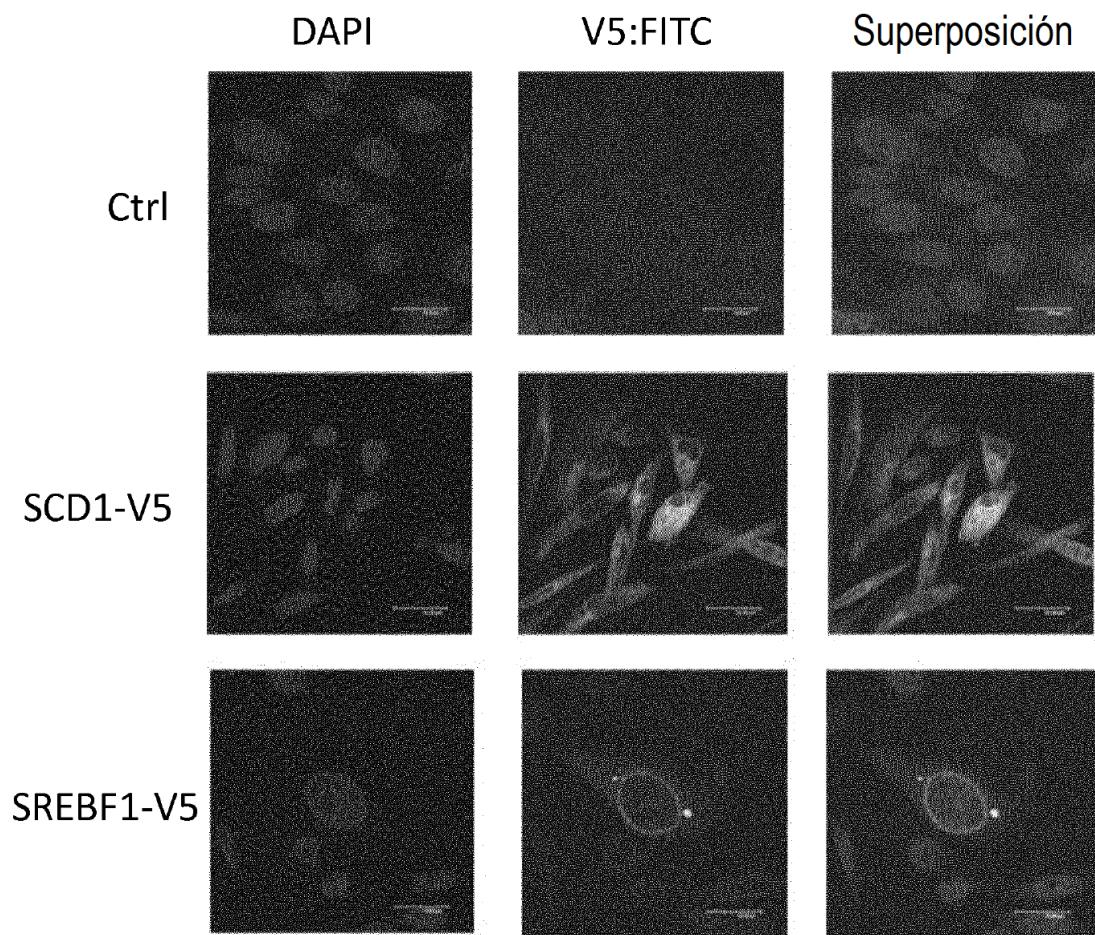


FIG. 1

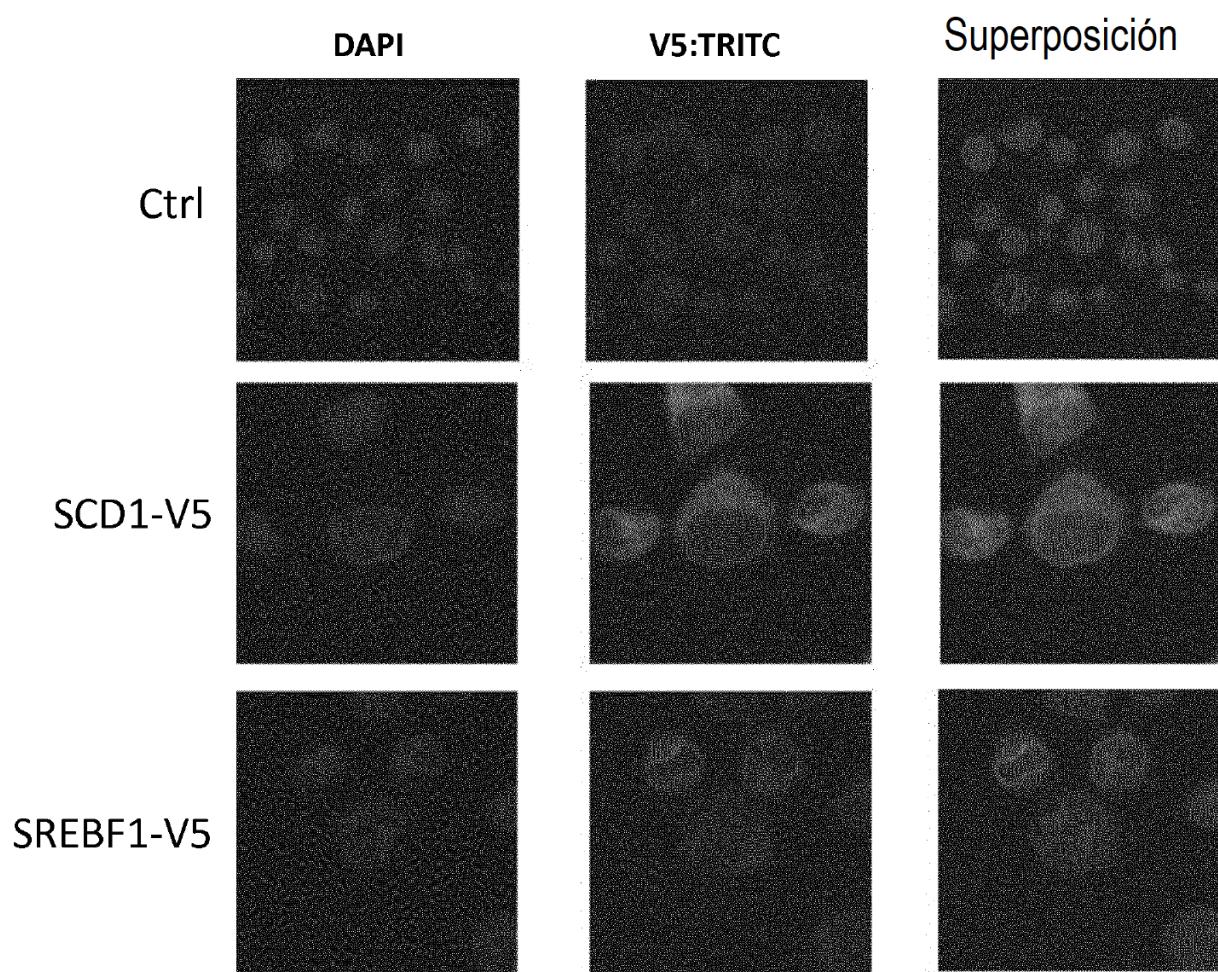


FIG. 2

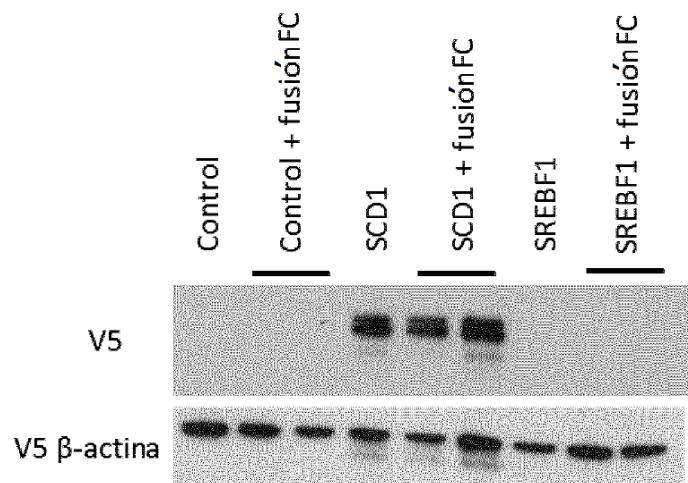


FIG. 3A

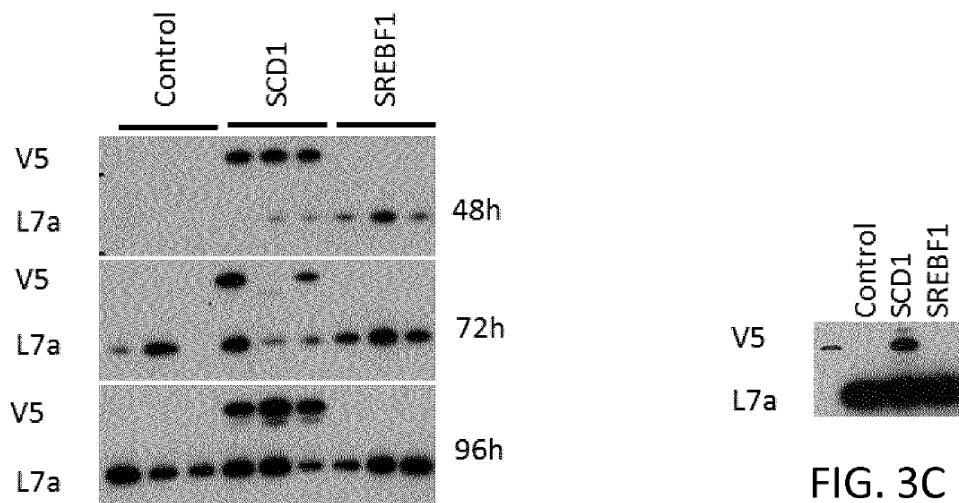


FIG. 3C

FIG. 3B

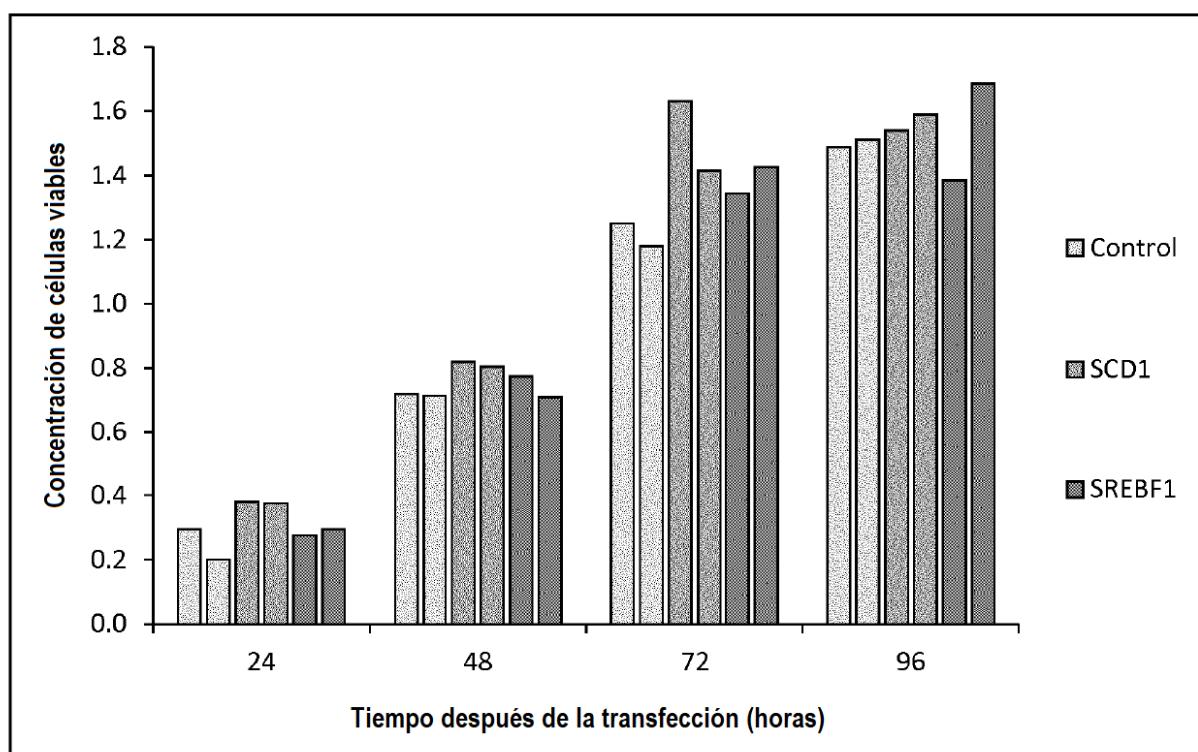


FIG. 4

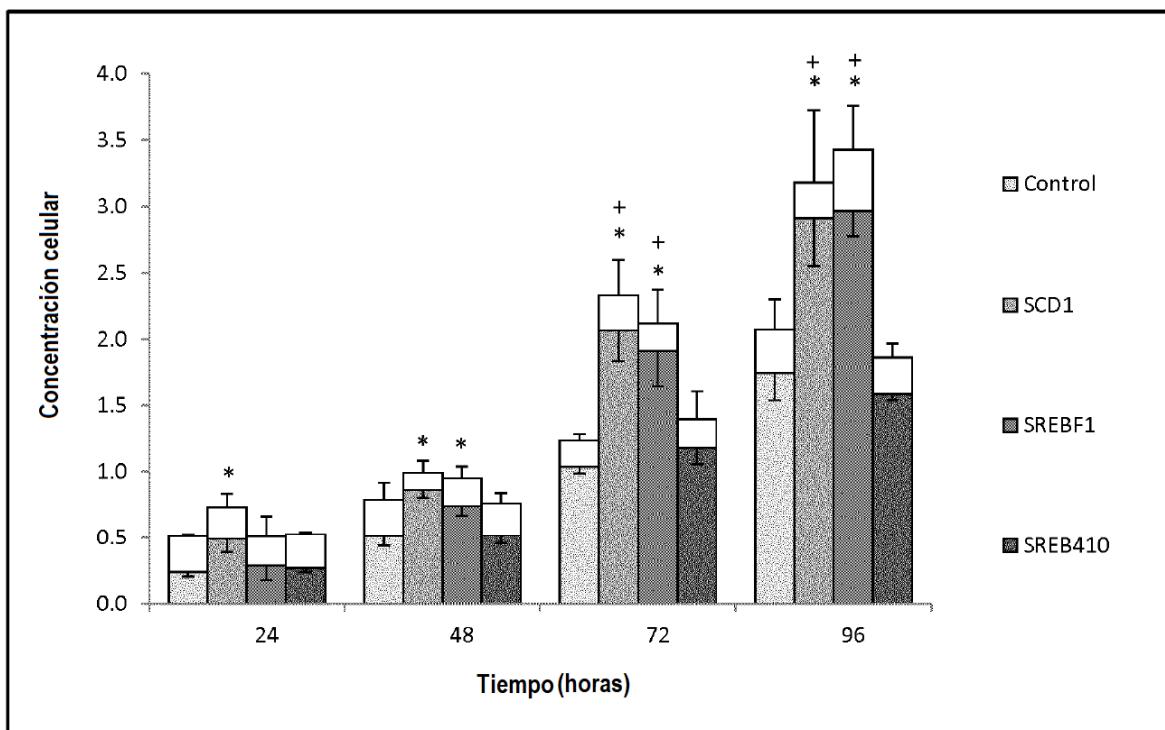


FIG. 5A

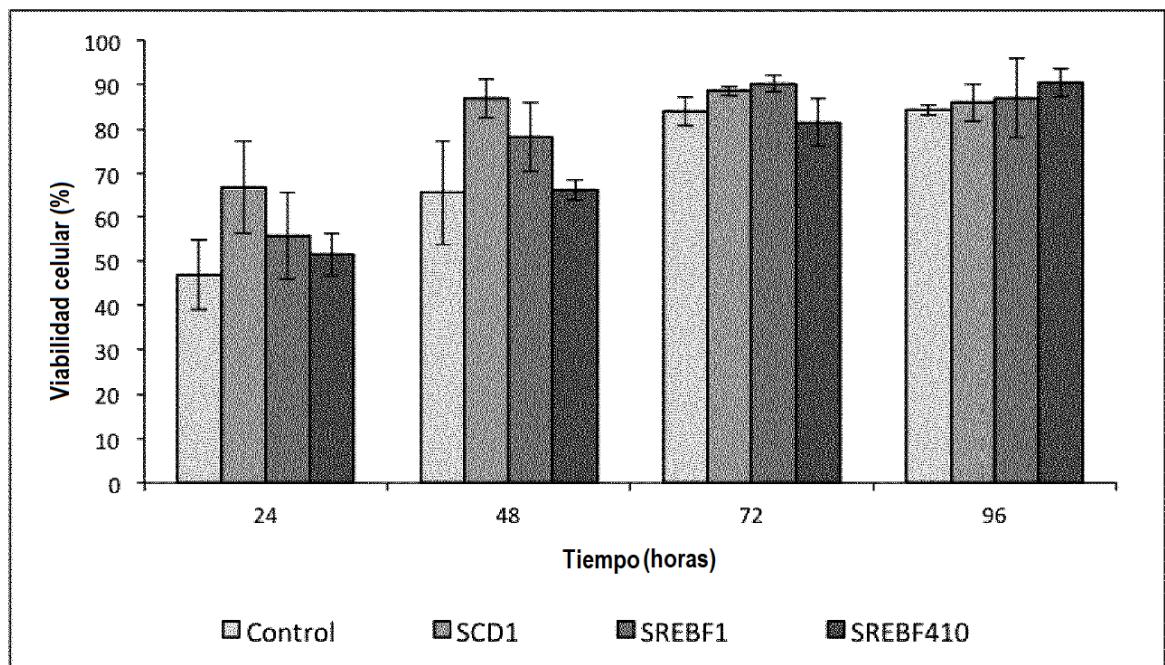


FIG. 5B

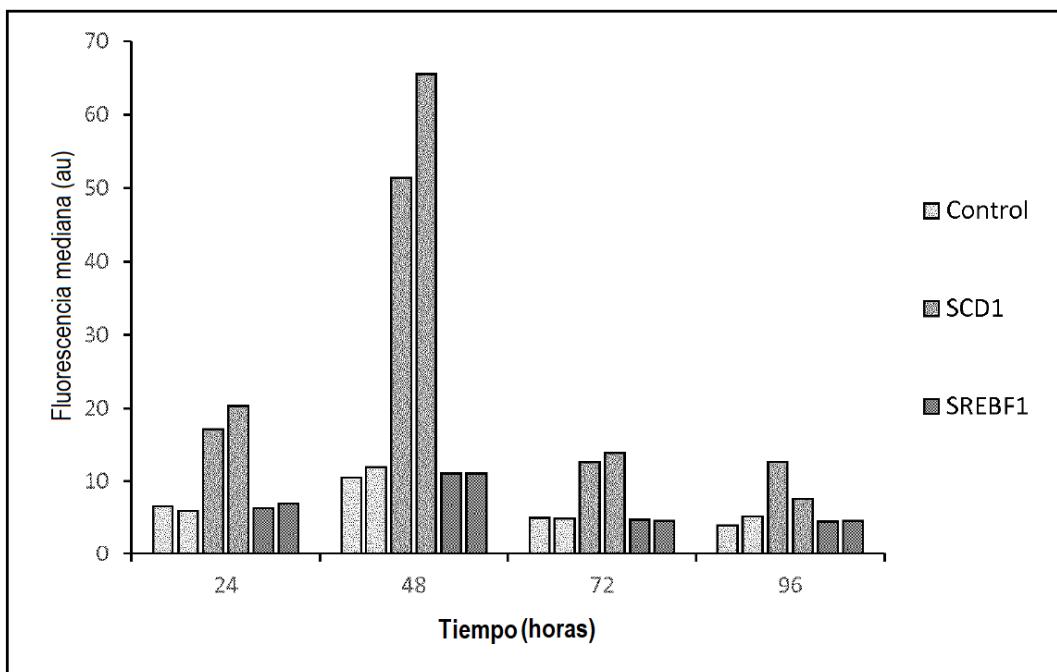


FIG. 6A

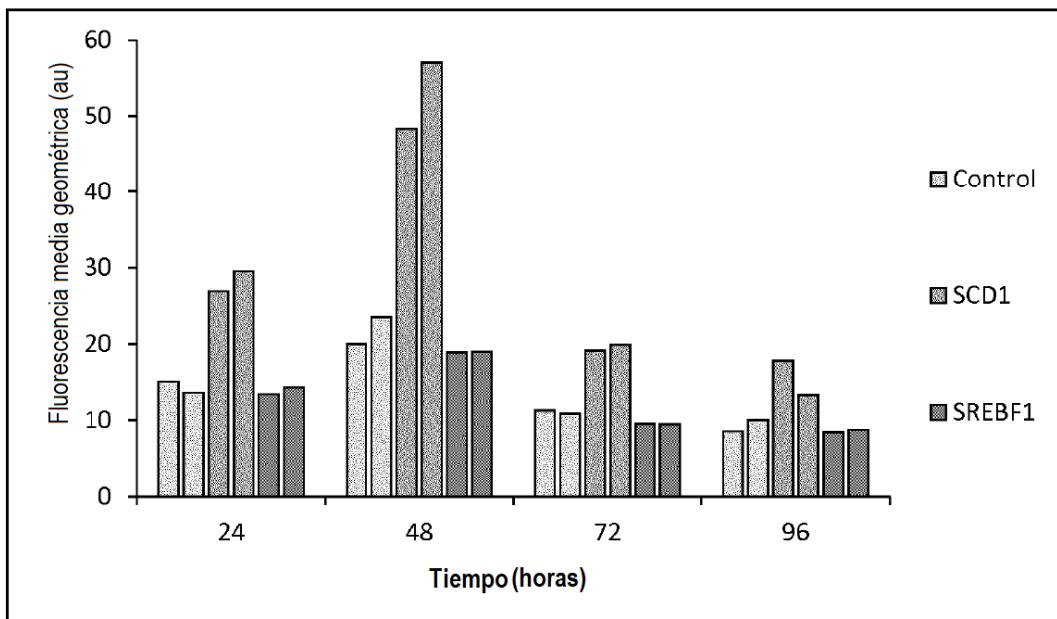


FIG. 6B

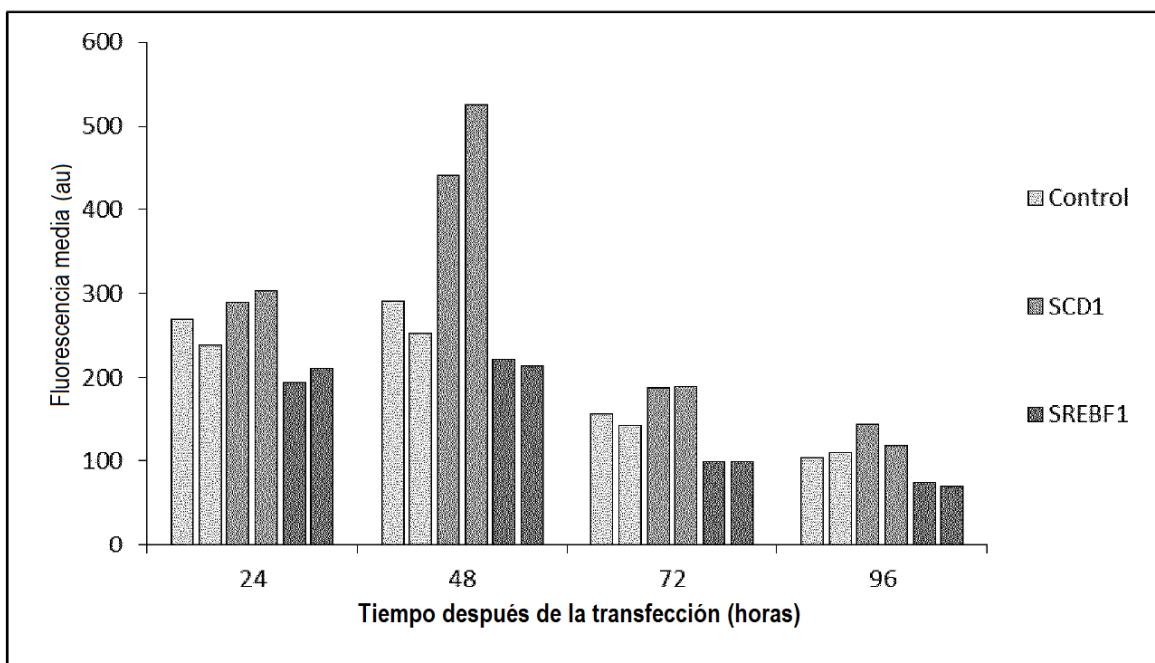


FIG. 6C

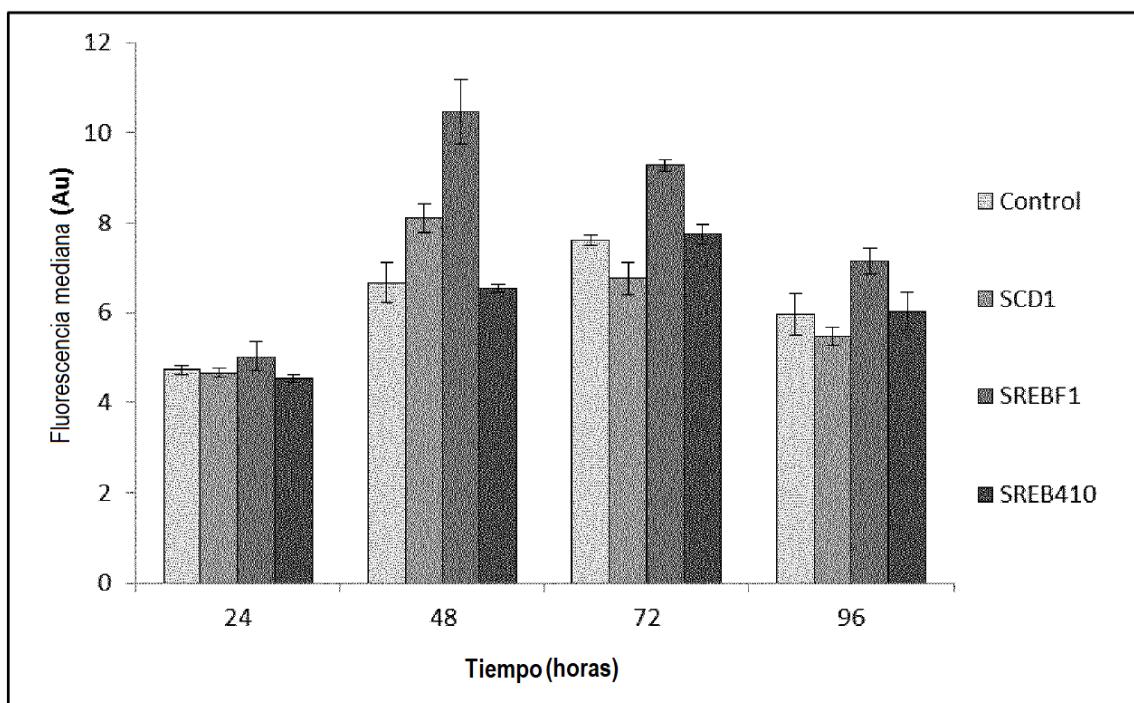


FIG. 7A

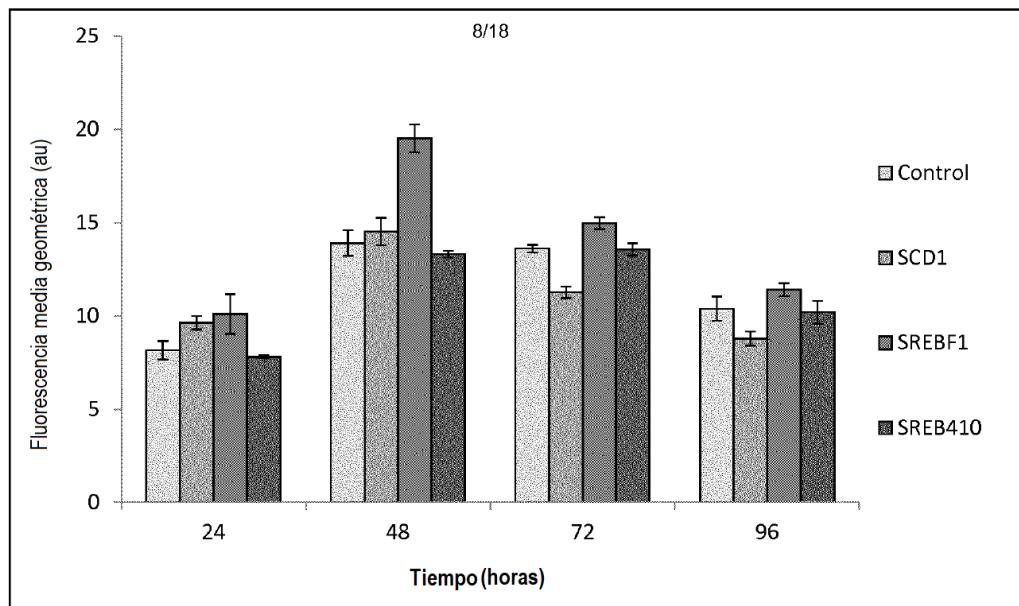


FIG. 7B

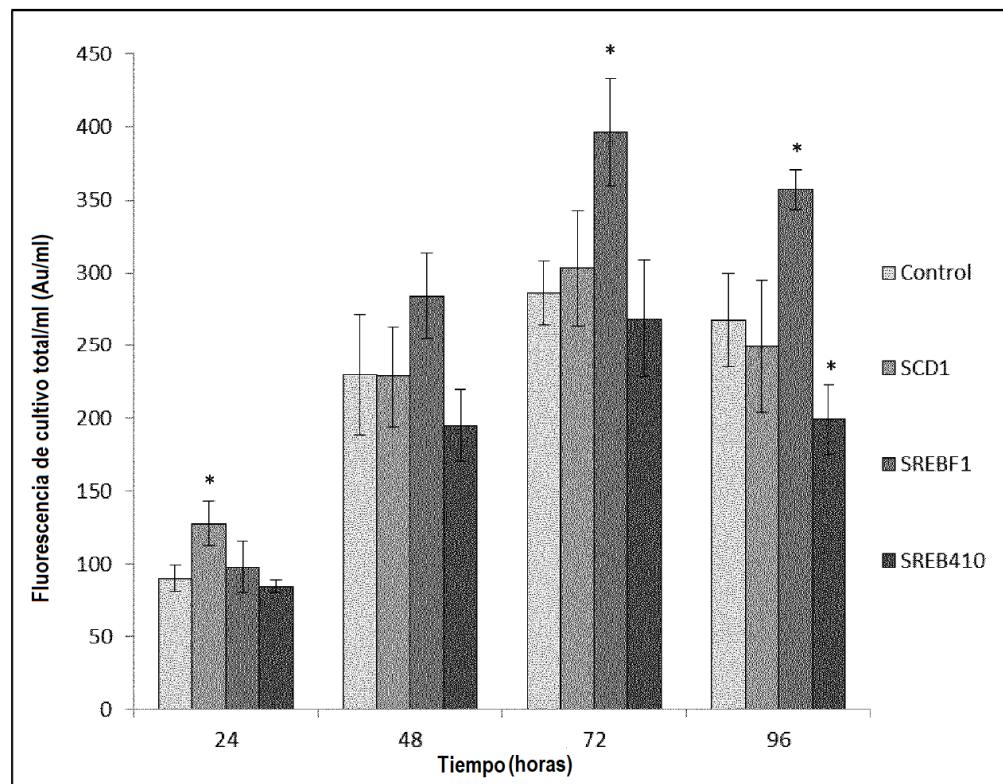


FIG. 7C

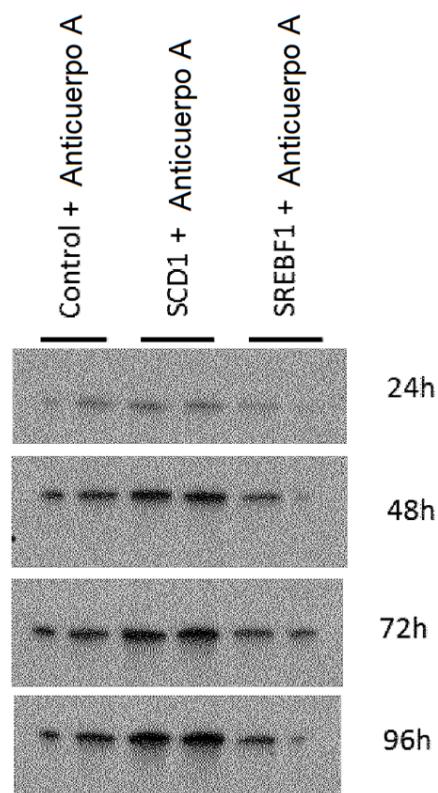


FIG. 8A

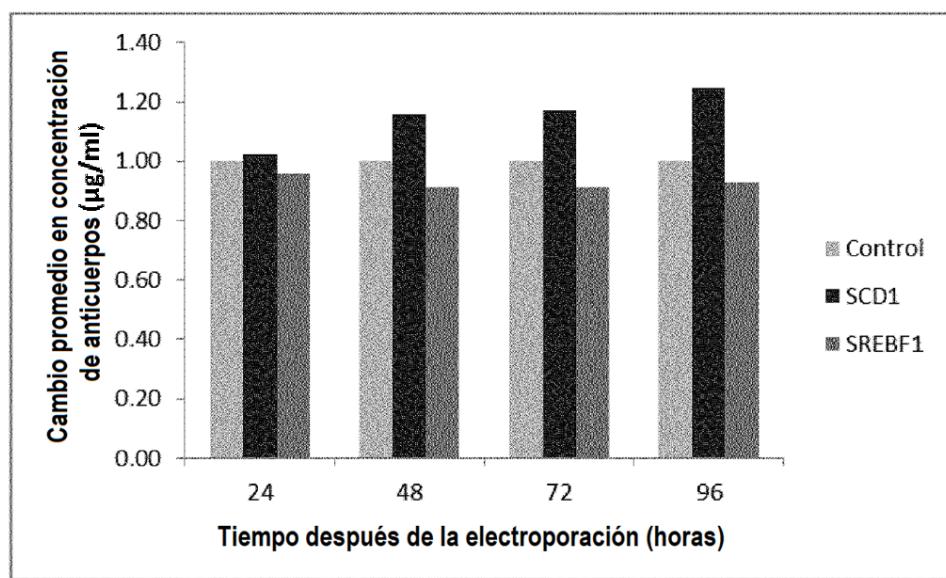


FIG. 8B

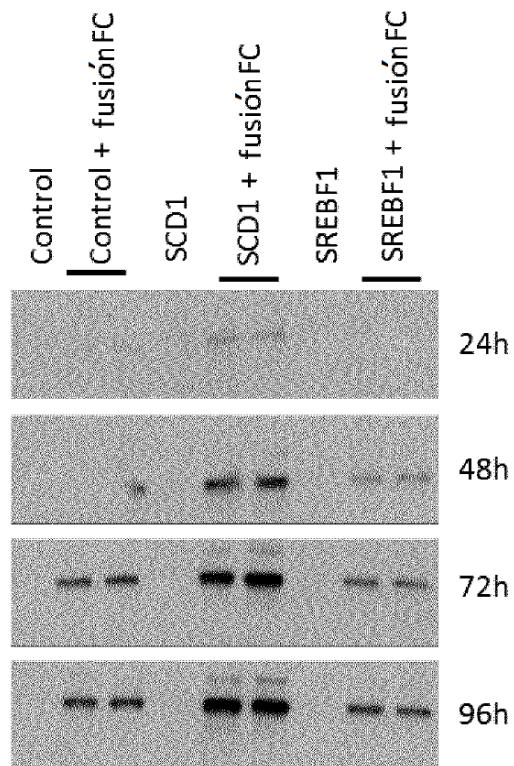


FIG. 9A

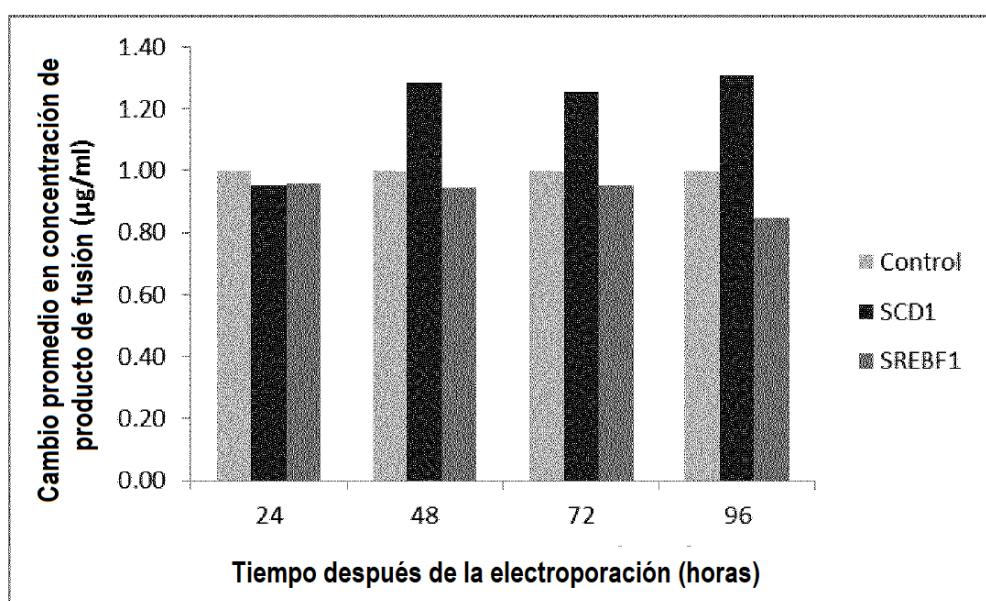


FIG. 9B

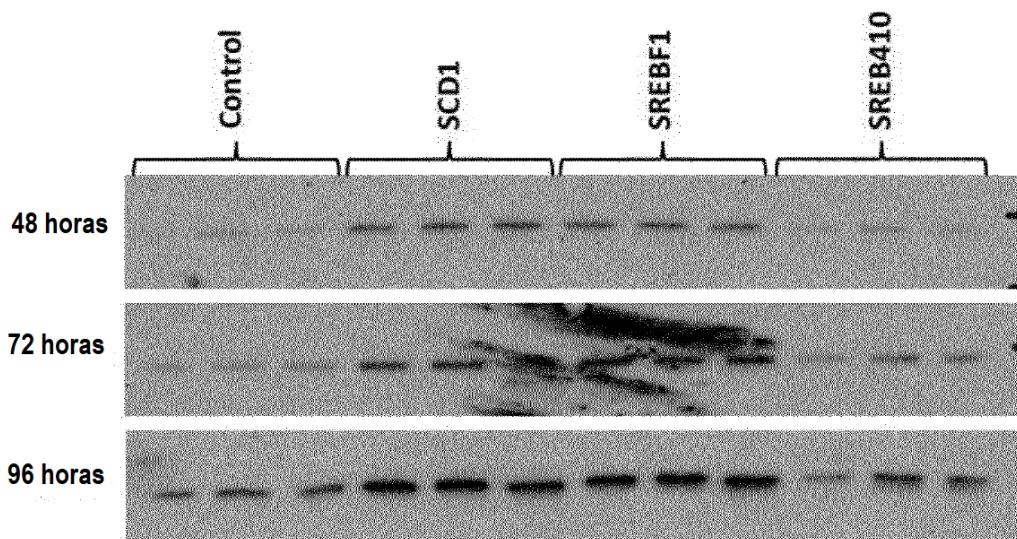


FIG. 10A

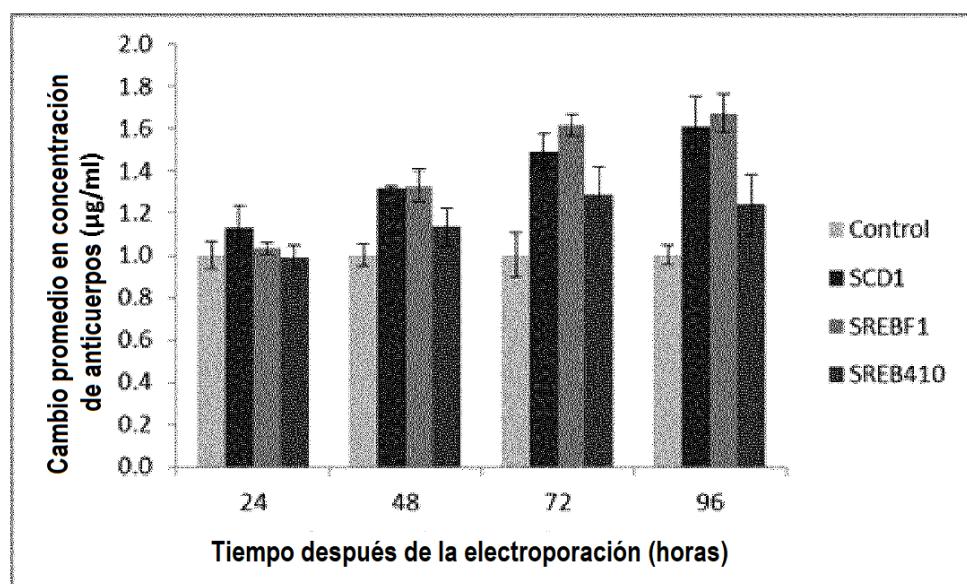


FIG. 10B

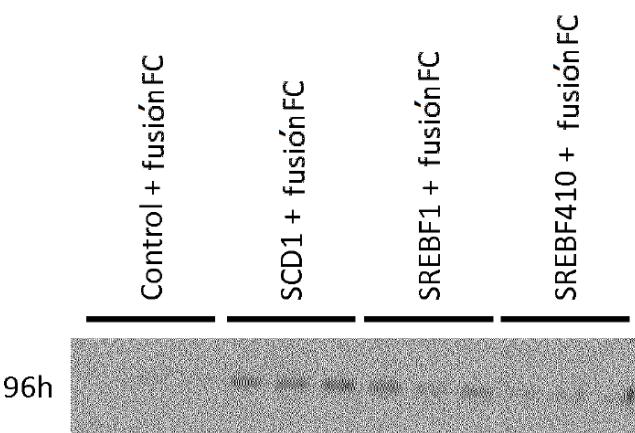


FIG. 11A

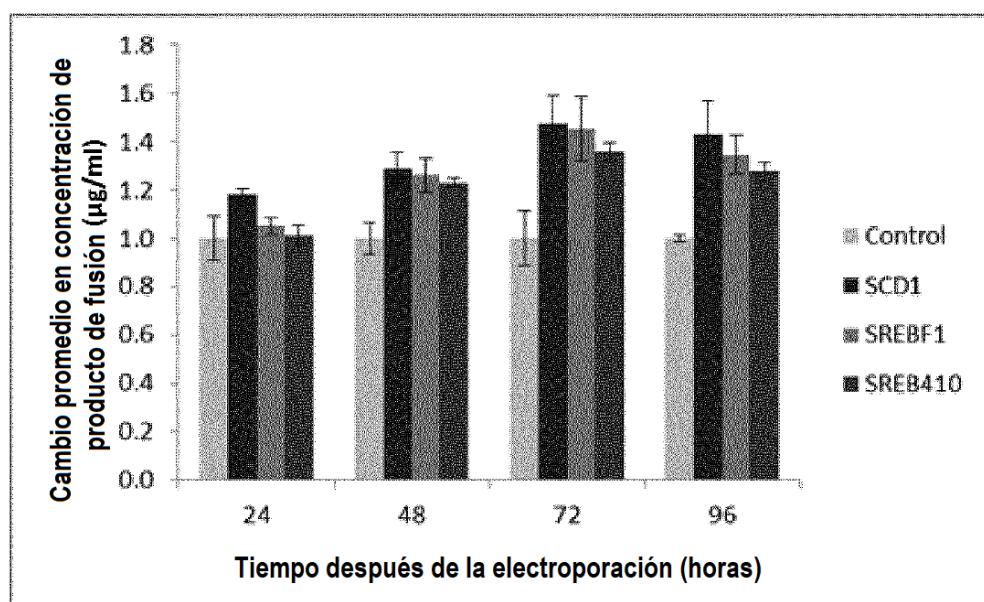


FIG. 11B

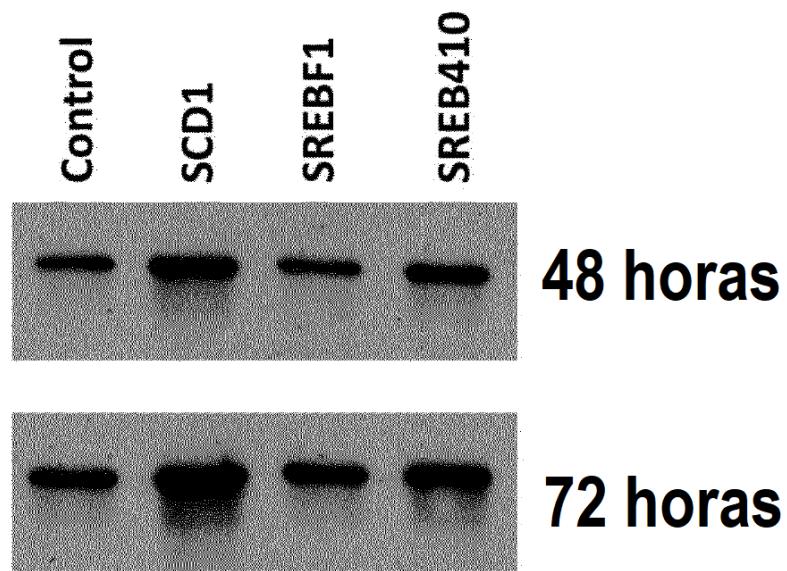


FIG. 12A

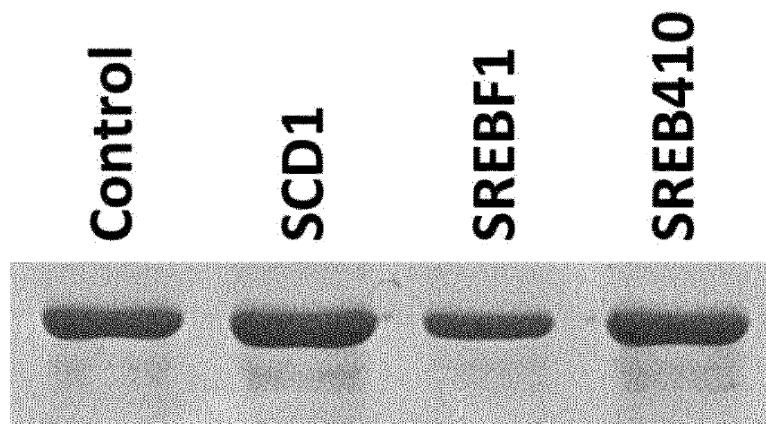


FIG. 12B

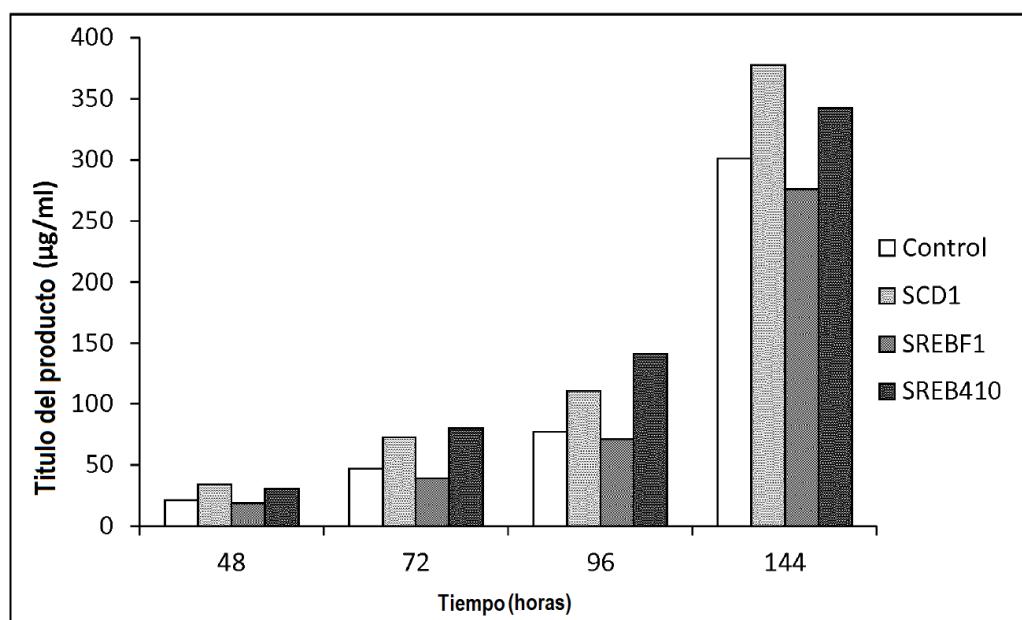


FIG. 13

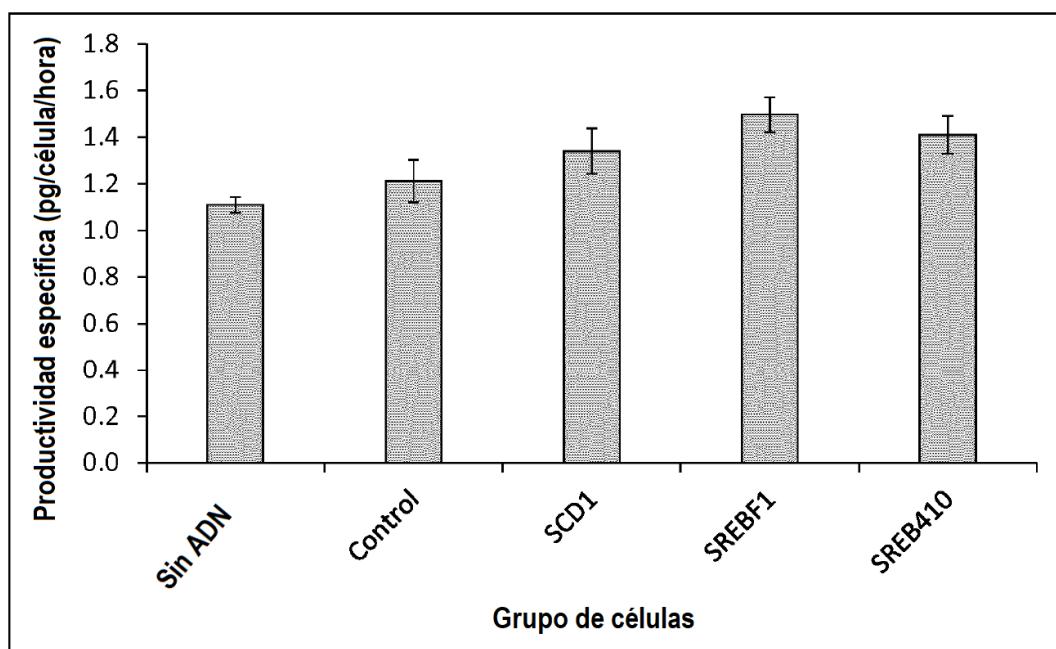


FIG. 14

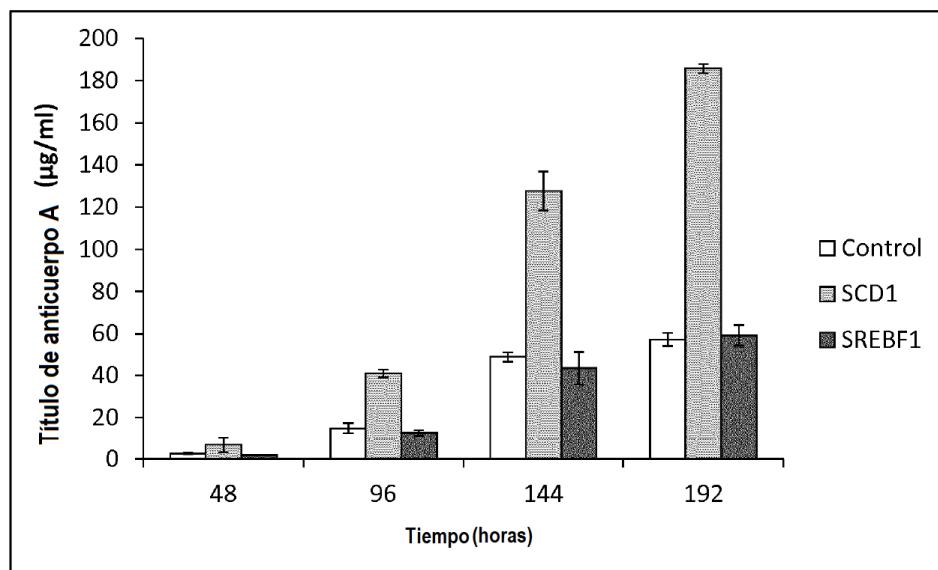


FIG. 15A

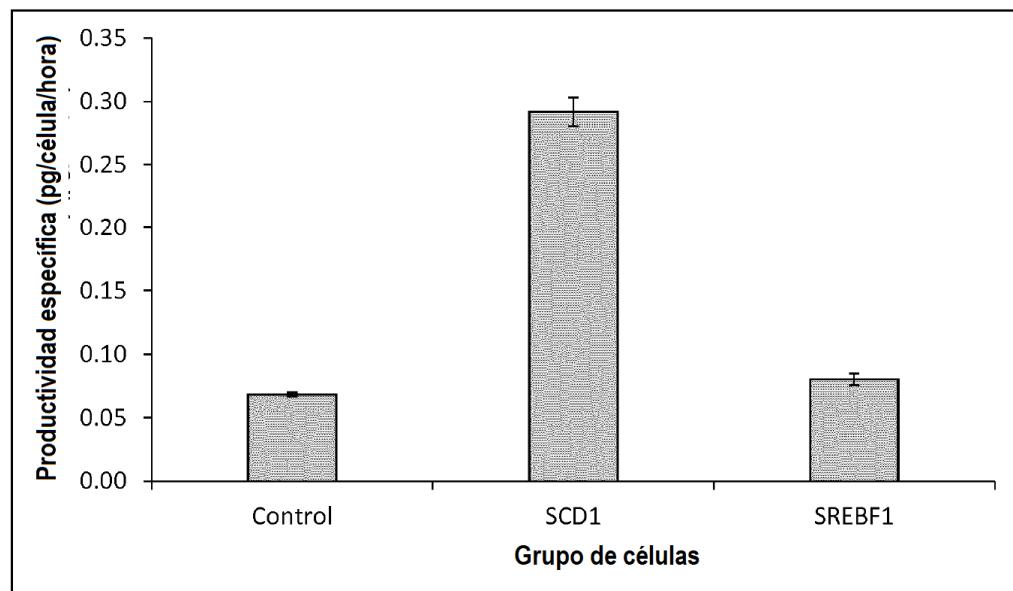


FIG. 15B

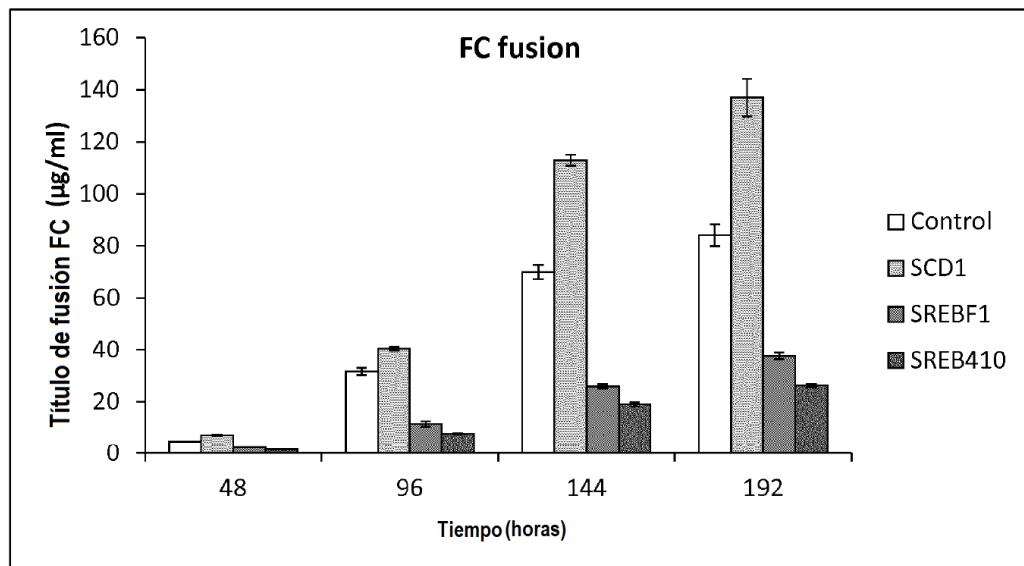


FIG. 16A

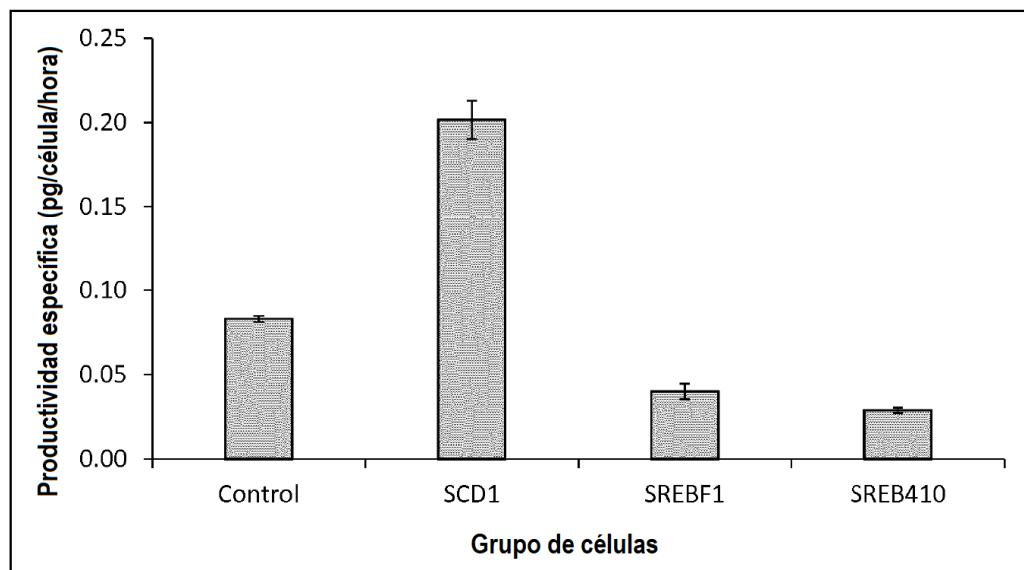


FIG. 16B

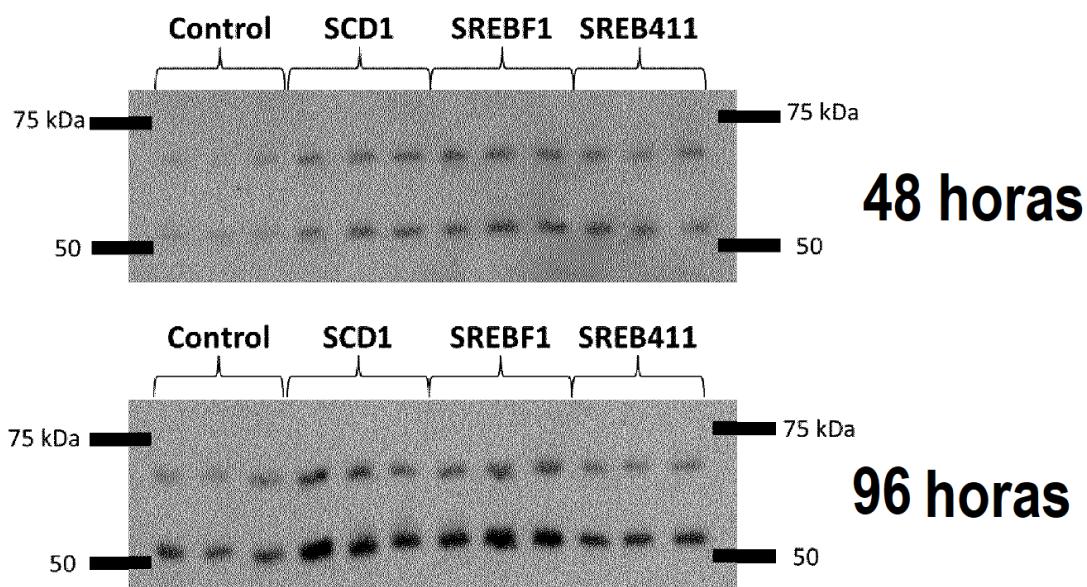


FIG. 17A

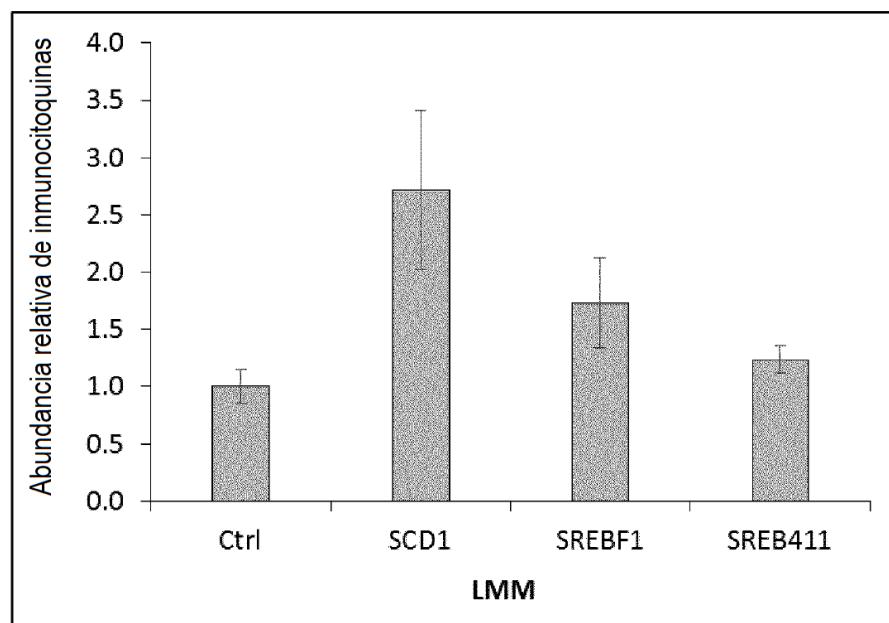


FIG. 17B