

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 818**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2019 PCT/US2019/016403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019 WO19152876**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2019 E 19713231 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3645720**

54 Título: **Métodos de selección celular y modificación del metabolismo celular**

30 Prioridad:

02.02.2018 US 201862625773 P

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

02.11.2021

73 Titular/es:

**LONZA LTD (100.0%)
Lonzastrasse
3930 Visp, CH**

72 Inventor/es:

**YOUNG, ROBERT;
SMALES, CHRISTOPHER, MARK;
JAQUES, COLLIN, MARK;
RACHER, ANDREW, J.;
SINGH, GURDEEP;
BUDGE, JAMES y
ROBOOL, JOANNE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 871 818 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de selección celular y modificación del metabolismo celular

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para identificar, seleccionar o cultivar células que comprenden una secuencia de ácido nucleico concreta.

Antecedentes

10 Las células eucariotas que son auxótrofas para un compuesto esencial requerido para el crecimiento pueden aprovecharse para la expresión de productos heterólogos acoplando la expresión del producto a la de una enzima ectópica que permite la síntesis del compuesto esencial. Por ejemplo, las células murinas mutantes con auxotrofia de timidina no pueden crecer en ausencia de timidina suministrada externamente (Ayusawa et al. (1981) *Somatic Cell Genet.* 7 (5): 523-534). Las revertientes en las que se restauró la actividad de timidilato sintasa pudieron crecer en condiciones de inanición de timidina.

15 Comúnmente se usan sistemas de expresión de células de mamíferos para la producción de productos biológicos recombinantes, tales como biología terapéutica. Sin embargo, la producción a gran escala de tales productos está asociada con altos costes iniciales debido a la dificultad de generar de manera eficiente líneas celulares estables que expresen de manera eficiente grandes cantidades del producto deseado. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos y composiciones mejorados para la producción de células que puedan usarse para producir productos biológicos recombinantes.

Compendio de la invención

20 En el presente documento se describen composiciones y métodos para identificar, seleccionar o cultivar células que comprenden una secuencia de ácido nucleico concreta de interés (por ejemplo, una o más secuencias de ácido nucleico concretas de interés). Generalmente, se introduce en una célula un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico concreto y una secuencia que codifica una molécula de enzima implicada en la biosíntesis de un aminoácido. A continuación, la célula se cultiva en un medio que carece del aminoácido, de modo que las células que comprenden el ácido nucleico introducido son capaces de crecer. En algunos casos, la célula comprende además un inhibidor de la molécula de enzima para aumentar el rigor de la selección. Se contempla que puedan usarse auxotrofías para compuestos distintos de los aminoácidos (por ejemplo, metales traza, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos u otros metabolitos conocidos en la técnica) en los métodos de selección descritos en este documento.

30 En un aspecto, la invención presenta un método para identificar, seleccionar o cultivar una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico concreta, comprendiendo el método:

a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico heterólogo, que comprende:

(i) la secuencia de ácido nucleico concreta; y

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS); y

35 b) cultivar la célula que comprende la secuencia de ácido nucleico en presencia de un medio que tiene un nivel insuficiente de prolina para soportar el crecimiento de una célula que es igual que el de la célula que no tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de P5CS, en condiciones suficientes para permitir para el crecimiento de una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el medio además un inhibidor de la actividad de la enzima; identificando, seleccionando o cultivando así una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

40 En el presente documento se describe un método para identificar, seleccionar o cultivar una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico concreta, comprendiendo el método:

a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, por ejemplo, un vector duplicable, que comprende:

45 (i) la secuencia de ácido nucleico concreta;

(ii) una secuencia de ácido nucleico que, cuando se expresa, da como resultado un nivel elevado de actividad de una enzima en la vía sintética de un aminoácido, por ejemplo, la vía sintética de prolina; por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de enzima que comprende la actividad; y

50 b) cultivar la célula que comprende la secuencia de ácido nucleico en presencia del medio que tiene un nivel insuficiente del aminoácido-por ejemplo, prolina- para soportar el crecimiento de una célula que es igual que el de la célula concreta que no tiene una actividad elevada, en condiciones suficiente para permitir el crecimiento de una

célula que comprende la secuencia de ácido nucleico (y el medio que comprende opcionalmente un inhibidor de la enzima),

- 5 c) cultivar la célula que comprende la secuencia de ácido nucleico en presencia del segundo medio un nivel insuficiente del segundo aminoácido-por ejemplo, tirosina- para soportar el crecimiento de una célula que es igual que el de la célula concreta que no tiene una actividad elevada, bajo condiciones suficientes para permitir el crecimiento de una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico (y el medio que comprende opcionalmente un inhibidor de la segunda enzima), identificando, seleccionando o cultivando así una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

10 En el presente documento se describe una célula que comprende una secuencia que codifica un modificador del metabolismo lipídico (LMM, por sus siglas en inglés) heterólogo unido operativamente a una secuencia que comprende una región de control, por ejemplo, una secuencia promotora, de cualquiera de una secuencia promotora de SV40, una secuencia promotora de mCMV o una secuencia promotora de PGK.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es un esquema que muestra las etapas que limitan la velocidad en la vía de síntesis de prolina en mamíferos. El signo de interrogación se refiere a un posible inhibidor que podría usarse para inhibir la conversión de glutamato en glutamato 5-semialdehído.

La Figura 2 es un diagrama que muestra el mapa de plásmidos de un vector ejemplar que lleva los genes P5CS y eGFP.

20 Las Figuras 3A-3B son una serie de gráficos que muestran los perfiles de crecimiento de células GSKO cultivadas en diferentes medios: medio completo (Glut 6 mM), medio sin glutamina (Sin glut) y medio sin prolina (Sin pro). La Figura 3A muestra la concentración de células viables y la Figura 3B muestra la viabilidad del cultivo.

Las Figuras 4A-4C son una serie de gráficos que muestran los mapas de plásmidos para vectores ejemplares que comprenden un gen Etanercept (Figura 4A), genes de glutamina sintetasa (GS) y genes eGFP (Figura 4B), o genes P5CS y eGFP (Figura 4C).

25 Las Figuras 5A-5D son una serie de gráficos que muestran el efecto de cultivos celulares transfectados transitoriamente con uno de los vectores ejemplares representados en la Figura 4 y luego cultivados en CD-CHO (complementado para contener 6 mM de L-glutamina), medio libre de tirosina (Sin tir) o libre de prolina (Sin pro). Se muestran la concentración de células viables (Figura 5A), la viabilidad del cultivo (Figura 5B), la señal de fluorescencia de eGFP media (Figura 5C) y el porcentaje de células que superan un umbral de intensidad de fluorescencia de eGFP predeterminado (Figura 5D) a las 72 horas y 168 horas después de la transfección. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n = 3).

35 Las Figuras 6A-6C son una serie de diagramas que muestran el análisis de repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina. La Figura 6A muestra un histograma obtenido usando análisis de citometría de flujo. Las Figuras 6B y 6C muestran cada una imágenes fluorescentes generadas mediante microscopía confocal; los canales que se muestran son DAPI, P5CS: TRITC y eGFP. La Figura 6C muestra una comparación entre los repositorios generados por P5CS y el anfitrión GSKO.

40 La Figura 7 es una serie de imágenes de transferencia Western que muestran el análisis de repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina. Los vectores utilizados para el constructo del repositorio de células también contenían el gen eGFP (eGFP), el gen SCD1 donde la expresión está dirigida por el promotor SV40 (SV40 SCD1) o el gen SCD1 donde la expresión está dirigida por el promotor mCMV (mCMV SCD1). Se llevó a cabo un análisis de transferencia Western para identificar la expresión de P5CS, TAT y SCD1 (el gen de interés).

45 Las Figuras 8A-8F son una serie de diagramas que muestran repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina, y en presencia de ácido L-azetidina-2-carboxílico, un inhibidor de P5CS. Se añadió ácido L-azetidina-2-carboxílico en diversas concentraciones diferentes y las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos durante 9 días. Estas células se analizaron para determinar el crecimiento celular, medido por la concentración de células viables (Figura 8A) y la viabilidad del cultivo (Figura 8B). Las células también se analizaron para determinar la fluorescencia media del cultivo (Figura 8C) y el porcentaje de células que superaban los umbrales predeterminados de 10^2 (Figura 8D) y 10^3 (Figura 8E). La Figura 8F muestra el análisis de transferencia Western de los lisados recolectados en los instantes especificados e hibridados para resaltar las proteínas P5CS, β -actina y eGFP.

55 Las Figuras 9A-9F son una serie de diagramas que muestran repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina, y en presencia de 3,4-deshidro-L-prolina, un inhibidor de P5CS. Se añadió 3,4-deshidro-L-prolina en diversas concentraciones diferentes y las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos durante 9 días. Estas células se analizaron para determinar el crecimiento celular, medido por la concentración de células viables (Figura 9A) y la viabilidad del cultivo (Figura 9B). Las células también se analizaron

para determinar la fluorescencia media del cultivo (Figura 9C) y el porcentaje de células que superan los umbrales predeterminados de 10^2 (Figura 9D) y 10^3 (Figura 9E). La Figura 9F muestra el análisis de transferencia Western de los lisados recolectados en los instantes especificados e hibridados para resaltar las proteínas P5CS, β -actina y eGFP.

5 Las Figuras 10A-10F son una serie de diagramas que muestran repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina, y en presencia de ácido L-4-tiazolidincarbóxico, un inhibidor de P5CS. Se añadió ácido L-4-tiazolidincarbóxico en diversas concentraciones diferentes y las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos durante 9 días. Estas células se analizaron para determinar el crecimiento celular, medido por la concentración de células viables (Figura 10A) y la viabilidad del cultivo (Figura 10B). Las células también se analizaron para determinar la fluorescencia media del cultivo (Figura 10C) y el porcentaje de células que superaban los umbrales predeterminados de 10^2 (Figura 10D) y 10^3 (Figura 10E). La Figura 10F muestra el análisis de transferencia Western de los lisados recolectados en los instantes especificados e hibridados para resaltar las proteínas P5CS, β -actina y eGFP.

15 Las Figuras 11A-11E son una serie de diagramas que muestran el análisis de repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina, y en presencia de ácido L-azetidina-2-carboxílico, un inhibidor de P5CS. Se añadió ácido L-azetidina-2-carboxílico en diversas concentraciones diferentes y las células se cultivaron en placas estáticas de 24 pocillos durante 9 días. Estas células se analizaron para determinar el crecimiento celular, medido por la concentración de células viables (Figura 11A) y la viabilidad del cultivo (Figura 11B). Las células también se analizaron para determinar la fluorescencia media del cultivo (Figura 11C) y el porcentaje de células que superaban los umbrales predeterminados de 10^2 (Figura 11D) y 10^3 (Figura 11E).

20 Las Figuras 12A-12E son una serie de diagramas que muestran el análisis de repositorios de células generadas usando la sobreexpresión de P5CS y cultivadas en ausencia de prolina, y en presencia de 3,4-deshidro-L-prolina, un inhibidor de P5CS. Se añadió 3,4-deshidro-L-prolina en diversas concentraciones diferentes y las células se cultivaron en placas estáticas de 24 pocillos durante 9 días. Estas células se analizaron para determinar el crecimiento celular, medido por la concentración de células viables (Figura 12A) y la viabilidad del cultivo (Figura 12B). Las células también se analizaron para determinar la fluorescencia media del cultivo (Figura 12C) y el porcentaje de células que superan los umbrales predeterminados de 10^2 (Figura 12D) y 10^3 (Figura 12E).

25 La Figura 13 es un diagrama que muestra la velocidad de recuperación, en días, de cultivos cotransfectados con un vector ejemplar que lleva el gen modificador del metabolismo lipídico (LMM) indicado (SCD1, SREBF1 o SREB411) bajo el control del promotor indicado (promotor SV40, mCMV o PGK) y un segundo vector ejemplar que lleva un gen que codifica la proteína recombinante de interés indicada (Etanercept, Cergutuzumab, Infliximab o cB72.3).

30 Las Figuras 14A-14D son una serie de gráficos que muestran la concentración media de células viables (CCV) a 10^6 /ml de células transfectadas con el gen LMM indicado bajo el control del promotor indicado y un gen que codifica Etanercept (Figura 14A), Cergutuzumab (Figura 14B), Infliximab (Figura 14C) o cB72.3 (Figura 14D)). Los cultivos celulares se hicieron crecer en placas de pocillos profundos y se midió la CCV mediante recuento Celigo de células de cada cultivo/pocillo.

35 Las Figuras 15A-15D son una serie de gráficos que muestran la concentración media de células viables (CCV) a 10^6 /ml de células durante el sobrecrecimiento de lotes alimentados abreviado (aFOG, por sus siglas en inglés). Las células se transfectaron con el gen LMM indicado bajo el control del promotor indicado y un gen que codifica Etanercept (Figura 15A), Cergutuzumab (Figura 15B), Infliximab (Figura 15C) o cB72.3 (Figura 15D). Los cultivos celulares se hicieron crecer en placas de pocillos profundos y se midió la CCV mediante recuento Celigo de células de cada cultivo/pocillo.

40 Las Figuras 16A-16D son una serie de gráficos que muestran gráficos de burbujas de productividad específica de cultivos celulares que expresan un gen LMM y un gen de interés durante el aFOG. Las células se transfectaron con el gen LMM indicado bajo el control del promotor indicado y un gen que codifica Etanercept (Figura 16A), Cergutuzumab (Figura 16B), Infliximab (Figura 16C) o cB72.3 (Figura 16D). Los cultivos se hicieron crecer en placas de pocillos profundos y la CCV se midió mediante el recuento Celigo de células de cada cultivo/pocillo. La productividad se midió usando un instrumento Octet con biosensores de proteína A. Cada punto de datos mostrado corresponde a un cultivo individual; el diámetro de cada punto de datos muestra la concentración de producto alcanzada para ese cultivo.

45 Las Figuras 17A-17D son una serie de gráficos que muestran gráficos del intervalo de confianza del 95% de la concentración de producto para cultivos celulares que expresan un gen LMM y un gen de interés durante el aFOG. Las células se transfectaron con el gen LMM indicado bajo el control del promotor indicado y un gen que codifica Etanercept (Figura 17A), Cergutuzumab (Figura 17B), Infliximab (Figura 17C) o cB72.3 (Figura 17D). La productividad se midió usando un instrumento Octet con biosensores de proteína A. Cada punto de datos muestra el valor medio de la productividad del cultivo indicado con un intervalo de confianza para $p = 0,95$.

50 La Figura 18 es una serie de transferencias Western de lisados celulares de células CHO modificadas por ingeniería genética con SCD1 o SREBF1 aisladas usando un sistema de selección metabólica P5CS y células cultivadas en ausencia de prolina en el medio.

Las Figuras 19A-D muestran una serie de gráficos de las productividades específicas (Qp) de la célula contra la IVC de repositorios de células CHO modificadas por ingeniería genética SREBF1 o SCD1 con diferentes cantidades de expresión de estos genes modificadores del metabolismo de lípidos (LMM) posteriormente transfectados con los genes de Etanercept o Infiximab junto con el marcador de selección glutamina sintetasa y la expresión secretora de las moléculas de proteína recombinante evaluadas en biorreactores en miniatura en condiciones de lotes alimentados en ausencia de glutamina o prolina.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A no ser que se defina algo distinto, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. 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 títulos 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 distintos entre sí. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en este documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. En algunas realizaciones, el artículo “un” o “una” se refiere a uno solo del objeto gramatical del artículo. En algunas realizaciones, el artículo “un” o “una” se refiere a una pluralidad (por ejemplo, más de uno, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, “una célula” puede significar una célula o más de una célula (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más).

El término “aproximadamente”, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

Como se usa en este documento, el término “pluralidad” se refiere a más de uno (por ejemplo, dos o más) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, “una pluralidad de células” puede significar dos células o más de dos células.

Como se usa en este documento, el término “endógeno” se refiere a cualquier material de un organismo, célula, tejido o sistema o producido naturalmente dentro de los mismos.

Como se usa en este documento, el término “heterólogo” se refiere a cualquier material introducido y/o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema. Por consiguiente, “ácido nucleico heterólogo” se refiere a un ácido nucleico que se introduce y/o se produce fuera de un organismo, célula, tejido o sistema. En algunas realizaciones, las secuencias del ácido nucleico heterólogo no se producen de forma natural, o no se pueden encontrar de forma natural, dentro del organismo, célula, tejido o sistema en el que se introduce el ácido nucleico heterólogo. En algunas realizaciones, las secuencias del ácido nucleico heterólogo se pueden encontrar de forma natural dentro del organismo, célula, tejido o sistema (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una enzima o LMM, por ejemplo, descrito en el presente documento, que se encuentra naturalmente en una célula, expresándose luego el ácido nucleico en la célula para producir copias adicionales de la enzima o LMM). De manera similar, “polipéptido heterólogo” se refiere a un polipéptido que se introduce y/o se produce fuera de un organismo, célula, tejido o sistema. En algunas realizaciones, el polipéptido no se produce de forma natural, o no se puede encontrar de forma natural, dentro del organismo, célula, tejido o sistema en el que se introduce el polipéptido heterólogo, por ejemplo, mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo se puede encontrar naturalmente dentro del organismo, célula, tejido o sistema (por ejemplo, una enzima o LMM, por ejemplo, descrito en el presente documento, que se encuentra naturalmente en una célula que también se expresa ectópicamente en la célula). En ciertas realizaciones, se introduce un ácido nucleico o polipéptido heterólogo en un organismo, célula, tejido o sistema que comprende copias endógenas del mismo polipéptido o ácido nucleico, aumentando así la cantidad del polipéptido o ácido nucleico en el organismo, célula, tejido o sistema. En ciertos casos, el término “heterólogo” puede referirse a cualquier material procedente de una especie, cuando se introduce en un organismo, célula, tejido o sistema de una especie diferente. En algunos casos, los términos “heterólogo” y “exógeno” se utilizan indistintamente.

Como se usa en este documento, la expresión “molécula de enzima” se refiere a un polipéptido que tiene una actividad enzimática de interés. Una molécula de enzima puede compartir similitud estructural (por ejemplo,

homología de secuencia) con una enzima que tiene la actividad enzimática de interés. En algunos casos, la molécula de enzima tiene al menos un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) con respecto a una enzima que tiene la actividad enzimática de interés. En algunos casos, el término “molécula”, cuando se usa con un identificador de una enzima (por ejemplo, pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS)), se refiere a un polipéptido que tiene la actividad enzimática de la enzima identificada. A título de ejemplo, la expresión “molécula de P5CS”, como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido que tiene la actividad enzimática de P5CS. En algunos casos, la molécula de P5CS tiene al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) con respecto a una enzima P5CS (por ejemplo, una P5CS de mamífero).

Como se usan en este documento, las expresiones “ácido nucleico”, “polinucleótido” o “molécula de ácido nucleico” se usan indistintamente y se refieren a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o a una combinación de un ADN o ARN de los mismos, y a polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión “ácido nucleico” incluye, sin limitación, un gen, ADNc o una secuencia de ARN (por ejemplo, un ARNm). En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (por ejemplo, sintetizada químicamente o artificial) o recombinante. A no ser que se limite específicamente, la expresión 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 una manera similar a los nucleótidos de origen natural o no natural. A no ser que se indique algo distinto, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes de la misma modificadas de manera conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP (polimorfismos de nucleótido único, por sus siglas en inglés) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida 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); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Por “ácido nucleico concreto”, como se usa en este documento, se entiende cualquier ácido nucleico de interés que comprenda, por ejemplo, una secuencia que codifique un producto descrito en este documento, que puede introducirse o estar presente dentro de una célula como se describe en este documento.

Como se usan en este documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se utilizan de forma intercambiable y se refieren a un compuesto formado 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 al número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. En una realización, una proteína puede comprender más de un polipéptido - por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más-, estando asociado cada polipéptido a otro mediante enlaces/interacciones covalentes o no covalentes. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por medios distintos a los enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica 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”, como se usa el término en este documento, se refiere a una molécula, por ejemplo, polipéptido, por ejemplo, proteína, por ejemplo, glicoproteína, ácido nucleico, lípido, sacárido, polisacárido o cualquier híbrido de los mismos, que se produce, por ejemplo, expresado por una célula; por ejemplo, una célula que ha sido modificada o diseñada para producir el producto. En una realización, el producto es un producto de proteína o polipéptido. En una realización, el producto comprende un producto de origen natural. En una realización, el producto comprende un producto no natural. En una realización, una parte del producto es de origen natural, mientras que otra parte del producto no es de origen natural. En una realización, el producto es un polipéptido; por ejemplo, un polipéptido recombinante. En una realización, el producto es adecuado para uso diagnóstico o preclínico. En otra realización, el producto es adecuado para uso terapéutico; por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, un producto es un producto proteico. En algunas realizaciones, un producto es una proteína recombinante o terapéutica descrita en el presente documento; por ejemplo, en las Tablas 5-8.

Como se usa en este documento, el término “promotor” se refiere a una secuencia que tiene secuencias suficientes, por ejemplo, de un promotor de origen natural o diseñado por ingeniería genética de manera que el enlace operativo de una secuencia codificante al promotor da como resultado la expresión de la secuencia codificante. Por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) comprende la totalidad o un fragmento activo del promotor de CMV, por ejemplo, la totalidad o un fragmento activo del promotor de CMV que incluye opcionalmente las secuencias del intrón A y/o UTR. En una realización, un promotor de CMV difiere en no más de 5, 10, 20, 30, 50 o 100 nucleótidos de un promotor de CMV variante de origen natural o diseñado por ingeniería genética. En una realización, un promotor de CMV difiere en no más del 1, 5, 10 o 50% de sus nucleótidos de un promotor de CMV variante de origen natural o diseñado por ingeniería genética. Los promotores, como se usan en este documento, pueden ser propiedades

constitutivas, reguladas, reprimibles, fuertes, débiles u otras de las secuencias promotoras que comprenden los promotores. En una realización, un promotor puede comprender secuencias 5' o 3' de una secuencia codificante; por ejemplo, la secuencia codificante de un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un promotor puede comprender secuencias dentro de uno o más intrones de un gen; por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un promotor puede estar comprendido, en parte o en su totalidad, dentro de las secuencias 5' o 3' de una secuencia codificante; por ejemplo, la secuencia codificante de un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un promotor puede estar comprendido, en parte o en su totalidad, dentro de uno o más intrones de un gen; por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor.

Como se usa en este documento, la expresión "operativamente enlazado" se refiere a una relación entre una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) y un elemento de control, estando la secuencia que codifica un polipéptido y el elemento de control operativamente enlazados si están dispuestos de una manera adecuada para que el elemento de control regule la expresión de la secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido). Por tanto, para diferentes elementos de control, su enlace operativo constituirá diferentes disposiciones de la secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) en relación con el elemento de control. Por ejemplo, una secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) se puede unir operativamente a un elemento de control que comprende un elemento promotor si el elemento promotor y la secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) están dispuestos próximos entre sí y en el mismo ácido nucleico. En otro ejemplo, una secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) se puede unir operativamente a un elemento de control que comprende una secuencia potenciadora que opera distalmente si la secuencia potenciadora y la secuencia que codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido) están dispuestas en un número adecuado de bases separadas en el mismo ácido nucleico, o incluso en ácidos nucleicos distintos y separados.

Como se usa en este documento, la expresión "elemento de control" se refiere a un ácido nucleico adecuado para regular (por ejemplo, aumentar o disminuir) la expresión de una secuencia codificante; por ejemplo, un gen. Los elementos de control pueden comprender secuencias promotoras, secuencias potenciadoras o secuencias tanto promotoras como potenciadoras. Los elementos de control pueden comprender secuencias de ácido nucleico continuas, secuencias de ácido nucleico discontinuas (secuencias interrumpidas por otras secuencias de ácido nucleico codificantes o no codificantes), o ambas. Un solo elemento de control puede estar comprendido en un solo ácido nucleico o en más de un ácido nucleico. En una realización, un elemento de control puede comprender secuencias 5' o 3' de una secuencia codificante; por ejemplo, la secuencia codificante de un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un elemento de control puede comprender secuencias dentro de uno o más intrones de un gen; por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un elemento de control puede estar comprendido, en parte o en su totalidad, dentro de las secuencias 5' o 3' de una secuencia codificante; por ejemplo, la secuencia codificante de un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un elemento de control puede estar comprendido, en parte o en su totalidad, dentro de uno o más intrones de un gen; por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor. En una realización, un único elemento de control puede comprender secuencias de ácido nucleico i) proximales a un gen (por ejemplo, adyacentes o contenidas en el mismo)-por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor-, o ii) distales a un gen (por ejemplo, separadas por 10 o más, 100 o más, 1000 o más, o 10.000 o más bases, o dispuestas en un ácido nucleico distinto y separado)-por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido recombinante, terapéutico o represor-.

"Modificador del metabolismo de lípidos" o "LMM", como se usa en este 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 (por ejemplo, transcripción o traducción) de un componente involucrado en una vía de metabolismo de lípidos; la actividad (por ejemplo, actividad enzimática) de un componente-por ejemplo, un producto génico-implicado en una vía de metabolismo de lípidos; el nivel o la cantidad de lípidos presentes en una célula; el nivel o la cantidad de balsas lipídicas o la velocidad de formación de las balsas lipídicas; la fluidez, la permeabilidad o el grosor de una membrana celular-por ejemplo, una membrana plasmática o una membrana de orgánulos-; la conversión de lípidos saturados en lípidos insaturados o viceversa; el nivel o la cantidad de lípidos saturados o lípidos insaturados en una célula-por ejemplo, lípidos monoinsaturados-; la composición lipídica para lograr una composición lipídica favorable que tenga un impacto favorable en la actividad del RE; la expansión del RE; la expansión del aparato de Golgi; el nivel o la cantidad de vesículas secretoras o la formación de vesículas secretoras; el nivel o la tasa de secreción; la activación o la inactivación de receptores de membrana (por ejemplo, ATR (véase, por ejemplo, "The increase of cell-membranous phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acid residues induces phosphorylation of p53 through activation of ATR", Zhang XH, Zhao C, Ma ZA. J Cell Sci., 1 de diciembre de 2007; 120 (Pt 23):4134-43 PMID: 18032786; la ATR (quinasa relacionada con ataxia telangiectasia mutada y con Rad3) se activa por hipotermia leve en células de mamíferos y posteriormente activa p53. Roobol A, Roobol J, Carden MJ, Bastide A, Willis AE, Dunn WB, Goodacre R, Smales CM. Biochem J. 15 de abril de 2011; 435

(2): 499-508. doi: 10.1042 / BJ20101303. PMID: 21284603) y SREPB (ver por ejemplo, Int J Biol Sci. 21 de marzo de 2016; 12 (5): 569-79. doi: 10.7150 / ijbs.14027. eCollection 2016. Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury, Zhang Y, Ma KL, Ruan XZ, Liu BC); y de receptores adicionales, véase, por ejemplo, Biochim Biophys Acta. 17 de marzo de 2016 pii: S1388-1981 (16) 30071-3. doi: 10.1016 / j.bbali.2016.03.019; y/o la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés). En una realización, el LMM comprende un polipéptido. En una realización, el LMM comprende un regulador transcripcional; por ejemplo, un factor de transcripción. En una realización, el LMM comprende SREBF1 o un fragmento funcional de la misma (por ejemplo, SREBF-410). En una realización, el LMM comprende una enzima. En una realización, el LMM comprende SCD1 o un fragmento funcional de la misma.

10 Métodos para identificar, seleccionar o cultivar células

En un aspecto, la invención de la divulgación se refiere a un método para identificar, seleccionar y/o cultivar un compuesto que comprende una secuencia de ácido nucleico concreta, comprendiendo el método:

a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico heterólogo, que comprende:

(i) la secuencia de ácido nucleico concreta; y

15 (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS); y

b) cultivar la célula que comprende la secuencia de ácido nucleico en presencia de un medio que tiene un nivel insuficiente de prolina para soportar el crecimiento de una célula que es igual que el de la célula que no tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de P5CS, en condiciones suficientes para permitir para el crecimiento de una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el medio, además, un inhibidor de la actividad de la enzima; identificando, seleccionando o cultivando así una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

El inhibidor se puede usar para aumentar la rigurosidad del proceso de selección reduciendo o previniendo la actividad de la molécula enzimática endógena, por ejemplo, de manera que las células que no absorben el ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico concreta exhiban niveles reducidos o indetectables de actividad de la molécula enzimática endógena. Es posible que las células que presentan niveles reducidos o indetectables de actividad de la molécula de enzima endógena no puedan crecer ni/o sobrevivir en ausencia de un suministro externo del aminoácido para el que la síntesis requiere la actividad de la molécula de enzima (por ejemplo, prolina, tirosina o triptófano). En algunas realizaciones, el inhibidor se une a la molécula de enzima; por ejemplo, se une e inhibe la molécula de enzima. En realizaciones, el inhibidor es un inhibidor alostérico de la molécula de enzima. En realizaciones, el inhibidor es un inhibidor competitivo de la molécula de enzima. En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe la transcripción o traducción de la molécula de enzima, por ejemplo, la transcripción o traducción endógena de la molécula de enzima. En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe una molécula de enzima en la vía de biosíntesis de prolina, tirosina o triptófano. Según la invención, el inhibidor inhibe la actividad de una molécula de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS). En realizaciones, el inhibidor inhibe la actividad de P5CS. En realizaciones, el inhibidor es un análogo de prolina. En realizaciones, el inhibidor es ácido L-azetidina-2-carboxílico, 3,4-deshidro-L-prolina o ácido L-4-tiazolidincarboxílico.

En algunas realizaciones, el método incluye además una o más etapas de cultivo adicionales. En algunas realizaciones, las una o más etapas de cultivo adicionales comprenden cultivar la célula en presencia de un segundo medio (por ejemplo, la misma composición de medio que se usó en la primera etapa de cultivo o un medio diferente al usado en la primera etapa de cultivo). En realizaciones, la primera etapa de cultivo utiliza un medio que comprende un nivel insuficiente -por ejemplo, que carezca- de prolina y la segunda etapa de cultivo utiliza un medio que comprende un nivel insuficiente -por ejemplo, que carezca- de un segundo aminoácido (por ejemplo, tirosina o triptófano). En realizaciones, la célula comprende una molécula de enzima que rescata la producción del primer aminoácido y/o una molécula de enzima que rescata la producción del segundo aminoácido solo si la célula comprende además un ácido nucleico de interés. Se contempla que este planteamiento pueda extenderse a etapas de cultivo adicionales, cada una de las cuales implica un medio que comprende un nivel insuficiente -por ejemplo, que carezca- de un aminoácido (por ejemplo, el mismo aminoácido o uno diferente de los que faltan en el primer o segundo cultivo medio) y la célula que comprende una molécula de enzima capaz de rescatar la producción del aminoácido (por ejemplo, el mismo aminoácido o uno diferente de los que faltan en el primer o segundo medio de cultivo). En realizaciones, el medio usado en una etapa de cultivo adicional comprende un inhibidor del aminoácido que falta en el cultivo usado en la etapa de cultivo adicional. En algunas realizaciones, las etapas de cultivo se pueden realizar al mismo tiempo; por ejemplo, usando un medio que comprende un nivel insuficiente -por ejemplo, que carezca- de una pluralidad de aminoácidos. En algunas realizaciones, solo un subconjunto de las etapas de cultivo comprende el uso de un inhibidor de la molécula de enzima. Por ejemplo, la primera etapa de cultivo comprende el uso de un inhibidor de la molécula de enzima, seguida de etapas de cultivo que no comprenden el uso del inhibidor de la molécula de enzima.

En algunas realizaciones, el método puede usarse para generar una célula que comprende un ácido nucleico heterólogo; por ejemplo, una célula útil para producir un producto; por ejemplo, un producto polipeptídico, por

ejemplo, un anticuerpo.

Moléculas enzimáticas e inhibidores de las mismas

La invención generalmente presenta métodos para seleccionar células en las que se introduce un ácido nucleico seleccionando para la expresión de una molécula de enzima involucrada en la biosíntesis de un aminoácido. La molécula de enzima puede introducirse en la célula junto con el ácido nucleico concreto. Por ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico en la célula que comprende tanto el ácido nucleico concreto como un gen que codifica la molécula enzimática, de manera que la molécula enzimática se expresa en la célula. En algunas realizaciones, las células que comprenden el ácido nucleico en cuestión exhiben una actividad elevada de la molécula de enzima en comparación con las células que carecen del ácido nucleico en cuestión. En algunas realizaciones, el nivel de actividad de la molécula enzimática aumenta en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 500%, 1000% o más en relación con la actividad de la molécula enzimática detectable en células que carecen del ácido nucleico concreto. En algunas realizaciones, las células con la actividad elevada pueden crecer más rápidamente que las células que carecen del ácido nucleico concreto. En algunas realizaciones, la célula comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10.000 o más copias de un ácido nucleico que codifica la enzima. En realizaciones, las células con la actividad elevada crecen al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 5000 o 10.000 veces más rápidamente en medios que carecen del aminoácido que las células que carecen del ácido nucleico concreto. A continuación, las células pueden cultivarse en medios que carecen del aminoácido para seleccionar las células que han absorbido el ácido nucleico en cuestión. En algunas realizaciones, la selección comprende seleccionar una o más células que exhiben crecimiento en medios que carecen del aminoácido.

Inhibidores de moléculas enzimáticas

Las células descritas en el presente documento pueden, en algunas realizaciones, comprender además un inhibidor de una molécula de enzima que está siendo expresada por un ácido nucleico introducido en la célula (por ejemplo, el ácido nucleico concreto o un segundo ácido nucleico). El inhibidor puede, por ejemplo, servir para reducir o bloquear la actividad de la molécula de enzima producida endógenamente por la célula y/o para reducir o bloquear el crecimiento de células revertientes, actuando de ese modo para aumentar la rigurosidad de, por ejemplo, los métodos de selección descritos en este documento. En algunas realizaciones, el nivel de inhibidor en la célula es suficiente para reducir la actividad de la molécula de enzima endógena a menos de aproximadamente 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% de lo observado en una célula que carece del inhibidor. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% o 10% de las células seleccionadas en función del crecimiento en medios que carecen del aminoácido no comprenden el ácido nucleico en cuestión. En algunas realizaciones, la proporción de moléculas de enzima y moléculas inhibidoras en la célula es aproximadamente 1:1000, 1:500, 1:250, 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 250:1, 500:1 o 1000:1.

El inhibidor puede ser, por ejemplo, un aminoácido o análogo del mismo, un polipéptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor es un análogo del aminoácido producido por la vía biosintética en la que participa la molécula de enzima. En algunas realizaciones, el inhibidor es una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, como se describe en este documento), una proteína de fusión, una hormona, una citocina, un factor de crecimiento, una enzima, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína indicadora, un péptido terapéutico, un aptámero o un fragmento o híbrido estructural y/o funcional de cualquiera de estos. En algunas realizaciones, el inhibidor es un ARN antisentido, ARNip, ARNt, ARN ribosómico, microARN, ARNpi, ARNnop, ARNnp, ARNex, ARNca o ARN no codificante largo.

Ejemplos no limitantes de moléculas enzimáticas e inhibidores de las mismas que pueden usarse en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de moléculas enzimáticas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos e inhibidores ejemplares de las mismas

Aminoácidos	Molécula de enzima	Inhibidores
Alanina	Glutamato deshidrogenasa	
	Aminotransferasa	
Leucina	Acetolactato sintasa	
	Isomerorreductasa de acetohidroxiácido	
	Dihidroxiácido deshidratasa	
	α-isopropilmalato sintasa	
	α-isopropilmalato isomerasa	

ES 2 871 818 T3

	Leucina aminotransferasa	
Isoleucina	Acetolactato sintasa	
	Isomerorreductasa de acetohidroxiácido	
	Dihidroxiácido deshidratasa	
	Valina aminotransferasa	
Metionina	Enzima dependiente de PLP de metabolismo de Cys/Met	
	Cistationina- γ -sintasa	β -cianoalanina (por ejemplo, a $14 \pm 0,2 \mu\text{M}$) Propargilglicina (por ejemplo, a $40 \pm 8 \mu\text{M}$) Acido aminooxicético (por ejemplo, a $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) L-aminoetoxivinilglicina
	Cistationina- β -liasa	
	O-acetilhomoserina aminocarboxipropiltransferasa	
	Metionina sintasa (por ejemplo, 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa)	
	Aspartoquinasa	
	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	
	Homoserina deshidrogenasa	
	Homoserina O-transsuccinilasa	
Valina	Acetolactato sintasa	
	Isomerorreductasa de acetohidroxiácido	
	Dihidroxiácido deshidratasa	
	Valina aminotransferasa	
Fenilalanina	Corismato mutasa	
	Prefenato deshidratasa	
	Aminotransferasa aromática I	
	Aminotransferasa aromática II	
	Pretirosina deshidratasa	
Triptófano	Antranilato sintasa	
	Antranilato PR transferasa	
	Fosforribosil antranilato isomerasa	
	IGP sintasa	
	3-fosfo-gliceraldehído	
Tirosina	Fenilalanina hidroxilasa	
	Corismato mutasa	
	Prefenato aminotransferasa	
	Pretirosina deshidrogenasa	
Asparagina	Transaminasa	
	Asparagina sintetasa	
Cisteína	Cistationina beta sintasa	
	Cistationina gamma liasa	
	Serina transacetilasa	
	O-acetilserina (tiol)-liasa	
Glutamina	Glutamina sintetasa	

ES 2 871 818 T3

Serina	Fosfoglicerato deshidrogenasa	O-acetil-L-serina (por ejemplo, a 1,4 mM) L-alotreonina (por ejemplo, a 1,5 mM) Glicina (por ejemplo, a 1,8 mM) L-alanina (por ejemplo, a 3,0 mM) L-serinamida (por ejemplo, a 3,8 mM) L-cisteina (por ejemplo, a 4,1 mM) L-homoserina (por ejemplo, a 5,1 mM) N-Cbz-L-serina (por ejemplo, a 15,0 mM) L-o-aminobutirato (por ejemplo, a 18,5 mM) L-treonina (por ejemplo, a 27,0 mM) N-o-bencil-L-serina (por ejemplo, a 50,0 mM)
	Fosfoserina transaminasa	
	Fosfoserina fosfatasa	
	Serina hidroximetiltransferasa	
Treonina	Aspartoquinasa	
	β -aspartato semialdehído deshidrogenasa	
	Homoserina deshidrogenasa	
	Homoserina quinasa	
	Treonina sintasa	
Ácido aspártico	Piruvato carboxilasa	
	Aspartato aminotransferasa mitocondrial	
	Aspartato aminotransferasa citosólica	
Ácido glutámico	Glutaminasa	
	N-acetil-glutamato sintasa	
	Glutamato deshidrogenasa	
	Aldehído deshidrogenasa ALDH4A1	
	Formimidoltransferasa ciclodesaminasa	
	Glutamato carboxipeptidasa II	
Arginina	Argininosuccinato sintetasa	
	Argininosuccinato liasa	
	Ornitina carbamoiltransferasa	
	Ornitina acetiltransferasa mitocondrial	
	Acetilornitina aminotransferasa	
	Acetilglutamato quinasa	
	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	
	Acetilglutamato sintasa	
Histidina	ATP fosforribosiltransferasa	
	Histidinol deshidrogenasa trifuncional/fosforribosil-AMP ciclohidrolasa/fosforribosil-ATP difosfatasa	
	1-(5-fosforribosil)-5-((5-fosforribosilamino) metilidenoamino) imidazol-4-carboxamida isomerasa	
	Imidazol glicerol fosfato sintasa	
	Histidinol-fosfato aminotransferasa	
	Histidinolfosfatasa	
Lisina	Aspartoquinasa	
	β -aspartato semialdehído deshidrogenasa	
	4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa	
	4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato reductasa	
	Tetrahidrodipicolinato N-acetiltransferasa	
	Succinil diaminopimelato aminotransferasa	
	Succinil diaminopimelato desuccinilasa	

	Diaminopimelato epimerasa	
	Diaminopimelato descarboxilasa	
Glicina	Serina hidroximetiltransferasa	
	Glicina sintasa	
Prolina	Pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS)	Prolina Análogos de prolina (por ejemplo, ácido L-azetidina-2-carboxílico, 3,4-deshidro-L-prolina o ácido L-4-tiazolidinacarboxílico)
	Glutamato 5-quinasa	
	Pirrolina-5-carboxilato reductasa	

Según la invención, el inhibidor inhibe la actividad de una molécula de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS). En realizaciones, el inhibidor inhibe la actividad de P5CS. En realizaciones, el inhibidor es prolina o un análogo de prolina. En realizaciones, el inhibidor es ácido L-azetidina-2-carboxílico, 3,4-deshidro-L-prolina o ácido L-4-tiazolidinacarboxílico.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor inhibe una molécula de enzima en la vía de biosíntesis de tirosina; por ejemplo, una molécula de enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la vía de biosíntesis de tirosina. Como se describe en el presente documento, el inhibidor es un análogo de tirosina.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor inhibe una molécula de enzima en la vía de biosíntesis de triptófano; por ejemplo, una molécula de enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la vía de biosíntesis de triptófano. Como se describe en el presente documento, el inhibidor es un análogo de triptófano.

Modificadores del metabolismo lipídico

La presente divulgación presenta métodos y composiciones para producir células que comprenden un ácido nucleico heterólogo. En algunos casos, las células comprenden además un modificador del metabolismo de los lípidos (LMM), generalmente bajo el control de un promotor, capaz de modular el metabolismo de los lípidos en la célula. En realizaciones, los LMM comprenden reguladores globales que impactan en múltiples aspectos de las vías o procesos involucrados en el metabolismo de los lípidos, por ejemplo, lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación o desaturación de ácidos grasos, alargamiento de ácidos grasos y vías de biosíntesis de fosfolípidos. A título de ejemplo, el regulador global está corriente arriba en una o más vías o procesos de metabolismo de lípidos de manera que el regulador global impacta en varios- por ejemplo, dos o más- procesos corriente abajo o componentes corriente abajo del metabolismo de lípidos. En una realización, el regulador global es un factor de transcripción que puede activar la expresión de más de un gen diana- por ejemplo, dos o más- implicados en diferentes procesos o vías de metabolismo de lípidos. En consecuencia, sin desear entrar en ninguna consideración teórica, el uso de un regulador global como se describe en este documento puede resultar en un aumento en la capacidad de producción, robustez y supervivencia de la célula mayor que con el uso de un efector aguas abajo que modula solo una única diana u otro componente del metabolismo de los lípidos. Aunque no se entre en ninguna consideración teórica, se cree que una modulación global o más generalizada de múltiples vías de metabolismo de 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 robustez de la célula.

Las vías del metabolismo de los lípidos descritas en el presente documento se refieren a procesos que se relacionan con la síntesis, la degradación, la conversión o la modificación de lípidos o moléculas asociadas a lípidos. Las moléculas de lípidos incluyen, sin limitación, ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, fosfolípidos, sacarolípidos, esfingolípidos y lípidos de esterol; por ejemplo, colesterol y policétidos. Ejemplos de vías de metabolismo de los lípidos incluyen, sin limitación: lipogénesis *de novo*, reesterificación de ácidos grasos, saturación de ácidos grasos, desaturación de ácidos grasos, alargamiento de ácidos grasos y biosíntesis de fosfolípidos. En una realización, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una célula que comprende una modificación que modula el metabolismo de los lípidos. La modificación que modula el metabolismo de los lípidos puede ser un agente que aumente o disminuya la expresión de un componente involucrado en el metabolismo de los lípidos. En una realización, 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 tales 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 nucleico descritos en el presente documento; por ejemplo, transducción o transfección.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento proporcionan una célula que comprende una o más- por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez- modificaciones que modulan el metabolismo de los lípidos. En realizaciones en las que 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, cada uno de los dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifican un LMM se puede ubicar dentro de la misma molécula de ácido nucleico, o se puede colocar en dos o

más moléculas de ácido nucleico diferentes. En tales 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. En algunas realizaciones, se expresa en la célula una pluralidad de LMM heterólogos diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más LMM; por ejemplo, como se describe en el presente documento). En determinadas realizaciones, la célula expresa naturalmente uno o más de los LMM heterólogos. En determinadas realizaciones, la célula no expresa naturalmente uno o más de los LMM heterólogos.

En una realización, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos aumenta o disminuye la expresión o actividad de un componente implicado en una o más vías de metabolismo de los lípidos. En algunas realizaciones, la modulación del metabolismo de los lípidos de una célula da como resultado la alteración de la distribución espacial de los lípidos en la célula, por ejemplo, la distribución espacial de los lípidos en la membrana celular (por ejemplo, en balsas lipídicas), un orgánulo (por ejemplo, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, vacuolas y/o mitocondrias), exosomas, gotas lipídicas o cualquier otra región o compartimento de una célula que comprenda lípidos. En realizaciones en las que la modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en la expresión- por ejemplo, la transcripción o traducción- o un aumento en la actividad de un componente de una vía del metabolismo de los lípidos, el componente es un regulador positivo de la vía del metabolismo de los lípidos. En realizaciones en las que la modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una disminución en la expresión- por ejemplo, transcripción, traducción, recambio y/o degradación- o una disminución en la actividad de un componente de una vía de metabolismo de lípidos, el componente es un regulador negativo de la vía del metabolismo de los lípidos. Los ensayos para cuantificar la expresión- por ejemplo, transcripción y/o traducción- de un gen de la vía del metabolismo de los lípidos son conocidos en la técnica e incluyen cuantificar 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 micromatrices. Los ensayos para cuantificar la actividad de un componente de la vía del metabolismo de los lípidos- por ejemplo, una enzima de la vía del metabolismo de los lípidos- serán específicos del componente particular de la vía del metabolismo de los lípidos.

En realizaciones en las que la modulación del metabolismo de lípidos de una célula da como resultado un aumento en el nivel o la cantidad de lípidos en la célula, se puede aumentar el nivel total o la cantidad total de lípidos en la célula. En algunas realizaciones, la modulación del metabolismo de los lípidos de una célula da como resultado la alteración de la distribución espacial de los lípidos en la célula; por ejemplo, la distribución espacial de los lípidos en la membrana celular (por ejemplo, en balsas lipídicas), un orgánulo (por ejemplo, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, vacuolas y/o mitocondrias), exosomas, gotas lipídicas o cualquier otra región o compartimento de una célula que comprenda lípidos. En una realización, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento de la supervivencia celular. En una realización, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado una mayor viabilidad del cultivo. En una realización, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento de la proliferación celular. En una realización, una modificación que modula el metabolismo de los lípidos da como resultado un aumento en la capacidad de producción, por ejemplo, la cantidad o el rendimiento del producto producido, o la tasa de producción. En una realización, 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, plegado o ensamblaje adecuado, modificación postraduccional o alteración de enlaces disulfuro.

En una realización, un LMM se sobreexpresa en una célula, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo que codifica un LMM (por ejemplo, un ácido nucleico que se origina en el exterior de la célula; por ejemplo, un constructo de ácido nucleico que comprende un gen que codifica un LMM) o mediante el aumento de la expresión mediante la introducción de elementos promotores u otros elementos transcripcionales reguladores. En algunas realizaciones, la célula comprende copias endógenas del LMM que se sobreexpresa en la célula. En otras realizaciones, la célula no comprende copias endógenas del LMM que se sobreexpresa en la célula. En otra realización, 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. Ejemplos de ácidos nucleicos inhibidores incluyen ARN de interferencia cortos (ARNip) y ARN en horquilla cortos (ARNhc) que tienen el LMM como diana; por ejemplo, el ARNm que codifica el LMM. En una realización, la actividad o la expresión de un LMM aumenta o disminuye alterando las modificaciones postraducionales u otros mecanismos reguladores endógenos que regulan la actividad o la expresión de LMM. La regulación por modificaciones postraducionales incluye, sin limitación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, acetilación, metilación o glicosilación puede aumentar o disminuir la expresión o la actividad del LMM. A título de ejemplo, la regulación de modificaciones postraducionales se puede lograr mediante la modulación de la enzima o la molécula que modifica el LMM, o la modificación del LMM, de manera que la modificación postraduccional no pueda ocurrir u ocurra con mayor frecuencia o constitutivamente. La regulación del LMM también puede incluir la modulación de mecanismos reguladores endógenos que pueden aumentar o disminuir la expresión o la actividad del LMM; por ejemplo, aumentar o disminuir uno o más de: regulación de miARN, escisión de proteínas, expresión de isoformas específicas, empalme alternativo y degradación. En una realización, el LMM modula- por ejemplo, aumenta o disminuye- la expresión- por ejemplo, la transcripción o la actividad- de un componente de la vía del metabolismo de

los lípidos. En otra realización, el LMM modula-por ejemplo, aumenta o disminuye-la síntesis, degradación, el alargamiento o la conformación estructural (por ejemplo, saturación o desaturación, o esterificación) de un lípido o molécula asociada a lípidos. Los LMM ejemplares y/o componentes de la vía del metabolismo de los lípidos se enumeran, sin limitación, en la Tabla 2.

5 **Tabla 2. Vías y componentes del metabolismo de los lípidos/productos genéticos de los mismos**

Vía	Componente/producto génico
Reguladores globales del metabolismo de los lípidos	SREBF1 (factor 1 de transcripción de unión a elemento regulador de esterol), por ejemplo, Isoforma c de SREBF1 truncada (SREB411) SREBF2 (factor de transcripción 2 de unión a elementos reguladores de esterol) PRMT5
Lipogénesis <i>de novo</i>	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 (fosfolina citidiltransferasa) CDS (fosfatidato citidiltransferasa) CEPT (diacilglicerol colina/etanolaminafosfotransferasa) CERT (proteína de transferencia de ceramida) CGT (N-acilesfingosina galactosiltransferasa) CPT (diacilglicerol colinafosfotransferasa) CLS (cardiolipina sintasa) CRD (ceramidasa) GNPAT (glicerona-fosfato O-aciltransferasa) KDSR (3-cetoesfingina reductasa) LCS (polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa) PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico) PEMT (fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa) PGP (fosfatidilglicerofosfatasa) PGS (CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferasa) PIS (CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferasa) PSD (fosfatidilserina descarboxilasa) PSS1 (fosfatidilserina sintasa 1) PSS2 (fosfatidilserina sintasa 2) SGMS (ceramida colina fosfotransferasa) SNAT (esfingosina N-aciltransferasa) SPK (esfingina quinasa) SPP (esfingosina-1-fosfato fosfatasa) SPT (serina co-palmitoiltransferasa)
Desaturación de ácidos grasos	SCD1 (estearoil CoA desaturasa-1) SCD2 (estearoil CoA desaturasa-2) SCD3 (estearoil CoA desaturasa-3) SCD4 (estearoil CoA desaturasa-4) SCD5 (estearoil CoA desaturasa-5) PED (plasmaniletanolamina desaturasa)
Regulación de SREBF1 y otras vías	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-metilglutatril-CoA reductasa) Receptores PPAR; por ejemplo, PPAR α , PPAR γ

10 En realizaciones, el LMM comprende al menos 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, por ejemplo, producto génico, implicado en una vía de metabolismo de lípidos, por ejemplo, proporcionado en la Tabla 2; 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, por ejemplo, producto génico, involucrado en la vía del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, proporcionada en la Tabla 2.

15 En realizaciones, el LMM comprende un fragmento funcional de un componente implicado en la vía del metabolismo de lípidos proporcionado, por ejemplo, en la Tabla 2. Un fragmento funcional de un LMM descrito en este documento puede comprender uno o más dominios funcionales del LMM. A título de ejemplo, un fragmento funcional de un LMM que es un factor de transcripción comprende un dominio de unión al ADN y un dominio de transactivación. A título de ejemplo, un fragmento funcional de un LMM que es una enzima comprende un dominio con actividad enzimática. Un

fragmento funcional de un LMM descrito en el presente documento conserva la actividad funcional-por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad- del LMM completo. Los fragmentos funcionales de un LMM pueden ser determinados experimentalmente por un experto en la técnica, o pueden predecirse usando algoritmos basados en la homología de secuencia de dominios funcionales. A continuación se describen con más detalle LMM ejemplares.

En cualquiera de las realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el LMM puede ser un regulador de la transcripción. En realizaciones, 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 la transcripción de uno o más productos génicos involucrados en el metabolismo de lípidos. En realizaciones, el LMM se une a un elemento de unión a esterol y/oa secuencias promotoras E-box. En realizaciones, el LMM comprende el factor 1 de unión al elemento regulador de esterol (SREBF1) o el factor 2 de unión al elemento regulador de esterol (SREBF2) o un fragmento funcional o isoforma del mismo.

En algunas realizaciones, el LMM comprende un factor de transcripción o activador transcripcional global. En realizaciones, el LMM es capaz de modular la transcripción de dos o más-por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más- componentes de una vía de metabolismo de lípidos, proporcionados, por ejemplo, en cualquiera de las Tablas 3 o 4. En realizaciones, 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 vías de metabolismo de lípidos; por ejemplo, componentes y vías proporcionados en la Tabla. 2.

El factor 1 de unión del elemento regulador de esterol (SREBF1) es un activador transcripcional global que regula al alza 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 a secuencias promotoras del elemento regulador de esterol (SER, por sus siglas en inglés) y E-box(Hagen, Rodríguez-Cuenca et al. 2010) presentes en las regiones promotoras de genes diana. La transcripción del propio gen SREBF1 está regulada de forma endógena por la presencia del elemento regulador de esterol (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 estrictamente controlado pero adaptable fijado alrededor de SREBF1.

En algunas realizaciones, el LMM comprende una enzima. En realizaciones, el LMM comprende una enzima que convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos insaturados. En realizaciones, el LMM comprende una enzima que convierte ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados; por ejemplo, ácidos grasos con un doble enlace. En realizaciones, el LMM comprende una enzima que convierte ácidos grasos saturados en ácidos grasos poliinsaturados; por ejemplo, ácidos grasos con más de undoble enlace; por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más. En realizaciones, el LMM comprende estearoil CoA desaturasa 1 (SCD1), estearoil CoA desaturasa 2 (SCD2), estearoil CoA desaturasa 3 (SCD3), estearoil CoA desaturasa 4 (SCD4), estearoil CoA desaturasa 5 (SCD5), una isoforma del mismo, o un fragmento funcional del mismo.

En algunas realizaciones, un LMM presente en una célula descrito en el presente documento está bajo el control de un promotor. Idealmente, el promotor se empareja con el gen LMM para maximizar la producción de LMM por la célula. Ejemplos no limitantes de promotores que pueden usarse para regular la expresión de un LMM incluyen los promotores SV40, mCMV y PGK. En la Tabla 3 se muestran ejemplos no limitantes de combinaciones de promotores y genes LMM, por ejemplo, que pueden usarse, por ejemplo, en cualquiera de los métodos o composiciones (por ejemplo, células) descritos en el presente documento. Se contempla que cualquiera de estas combinaciones pueda estar presente en una célula que comprende P5CS, introducida en la célula, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

Tabla 3. Combinaciones ejemplares de promotor-LMM

Promotor	Modificador del metabolismo lipídico
SV40	SCD1 (ratón)
SV40	SCD1 (CHO)
SV40	SREBF1 (CHO)
SV40	SREB411 (CHO)
mCMV	SCD1 (ratón)
mCMV	SCD1 (CHO)
mCMV	SREBF1 (CHO)
mCMV	SREB411 (CHO)
hCMV	SCD1 (ratón)

Promotor	Modificador del metabolismo lipídico
hCMV	SCD1 (CHO)
hCMV	SREBF1 (CHO)
hCMV	SREB411 (CHO)
PGK	SCD1 (ratón)
PGK	SCD1 (CHO)
PGK	SREBF1 (CHO)
PGK	SREB411 (CHO)

5 Cualquiera de las combinaciones de promotor-LMM descritas en el presente documento puede estar presente en combinación adicional con un gen que codifica una molécula de enzima, por ejemplo, en cualquiera de las células, ácidos nucleicos u otras composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, cualquiera de las combinaciones de promotor-LMM descritas en el presente documento puede estar presente en una célula que además comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de P5CS y que comprende un ácido nucleico concretodescrito en el presente documento. Además, cualquiera de las combinaciones de promotor-LMM descritas en el presente documento puede estar presente en una célula con un inhibidor de una molécula de enzima de biosíntesis de aminoácidos (por ejemplo, estando la molécula de enzima también presente en la célula). Por ejemplo, cualquiera de las combinaciones de promotor-LMM descritas en este documento puede estar presente en una célula que además comprende (i) un ácido nucleico que codifica una molécula de P5CS y que comprende un ácido nucleico concretodescrito en este documento, y (ii) un inhibidor de P5CS; por ejemplo, ácido L-azetidina-2-carboxílico, 3,4-deshidro-L-prolina o ácido L-4-tiazolidinacarboxílico. En la Tabla 4 se muestran ejemplos no limitantes de combinaciones de promotor-inhibidor de LMM-P5CS, por ejemplo, que pueden usarse, por ejemplo, en cualquiera de los métodos o composiciones (por ejemplo, células) descritos en este documento. Se contempla que cualquiera de estas combinaciones pueda estar presente en una célula que comprende P5CS, introducida en la célula, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

Tabla 4. Combinaciones ejemplares de promotor-inhibidor de LMM-P5CS (por ejemplo, en células que comprenden P5CS, descritas en este documento)

Promotor	Modificador del metabolismo lipídico	Inhibidor de P5CS
SV40	SCD1 (ratón)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
SV40	SCD1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
SV40	SREBF1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
SV40	SREB411 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
mCMV	SCD1 (ratón)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
mCMV	SCD1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico
mCMV	SREBF1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidinacarboxílico

mCMV	SREB411 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
hCMV	SCD1 (ratón)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
hCMV	SCD1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
hCMV	SREBF1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
hCMV	SREB411 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
PGK	SCD1 (ratón)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
PGK	SCD1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
PGK	SREBF1 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico
PGK	SREB411 (CHO)	Ácido L-azetidina-2-carboxílico
		3,4-Deshidro-L-Prolina
		Ácido L-4-tiazolidincaboxílico

Células y cultivo celular

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos para evaluar, clasificar, identificar, seleccionar o crear una célula o línea celular que produce un producto; por ejemplo, un polipéptido o molécula de ácido nucleico recombinante o terapéutico descrito en el presente documento. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para evaluar, clasificar, identificar, seleccionar o crear una célula o línea celular con productividad y calidad del producto mejoradas; por ejemplo, aumentadas. Generalmente, los métodos de la presente memoria pueden usarse para producir una célula o línea celular que comprende un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, un vector o un ácido nucleico heterólogo integrado en el genoma) que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico concreto que codifica un producto de interés y (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de enzima que participa en la vía biosintética de un aminoácido, no expresando la célula o línea celular endógenamente la molécula de enzima.

En realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En otras realizaciones, la célula es una célula distinta de una célula de mamífero. En una realización, la célula es de ratón, rata, hámster chino, hámster sirio, mono, simio, perro, caballo, hurón o gato. En realizaciones, 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-. En otra realización, la célula es de un pato, loro, pez, insecto, planta, hongo o levadura.

En realizaciones, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una realización, la célula es una célula CHO-K1, una célula CHOK1SV, una célula DG44 CHO, una célula DUXB11 CHO, una célula CHO-S, una célula CHO GS inactivada, una célula CHOK1SV FUT8 inactivada, una célula CHOZN, o una célula derivada de CHO. La célula CHO GS inactivada (por ejemplo, célula GSKO) es, por ejemplo, una célula CHO-K1SV GS inactivada (Lonza Biologics, Inc.). La célula CHO FUT8 inactivada es, por ejemplo, la Potelligent® CHOK1SV FUT8 inactivada (Lonza Biologics, Inc.).

En realizaciones, 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, célula L, COS, por ejemplo, COS1 y COS7, QC1-3, CHOK1, CHOK1SV, Potelligent™ (CHOK1SV FUT8-KO), CHO GS inactivada, Xceed™ (CHOK1SV GS-KO), CHOS, CHO DG44, CHO DXB11 y CHOZN, o cualquier célula derivada de las mismas.

5 En realizaciones, las células eucariotas son células madre. Las células madre pueden ser, por ejemplo, células madre pluripotentes, incluidas células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés), células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre específicas de tejido (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) y células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés).

10 En realizaciones, la célula es una forma diferenciada de cualquiera de las células descritas en el presente documento. En una realización, la célula es una célula derivada de cualquier célula primaria en cultivo.

15 En realizaciones, la célula es un hepatocito, tal como un hepatocito humano, un hepatocito animal o una célula no parenquimatosa. Por ejemplo, la célula puede ser un hepatocito humano apto para metabolismo plaqueable, un hepatocito humano apto para inducción plaqueable, un hepatocito humano Qualyst Transporter Certified™ plaqueable, un hepatocito humano apto para suspensión (incluidos los hepatocitos agrupados de 10 donadores y 20 donadores), células de Kupffer hepáticas humanas, células estrelladas hepáticas humanas, hepatocitos de perro (incluidos los hepatocitos individuales y agrupados de Beagle), hepatocitos de ratón (incluidos los hepatocitos CD-1 y C57Bl/6), hepatocitos de rata (incluidos los hepatocitos de Sprague-Dawley, Wistar Han y Wistar), hepatocitos de mono (incluidos los hepatocitos de mono Cynomolgus o Rhesus), los hepatocitos de gato (incluidos los hepatocitos del gato doméstico de pelo corto) y los hepatocitos de conejo (incluidos los hepatocitos de conejo blanco de Nueva Zelanda). Hay hepatocitos ejemplares disponibles comercialmente en Triangle Research Labs, LLC, 6 Davis Drive Research Triangle Park, Carolina del Norte, EE. UU. 27709.

20 En algunas realizaciones, la célula comprende una inactivación de la glutamina sintetasa (GS). En realizaciones, la célula no comprende un gen GS funcional. En realizaciones, la célula no comprende un gen GS. En realizaciones, el gen GS en una célula comprende una mutación que hace que el gen sea incapaz de codificar una proteína GS funcional.

25 En realizaciones, la célula eucariota es una célula eucariota inferior, como, por ejemplo una célula de levadura (por ejemplo, del género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveriy* *Pichia angusta*), del género *Komagataella* (por ejemplo, *Komagataella pastoris*, *Komagataella pseudopastoris* *Komagataella phaffii*), del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces uvarum*), del género *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*), del género *Candida* (por ejemplo, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Candida boidinii*), del género *Geotrichum* (por ejemplo, *Geotrichum fermentans*), *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* *Schizosaccharomyces pombe*. Se prefiere la especie *Pichia pastoris*. X33, GS115, KM71, KM71H; y CBS7435 son ejemplos de cepas de *Pichia pastoris*.

30 En realizaciones, la célula eucariota es una célula fúngica (por ejemplo, *Aspergillus sp.* (tal como *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. nidula*), *Acremonium sp.* (tal como *A. thermophilum*), *Chaetomium sp.* (tal como *C. thermophilum*), *Chrysosporium sp.* (tal como *C. thermophilum*), *Cordyceps sp.* (tal como *C. militaris*), *Corynascus sp.*, *Ctenomyces sp.*, *Fusarium sp.* (tal como *F. oxysporum*), *Glomerella sp.* (tal como *G. graminicola*), *Hypocrea sp.* (tal como *H. jecorina*), *Magnaporthe sp.* (tal como *M. oryzae*), *Myceliophthora sp.* (tal como *M. thermophilum*), *Nectria sp.* (tal como *N. haematococca*), *Neurospora sp.* (tal como *N. crassa*), *Penicillium sp.*, *Sporotrichum sp.* (tal como *S. thermophilum*), *Thielavia sp.* (tal como *T. terrestris*, *T. heterothallica*), *Trichoderma sp.* (tal como *T. reesei*) o *Verticillium sp.* (tal como *V. dahlia*)).

35 En realizaciones, la célula eucariota es una célula de insecto (por ejemplo, células Sf9, Mimic™ Sf9, Sf21, High Five™ (BT1-TN-5B1-4) o BT1-Ea88), una célula de alga (por ejemplo, de los géneros *Amphora sp.*, *Bacillariophyceae sp.*, *Dunaliella sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Cyanophyta sp.* (cianobacterias), *Nannochloropsis sp.*, *Spirulina sp.* u *Ochromonas sp.*), o una célula vegetal (por ejemplo, células de plantas monocotiledóneas (por ejemplo, maíz, arroz, trigo o *Setaria sp.*), o de plantas dicotiledóneas (por ejemplo, mandioca, patata, soja, tomate, tabaco, alfalfa, *Physcomitrella patens* *Arabidopsis sp.*).

40 En realizaciones, la célula es una célula bacteriana o procariota.

45 En realizaciones, la célula procariota es una célula grampositiva como *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, o *Lactobacillus sp.* El *Bacillus sp.* que se puede utilizar es, por ejemplo *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. natto* o *B. megaterium*. En realizaciones, la célula es *B. subtilis*, como *B. subtilis 3NA* y *B. subtilis 168*. El *Bacillus sp.* se puede obtener, por ejemplo, en el Bacillus Genetic Stock Center, Biological Sciences 556, 484 West 12th Avenue, Columbus Ohio 43210-1214.

50 En realizaciones, la célula procariota es una célula gramnegativa, como *Salmonella sp.* o *Escherichia coli*, tales como, por ejemplo, TG1, TG2, W3110, DH1, DHB4, DH5a, HMS 174, HMS174 (DE3), NM533, C600, HB101, JM109, MC4100, XL1-Blue y Origami, así como los derivados de cepas B de *E. coli*, como, por ejemplo, BL-21 o BL21 (DE3), o BL21 (DE3) pLysS, estando todas ellas disponibles comercialmente.

Hay células anfitrionas adecuadas disponibles comercialmente, por ejemplo, en colecciones de cultivos tales como DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) o la American Type Culture Collection (ATCC).

5 En realizaciones, la célula es una cualquiera de las células descritas en el presente documento que comprenda un ácido nucleico heterólogo; por ejemplo, un ácido nucleico concreto que codifica un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido recombinante seleccionado de las Tablas 5-8.

10 Las células descritas en el presente documento pueden cultivarse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el medio de cultivo carece de un aminoácido (por ejemplo, uno o más de los aminoácidos enumerados en la Tabla 1). En realizaciones, el medio de cultivo carece de un aminoácido para el que se puede rescatar la biosíntesis si la célula ha absorbido el ácido nucleico concreto. En realizaciones, el cultivo celular se lleva a cabo como un cultivo por lotes, un cultivo por lotes alimentados, un sobrecrecimiento de lotes alimentados abreviado (aFOG), un cultivo de extracción y relleno o un cultivo continuo. En una realización, el cultivo celular es un cultivo en suspensión. En una realización, la célula o el cultivo celular se colocan *in vivo* para la expresión del polipéptido recombinante; por ejemplo, colocado en un organismo modelo o un sujeto humano.

15 En una realización, el medio de cultivo está libre de suero. Hay medios sin suero, sin proteínas y sin componentes animales definidos químicamente (CDACF) disponibles comercialmente; por ejemplo, en Lonza Biologics.

En algunas realizaciones, se pueden añadir al medio de cultivo aditivos lipídicos (que comprenden, por ejemplo, colesterol, ácido oleico, ácido linoleico o combinaciones de los mismos).

20 En la técnica se conocen bien medios y métodos de cultivo adecuados para líneas celulares de mamíferos; por los descritos en la patente estadounidense nº 5.633.162. Ejemplos de medios de cultivo celular estándar para matraces de laboratorio o cultivo celular de baja densidad y que se adaptan a las necesidades de tipos de células particulares son, por ejemplo: medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Morre, G., The Journal of the American Medical Association, 199, pp. 519s, 1967), medio L-15 (Leibovitz, A. et al., Amer. J. of Hygiene, 78,1 pp. 173ss, 1963), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio F12 de Ham (Ham, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sc.53, pp. 288ss, 1965) o DMEM modificado de Iscoves carente de albúmina, transferrina y lecitina (Iscoves et al., J. Exp. Med. 1, pp. 923ss, 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 el documento EP-481 791. Es sabido que tales medios de cultivo se pueden complementar con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés; también denominado suero fetal de ternera FCS, por sus siglas en inglés), proporcionando este una fuente natural de una plétora de hormonas y factores de crecimiento. El cultivo celular de células de mamíferos es en la actualidad una operación rutinaria bien descrita en manuales y libros de texto científicos; es tratado en detalle, por ejemplo, en R. Ian Fresney, Culture of Animal Cells, a Manual, 4ª edición, Wiley-Liss/Nueva York, 2000. Cualquiera de los medios de cultivo celular descritos en este documento puede formularse para que carezca de un aminoácido particular (por ejemplo, un aminoácido enumerado en la Tabla 1); por ejemplo, el aminoácido para el cual la biosíntesis puede ser rescatada si la célula ha absorbido el ácido nucleico concreto.

40 Los expertos en la técnica conocen otros métodos de cultivo adecuados y pueden depender del producto polipeptídico recombinante y de la célula anfitriona utilizada. Está dentro de la habilidad de un experto en la materia determinar u optimizar las condiciones adecuadas para la expresión y la producción del polipéptido recombinante o terapéutico que va a ser expresado por la célula.

45 Los métodos para modificar o manipular genéticamente una célula para expresar un polipéptido o proteína deseado son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, transfección, transducción (por ejemplo, transducción viral) o electroporación, por ejemplo, de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, en la célula. Ejemplos de métodos físicos para introducir un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico o vector heterólogo descrito en el presente documento, en una célula anfitriona incluyen, sin limitación, precipitación con fosfato cálcico, 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, tomos 1-4, Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Ejemplos de medios químicos para introducir un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo o un vector descrito en este documento, en una célula anfitriona incluyen, sin limitación, sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de administración *in vitro* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). Se encuentran 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.

Ácidos nucleicos

En el presente documento se describen ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos concretos que codifican los

productos- por ejemplo, polipéptidos recombinantes- descritos en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos recombinantes deseados se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionar bibliotecas de células que expresan la secuencia de ácido nucleico deseada- por ejemplo, el gen-, deducirla secuencia de ácido nucleico de un vector que se sabe que incluye, o aislarla directamente de células y tejidos que la contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el polipéptido recombinante puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse. Las técnicas y la tecnología de ADN recombinante están muy avanzadas y están bien establecidas en la técnica. Por consiguiente, el experto en la materia que tenga el 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 polipéptido recombinante.

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

En realizaciones, el producto- por ejemplo, un polipéptido terapéutico heterólogo- comprende múltiples cadenas polipeptídicas; por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una cadena pesada y una ligera. Las secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples cadenas polipeptídicas pueden disponerse juntas (por ejemplo, cada secuencia que codifica la cadena polipeptídica dispuesta en el mismo ácido nucleico) o por separado (por ejemplo, cada secuencia codificante de la cadena polipeptídica dispuesta en diferentes ácidos nucleicos). Las secuencias que codifican un polipéptido terapéutico heterólogo que comprende múltiples cadenas polipeptídicas se pueden unir operativamente a un único elemento de control- por ejemplo, un primer elemento de control- o a elementos de control distintos y separados (por ejemplo, cada secuencia que codifica la cadena polipeptídica está operativamente enlazada a su propio primer elemento de control). En una realización en la que las secuencias que codifican un polipéptido terapéutico heterólogo que comprende múltiples cadenas polipeptídicas están operativamente unidas a elementos de control distintos y separados, uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o la totalidad) de los elementos de control puede tener un primer nivel de actividad en una primera condición y un segundo nivel de actividad en una segunda condición, y uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) de los elementos de control pueden ser constitutivos.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido recombinante se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de duplicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación. En realizaciones, 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, tomos 1-4, Cold Spring Harbor Press, Nueva York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de duplicación funcional en al menos un organismo, un elemento de control que comprende un elemento promotor y opcionalmente un elemento potenciador, sitios convenientes de endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente estadounidense 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.

Un vector también puede incluir, por ejemplo, una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (por ejemplo, del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH, por sus siglas en inglés)), un elemento que permite la duplicación episomal y la duplicación en procariotas (por ejemplo, origen SV40 y ColE1 o otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección; por ejemplo, un marcador de selección o un gen indicador.

Los vectores contemplados pueden comprender sitios de inserción adecuados para insertar secuencias que codifican polipéptidos; por ejemplo, polipéptidos terapéuticos exógenos o polipéptidos represores.

Los sitios de inserción pueden comprender sitios de endonucleasa de restricción.

Los sitios de inserción pueden comprender sitios diana de recombinación, flanqueando los sitios diana de recombinación las secuencias que codifican polipéptidos; por ejemplo, polipéptidos terapéuticos exógenos o polipéptidos represores. En una realización, el sitio diana recombinante es un sitio lox. En caso de que el sitio diana de recombinación sea un sitio lox, las células anfitrionas necesitan la presencia y la expresión de la Cre recombinasa para lograr un evento de entrecruzamiento o recombinación.

En realizaciones, el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto- por ejemplo, un polipéptido; por ejemplo, un polipéptido recombinante- descrito en el presente documento comprende además una

secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección. En realizaciones, el marcador de selección comprende glutamina sintetasa (GS); dihidrofolato reductasa (DHFR)-una enzima que confiere resistencia, por ejemplo, al metotrexato (MTX)-; prolina, o un marcador antibiótico-una enzima que confiere resistencia, por ejemplo, a un antibiótico como: higromicina, neomicina (G418), zeocina, puromicina o blasticidina-. En realizaciones, el marcador de selección comprende o es compatible con el sistema de selección Selexis (por ejemplo, SUREtechnology Platform™ y Selexis Genetic Elements™, disponibles comercialmente en Selexis SA) o el sistema de selección Catalant.

En realizaciones, el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto recombinante descrito en este documento comprende un marcador de selección que es útil para identificar una célula o las células comprenden el ácido nucleico que codifica un producto recombinante descrito en este documento. En otra realización, el marcador de selección es útil para identificar una célula o células que comprenden 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 el diseño de una célula o línea celular que exprese de manera estable el producto.

Productos

En el presente documento se proporcionan métodos para identificar, seleccionar o cultivar una célula o línea celular capaz de producir altos rendimientos de un producto- por ejemplo, un polipéptido; por ejemplo, un polipéptido terapéutico-. Productos abarcados por la presente divulgación incluyen, entre otros, moléculas, ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos no codificantes, por ejemplo, moléculas de ARN no codificantes, por ejemplo, un ARN antisentido, ARNip, ARNt, ARN ribosómico, microARN, ARNpi, ARNnop, ARNnp, ARNex, ARNca o ARN no codificante largo, por ejemplo, Xist o HOTAIR), polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos recombinantes y/o terapéuticos), o híbridos de los mismos, que pueden ser producidos por una célula; por ejemplo, expresados en la misma. En algunas realizaciones, las células se diseñan o modifican para producir el producto. Tales modificaciones incluyen la introducción de moléculas que controlan o dan como resultado la producción del producto. Por ejemplo, una célula se modifica introduciendo un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido- por ejemplo, un polipéptido recombinante-, y la célula se cultiva en condiciones adecuadas para la producción- por ejemplo, la expresión y la secreción- del polipéptido; por ejemplo, el polipéptido recombinante. En otro ejemplo, una célula se modifica introduciendo un ácido nucleico heterólogo que controla- por ejemplo, aumenta- la expresión de un polipéptido que es expresado endógenamente por la célula, de modo que la célula produce un nivel o una cantidad mayor del polipéptido que el nivel o la cantidad que se produce de forma endógena, por ejemplo, en una célula no modificada. En realizaciones, la célula o línea celular identificada, seleccionada o generada por los métodos descritos en este documento produce un producto- por ejemplo, un polipéptido recombinante- útil en el tratamiento de una afección, un trastorno o una enfermedad médica. Ejemplos de afecciones, trastornos o enfermedades médicas incluyen, sin limitación, enfermedades o trastornos metabólicos (por ejemplo, deficiencias de enzimas metabólicas), trastornos endocrinos (por ejemplo, deficiencias hormonales), hemostasia, trombosis, trastornos hematopoyéticos, trastornos pulmonares, trastornos gastrointestinales, trastornos de inmunorregulación (por ejemplo, inmunodeficiencia), infertilidad, trasplante, cáncer y enfermedades infecciosas.

Polipéptidos

En algunas realizaciones, el producto es un polipéptido; por ejemplo, un polipéptido recombinante. Los productos polipeptídicos pueden, en algunas realizaciones, usarse en cualquiera de las composiciones (por ejemplo, células) y de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido es producido por una célula cultivada en un medio que comprende un inhibidor- por ejemplo, de una molécula de enzima-, descrito, por ejemplo, en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido es producido por una célula que comprende un LMM, descrito, por ejemplo, en el presente documento. En realizaciones, el LMM se expresa bajo el control de un promotor, descrito, por ejemplo, en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido es producido por una célula cultivada en medio que comprende un LMM, descrito, por ejemplo, en el presente documento.

En realizaciones, el polipéptido es un polipéptido heterólogo- por ejemplo, una proteína heteróloga; por ejemplo, una proteína que no es expresada naturalmente por la célula-. El polipéptido puede ser una proteína terapéutica o una proteína de diagnóstico, útil, por ejemplo, para la detección de drogas. La proteína terapéutica o de diagnóstico puede ser una molécula de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión, una hormona, una citocina, un factor de crecimiento, una enzima, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína indicadora, un péptido terapéutico, un aptámero, o un fragmento o híbrido estructural y/o funcional de cualquiera de estos. En realizaciones, el producto- por ejemplo, un polipéptido terapéutico heterólogo- comprende múltiples cadenas polipeptídicas; por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una cadena pesada y una ligera.

En algunas realizaciones, el producto- por ejemplo, un polipéptido recombinante- es una molécula de anticuerpo. Los productos abarcados en este documento son moléculas de anticuerpos de diagnóstico- por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo- útiles para técnicas de formación de imágenes, y moléculas de anticuerpos terapéuticos adecuadas para la administración a sujetos; por ejemplo, útiles para el tratamiento de

enfermedades o trastornos. Una molécula de anticuerpo es una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. En una realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos y las proteínas multiformato pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena única o múltiple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse 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 del fragmento de anticuerpo a una diana, como un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único como sdAb (ya sean VL o VH), dominios VHH de camélido y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos tales 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 unión a epitopo de un anticuerpo. También se puede incorporar un fragmento de unión a antígeno en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígenos también se pueden injertar en supercónica base de polipéptidos, como una fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente estadounidense n° 6.703.199, que describe minicuerpos de polipéptido de fibronectina).

En realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es, por ejemplo, BOTOX, Myobloc, Neurobloc, Dysport (u otros serotipos de neurotoxinas botulínicas), alglucosidasa alfa, daptomicina, YH-16, coriogonadotropina alfa, filgrastim, cetorelix, interleucina-2, aldesleucina, teceleulina, denileucina difitox, interferón alfa-n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-1a), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, nesiritida, abatacept, alefacept, Rebif, eptoterminalfa, teriparatida, calcitonina, etanercept, glutámero de hemoglobina 250 (bovino), drotrecogina alfa, colagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, DWP401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, bivalirudina, nonacog alfa, mononina, eptacog alfa (activado), factor recombinante VIII+VWF, Recombinate, factor VIII recombinante, factor VIII (recombinante), Alphamate, octocog alfa, factor VIII, palifermina, indiquinasa, tenecteplasa, alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, folitropina alfa, rFSH, hpFSH, micafungina, pegfilgrastim, lenograstim, nartograstim, sermorelina, glucagón, exenatida, pramlintida, iniglucerasa, galsulfasa, leucotropina, molgramostim, acetato de triptorelina, histrelina (Hydron), deslorelina, histrelina, nafarelina, leuprolida (ATRIGEL), leuprolida (DUROS), goserelina, eutropina, somatropina, mecasermina, enfavirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalaada), insulina lispro, insulina deternir, insulina (RapidMist), mecasermina rinfabato, anakinra, celmoleucina, 99 mTc-apcitida, mielopida, Betaseron, acetato de glatiramer, Gepon, sargramostim, oprelvekin, interferones alfa de insulina derivados de leucocitos humanos, bilive, insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina asparta, mecasermina, Roferon-A, interferón-alfa 2, alfaferona, interferón alfacon-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante de Avonex, dornasa alfa, trafermina, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becaplermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, octreotida, lanreotida, aneastim, agalsidasa beta, agalsidasa alfa, laronidasa, acetato de cobre prezatida, rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEG-Intron, Tricomina, hormona paratiroidea humana recombinante (PTH, por sus siglas en inglés) 1-84, epoetina delta, antitrombina III transgénica, granditropina, vitrasa, insulina recombinante, interferón alfa, GEM-21S, vapreotida, idursulfasa, omnapatrilat, albúmina séricarecombinante, certolizumab pegol, glucarpidasa, inhibidor de esterasa C1 recombinante humana, lanotepalasa, hormona de crecimiento humana recombinante, enfuvirtida, VGV-1, interferón (alfa), lucinactante, aviptadil, icatibant, ecalantida, omiganan, Aurograb, pexigananacetato, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, cintredelinbesudotox, FavId, MDX-1379, ISATx-247, liraglutida, teriparatida, tifacogina, AA4500, loción de liposomas T4N5, catumaxomab, DWP413, ART-123, crisalina, desmotepalasa, amediplasa, corifolitropinalfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, hormona del crecimiento, G-CSF recombinante, insulina, insulina (Technosphere), insulina (AERx), RGN-303, DiaPep277, interferón beta, interferón alfa-n3, belatacept, parches de insulina transdérmica, AMG-531, MBP-8298, Xerecept, opebacan, AIDS-VAX, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, Lipoxysan, lusupultida, MP52, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana, trombina, TransMID, alfimeprasa, puricasa, terlipresina, EUR-1008M, FGF-I recombinante, BDM-E, rotigaptida, ETC-216, P-113, MBI-594AN, duramicina, SCV-07, OPI-45, endostatina, angiostatina, ABT-510, inhibidor de Bowman Birk, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Anexina V, kahalalida F, CTCE-9908, teverelix, ozarelix, rornidepsina, BAY-504798, interleucina4, PRX-321, Pepscan, iboctadekin, rhactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengitida, Albuferon, Biphasix, IRX-2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotida, huN901-DMI, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, MART-1, gp100, tirosinasa, nemifitida, rAAT, CGRP, pegsunercept, timosinbeta4, plitidepsina, GTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-1, AC-100, calcitonina de salmón (eligen), examorelina, capromorelina, Cardeva, velafermina, 131I-TM-601, KK-220, T-10, ularitida, depelestat, hemátida, crisalina, rNAPc2, factor recombinante V111 (liposomal PEGilado), bFGF, variante de estafiloquinasa recombinante PEGilada, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, avorelina, ACM-9604, acetato de

linaclotida, CETi-1, Hemospan, VAL, insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina (eligen), metionil leptina humana recombinante, pitrakinra, Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10, talactoferrina, rEV-131, insulina humana recombinante, RPI-78M, oprelvekin, CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3, IRX-3, RDP-58, Tauferon, lipasa estimulada por sales biliares, merispasa, alalina fosfatasa, EP-2104R, Melanotan-II, bremelanotida, ATL-104, microplasma humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, ALTU-135, neuraminidasa recombinante, Vacc-5q, Vacc-4x, Toxoide Tat, YPSL, CHS-13340, PTH(1-34) (Novasome), Ostabolin-C, análogo de PTH, MBRI-93.02, MTB72F, MVA-Ag85A, FARA04, BA-210, vacuna recombinante contra el FIV con infestación, AG-702, OxSODrol, rBetV1, Der-p1/Der-p2/Der-p7, antígeno peptídico PR1, vacuna ras mutante, vacuna lipopéptida HPV-16 E7, laberintina, WT1-péptido, IDD-5, CDX-110, Pentrys, Norelina, CytoFab, P-9808, VT-111, icrocaptida, telbermina, rupintrivir, reticulosa, rGRF, HA, alfa-galactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07, DRF-7295, ABT-828, inmunotoxina específica de ErbB2, DT3SSIL-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptidos de unión al receptor de colecistoquinina B/gastrina, 111In-hEGF, AE-37, trasnizumab-DM1, Antagonista G, IL-12, PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647, ra basado en L-19, Re-188-P-2045, AMG-386, DC/1540/KLH, VX-001, AVE-9633, AC-9301, NY-ESO-1 (péptidos), péptidos NA17.A2, CBP-501, lactoferrina humana recombinante, FX-06, AP-214, WAP-8294A, ACP-HIP, SUN-11031, péptido YY [3-36], FGLL, atacicept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroidea humana 1-34, F-18-CCR1, AT-1100, JPD-003, PTH (7-34) (Novasome), duramicina, CAB-2, CTCE-0214, eritropoyetina glucoPEGilada, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix, EP-51216, hGH, OGP-I, sifuvirtida, TV4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, timopentina, r(m)CRP, insulina hepatoselectiva, subalina, proteína de fusión L19-IL-2, elafina, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombopoyetina, AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso, SLV-317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida (eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, fusión LFn-p24, EP-1043, gpE1, gpE2, MF-59, hPTH (1-34), 768974, SYN-101, PGN-0052, aviscumnina, BIM-23190, péptido de tirosinasa multiepítipo, enkastim, APC-8024, GI-5005, ACC-001, TTS-CD3, TNF vascular dirigido, desmopresina, onercept y TP-9201.

En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es adalimumab (HUMIRA), infliximab (REMICADE™), rituximab (RITUXAN™/MAB THERA™) etanercept (ENBREL™), bevacizumab (AVASTIN™), trastuzumab (HERCEPTIN™), pegrilgrastim (NEULASTA™) o cualquier otro polipéptido adecuado, incluidos biosimilares y biomejores.

Otros polipéptidos adecuados (producidos, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) incluyen, sin limitación, los enumerados a continuación en la Tabla 5 y en la Tabla 1 del documentoUS2016/0097074.

Tabla 5. Polipéptidos ejemplares

Producto proteico	Fármaco de referencia enumerado
Interferón gamma-1b	Actimmune®
Alteplasa; activador tisular del plasminógeno	Activase®/Cathflo®
Factor antihemofílico recombinante	Advate
Albúmina humana	Albutein®
Laronidasa	Aldurazyme®
Interferón alfa-N3 derivado de leucocitos humanos	Alferon N®
Factor antihemofílico humano	Alphanate®
Factor humano de coagulación IX filtrado por virus	AlphaNine® SD
Alefacept; proteína de fusión dimérica recombinante LFA3-Ig	Amevive®
Bivalirudina	Angiomax®
Darbepoetina alfa	Aranesp™
Bevacizumab	Avastin™
Interferón beta-1a recombinante	Avonex®
Factor de coagulación IX	BeneFix™
Interferón beta-1b	Betaseron®
Tositumomab	BEXXAR®
Factor antihemofílico	Bioclate™
Hormona humana del crecimiento	BioTropin™
Toxina botulínica tipo A	BOTOX®
Alemtuzumab	Campath®
Arcitumomab marcado con tecnecio 99	CEA-Scan®
Alglucerasa, forma modificada de beta-glucocerebrosidasa	Ceredase®
Imiglucerasa, forma recombinante de beta-glucocerebrosidasa	Cerezyme®

Producto proteico	Fármaco de referencia enumerado
Fab ovino inmunitario polivalente contra mordedura de crótalo	CroFab™
Fab inmunitario de digoxina [oveja]	DigiFab™
Rasburicasa	Elitek®
Etanercept	ENBREL®
Epoyetina alfa	Epogen®
Cetuximab	Erbitux™
Agalsidasa beta	Fabrazyme®
Urofolitropina	Fertinex™
Folitropina beta	Follistim™
Teriparatida	FORTEO®
Somatropina humana	GenoTropin®
Glucagón	GlucaGen®
Folitropina alfa	Gonal-F®
Factor antihemofílico	Helixate®
Factor antihemofílico; Factor XIII	HEMOFIL
Adefovir dipivoxil	Hepsera™
Trastuzumab	Herceptin®
Insulina	Humalog®
Complejo humano de factor antihemofílico/factor de von Willebrand	Humate-P®
Somatotropina	Humatrope®
Adalimumab	HUMIRA™
Insulina humana	Humulin®
Hialuronidasa humana recombinante	Hylenex™
Interferón alfacon-1	Infergen®
Eptifibatida	Integrilin™
Interferón alfa	Intron A®
Palifermina	Kepivance
Anakinra	Kineret™
Factor antihemofílico	Kogenate®FS
Insulina glargina	Lantus®
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Leukine®/Leukine® líquida
Lutropina alfa para inyección	Luveris
Lipoproteína OspA	LYMErix™
Ranibizumab	LUCENTIS®
Gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg™
Galsulfasa	Naglazyme™
Nesiritida	Natrecor®
Pegfilgrastim	Neulasta™
Oprelvekin	Neumega®
Filgrastim	Neupogen®
Fanolesomab	NeutroSpec™ (anteriormente LeuTech®)
Somatropina [ADNr]	Norditropin®/Norditropin Nordiflex®
Mitoxantrona	Novantrone®
Suspensión de insulina cinc	Novolin L®
Suspensión de insulina isofánica	Novolin N®
Insulina normal	Novolin R®
Insulina	Novolin®
Factor de coagulación VIIa	NovoSeven®
Somatropina	Nutropin®
Inmunoglobulina intravenosa	Octagam®
PEG-L-asparaginasa	Oncaspar®
Abatacept, proteína de fusión soluble completamente humana	Orencia™
Muromomab-CD3	Orthoclone OKT3®
Hialuronano de alto peso molecular	Orthovisc®
Gonadotropina coriónica humana	Ovidrel®
Bacilo <i>Calmette-Guerin</i> vivo atenuado	Pacis®

Producto proteico	Fármaco de referencia enumerado
Peginterferón alfa-2a	Pegasys®
Versión pegilada de interferón alfa-2b	PEG-Intron™
Abarelix (suspensión inyectable); antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina	Plenaxis™
Epoyetina alfa	Procrit®
Aldesleucina	Proleukin, IL-2®
Somatrem	Protropin®
Dornasa alfa	Pulmozyme®
Efalizumab, bloqueador selectivo reversible de linfocitos T	RAPTIVA™
Combinación de ribavirina e interferón alfa	Rebetron™
Interferón beta 1a	Rebif®
Factor antihemofílico	Recombinate® rAHF/
Factor antihemofílico	ReFacto®
Lepirudina	Refludan®
Infliximab	REMICADE®
Abciximab	ReoPro™
Reteplesa	Retavase™
Rituxima	Rituxan™
Interferón alfa-2a	Roferon-A®
Somatropina	Saizen®
Secretina porcina sintética	SecreFlo™
Basiliximab	Simlect®
Eculizumab	SOLIRIS®
Pegvisomant	SOMAVERT®
Palivizumab; mAb humanizado producido de forma recombinante	Synagis™
Tirotropina alfa	Thyrogen®
Tenecteplasa	TNKase™
Natalizumab	TYSABRI®
Soluciones intravenosas al 5% y el 10% de inmunoglobulina humana	Venoglobulin-S®
Interferón alfa-n1 linfoblastoideo	Wellferon®
Drotrecogina alfa	Xigris™
Omalizumab, anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que tiene inmunoglobulina-E como diana	Xolair®
Daclizumab	Zenapax®
Ibritumomab tiuxetán	Zevalin™
Somatotropina	Zorbtive™ (Serostim®)

En realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es una hormona, un factor de coagulación sanguínea, una citocina/factor de crecimiento, una molécula de anticuerpo, una proteína de fusión, una vacuna proteica o un péptido, mostrado, por ejemplo, en la Tabla 6.

5 Tabla 6. Productos ejemplares

Tipo de producto terapéutico	Producto	Nombre comercial
Hormona	Eritropoyetina, epoeína- α Darbepoetina- α Somatotropina, hormona del crecimiento (GH), Hormona estimulante del foliculo (FSH) humana Gonadotropina coriónica humana Lutropina- α Glucagón Hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) Secretina Tirotropina, hormona estimulante de la tiroides (TSH)	Epogen, Procrit Aranesp Genotropin, Humatrope, Norditropin, NovlVitropin, Nutropin, Omnitrope, Protropin, Siazen, Serostim, Valtropin Gonal-F, Follistim Ovidrel Luveris GlcaGen Geref ChiRhoStim (péptido humano), SecreFlo (péptido porcino) Thyrogen
Factores de coagulación de la sangre	Factor VIIa Factor VIII	NovoSeven Bioclate, Helixate, Kogenate, Recombinate, ReFacto

	Factor IX Antitrombina III (AT-III) Concentrado de proteína C	Benefix Trombate III Ceprotrin
Citocina/factor de crecimiento	Interferón alfa de tipo I Interferón- α 3 (IFN α 3) Interferón- β 1a (rIFN- β) Interferón- β 1b (rIFN- β) Interferón- γ 1b (IFN γ) Aldesleucina (interleucina 2 (IL2), epidérmica ETAF, factor activador de timocitos Palifermina (KGF, factor de crecimiento de queratinocitos) Becaplemina (PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas) Anakinra (antagonista de IL1 recombinante)	Infergen Alferon N Avonex, Rebif Betaseron Actimmune Proleucina Kepivance Regranex Anril, Kineret
Moléculas de anticuerpos	Bevacizumab (mAb VEGFA) Cetuximab (mAb EGFR) Panitumumab (mAb EGFR) Alemtuzumab (mAb CD52) Rituximab (Ab quimérico CD20) Trastuzumab (mAb HER2/Neu) Abatacept (fusión Ab CTLA/Fc) Adalimumab (mAb TNF α) Etanercept (fusión de receptor TNF/Fc) Infliximab (mAb quimérico TNF α) Alefcept (proteína de fusión CD2) Efalizumab (mAb CD11a) Natalizumab (mAb de la subunidad de integrina α 4) Eculizumab (mAb C5) Muromonab-CD3	Avastin Erbbitux Vectibix Campath Rituxan Herceptin ORENCIA Humira Enbrel Remicade Amevive Raptiva Tysabri Soliris Orthoclone, OKT3
Otros: Proteínas de fusión/Vacunas proteicas/Péptidos	Insulina Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) Vacuna contra el VPH OspA Anti-Rhesus (Rh) Inmunoglobulina G Enfuvirtida Seda de araña; por ejemplo, fibrón	Humulina, Novolin Engerix, Recombivax HB Gardasil LYMERix Rhophylac Fuzeon QMONOS

En realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es una proteína multiespecífica; por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. En realizaciones, la proteína multiespecífica es como se muestra en la Tabla 7.

5 **Tabla 7. Formatos biespecíficos ejemplares**

Nombre (otros nombres, organizaciones patrocinantes)	Formato BsAb	Dianas	Mecanismos de acción propuestos	Etapas de desarrollo	Enfermedades (o voluntarios sanos)
Catumaxomab (Removab®, Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: Triomab	CD3, EpCAM	Reorientación de las células T al tumor, funciones efectoras mediadas por Fc	Autorizado en la UE	Ascitis maligna en tumores EpCAM positivos
Ertumaxomab (Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: Triomab	CD3, HER2	Reorientación de las células T al tumor	Fase I/II	Tumores sólidos avanzados
Blinatumomab (Blinicyto®, AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BiTE	CD3, CD19	Reorientación de las células T al tumor	Autorizado en EE. UU. Fases II y III Fase II Fase I	Célula B precursora TODAS TODAS DLBCL NHL
REGN1979 (Regeneron)	BsAb	CD3, CD20			
Solitumab (AMG 110, MT110, Amgen)	BiTE	CD3, EpCAM	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	Tumores sólidos

ES 2 871 818 T3

MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BiTE	CD3, CEA	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	Adenocarcinoma gastrointestinal
RO6958688 (Roche)	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BiTE	CD3, PSMA	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	Cáncer de próstata
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	AML
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	Cáncer colorrectal
MGD011 (Macrogenics)	DART	CD19, CD3			
SCORPION (Emergent Biosolutions, Trubion)	BsAb	CD3, CD19	Reorientación de las células T al tumor		
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	Reorientación de las células T al tumor	Fase I	NHL y TODAS
AFM12 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD19, CD16	Reorientación de células NK a células tumorales		
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	Reorientación de células NK a células tumorales	Fase II	Linfoma de Hodgkin
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, GD2	Reorientación de las células T al tumor	Fase I/II	Neuroblastoma y osteosarcoma
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, Her2	Reorientación de las células T al tumor	Fase II	Cáncer de mama metastásico
Células T activadas autólogas bi-armadas con EGFRB (Roger Williams Medical Center)	Células T precargadas con BsAb	CD3, EGFR	Células T activadas autólogas a tumor EGFR positivo	Fase I	Pulmón y otros tumores sólidos
Células T activadas con anti-EGFR (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	Células T precargadas con BsAb	CD3, EGFR	Células T activadas autólogas a tumor EGFR positivo	Fase I	Cánceres de colon y páncreas
rM28 (Hospital Universitario de Tubinga)	Tándem scFv	CD28, MAPG	Reorientación de las células T al tumor	Fase II	Melanoma metastásico
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3, péptido MHC	Reorientación de las células T al tumor	Fase I/II	Melanoma metastásico
DT2219ARL (NCI, Universidad de Minnesota)	2 scFv vinculado 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			
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 divulgada			
NA (Merus)	BsAb	CD3, no divulgada			

ES 2 871 818 T3

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	EGFR, MET	Bloqueo de 2 receptores	Fase I	Cáncer avanzado o metastásico
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	Cuerpo de HSA	HER2, HER3	Bloqueo de 2 receptores	Fase II Fase I	Cáncer de estómago y esófago 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 2 proangiogénicos	Fase I	Tumores sólidos
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Bloqueo de 2 proangiogénicos	Fase I	AMD húmeda
OMP-305B83 (OncoMed)	BsAb	DLL4 / VEGF			
TF2 (Immunomedics)	Dock-and-Lock™	CEA, HSG	Tumor de preorientación para PET o radiografía	Fase II	Cánceres colorrectal, de mama y de pulmón
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	Bloqueo de 2 citocinas proinflamatorias	Fase II	Osteoartritis
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	Bloqueo de 2 citocinas proinflamatorias	Fase II	Artritis reumatoide
COVA322	Finómero de IgG	TNF, IL17A	Bloqueo de 2 citocinas proinflamatorias	Fase I/II	Psoriasis en placas
SAR156597 (Sanofi)	IgG biespecífica tetravalente en tándem	IL-13, IL-4	Bloqueo de 2 citocinas proinflamatorias	Fase I	Fibrosis pulmonar idiopática
GSK2434735 (GSK)	Dominio de selección dual de diana	IL-13, IL-4	Bloqueo de 2 citocinas proinflamatorias	Fase I	(Voluntarios sanos)
Ozoralizumab (ATN103, Ablynx)	Nanocuerpo	TNF, HSA	Bloqueo de citocinas 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 citocinas proinflamatorias, se une a HSA para aumentar la vida media	Fase I	(Voluntarios sanos)
ALX-0061 (AbbVie, Ablynx)	Nanocuerpo	IL-6R, HSA	Bloqueo de citocinas 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 del plasma	Fase II	Hemofilia

En realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es uno de los enumerados en la Tabla 8.

Tabla 8

Producto proteico	Fármaco de referencia enumerado
Interferón gamma-1b	Actimmune®
Alteplasa; activador tisular del plasminógeno	Activase®/Cathflo®
Factor antihemofílico recombinante	Advate

ES 2 871 818 T3

Albúmina humana	Albutein®
Laronidasa	Aldurazyme®
Interferón alfa-N3 derivado de leucocitos humanos	Alferon N®
Factor antihemofílico humano	Alphanate®
Factor humano de coagulación IX filtrado por virus	AlphaNine® SD
Alefacept; proteína de fusión dimérica recombinante LFA3-Ig	Amevive®
Bivalirudina	Angiomax®
Darbepoetina alfa	Aranesp™
Bevacizumab	Avastin™
Interferón beta-1a recombinante	Avonex®
Factor de coagulación IX	BeneFix™
Interferón beta-1b	Betaseron®
Tositumomab	BEXXAR®
Factor antihemofílico	Bioclate™
Hormona humana del crecimiento	BioTropin™
Toxina botulínica tipo A	BOTOX®
Alemtuzumab	Campath®
Arcitumomab marcado con tecnecio 99	CEA-Scan®
Alglucerasa, forma modificada de beta-glucocerebrosidasa	Ceredase®
Imiglucerasa, forma recombinante de beta-glucocerebrosidasa	Cerezyme®
Fab ovino inmunitario polivalente contra mordedura de crótalo	CroFab™
Fab inmunitario de digoxina [oveja]	DigiFab™
Rasburicasa	Elitek®
Etanercept	ENBREL®
Epoyetina alfa	Epogen®
Cetuximab	Erbix™
Agalsidasa beta	Fabrazyme®
Urofolitropina	Fertinex™
Folitropina beta	Follistim™
Teriparatida	FORTEO®
Somatropina humana	GenoTropin®
Glucagón	GlucaGen®
Folitropina alfa	Gonal-F®
Factor antihemofílico	Helixate®
Factor antihemofílico; Factor XIII	HEMOFIL
Adefovir dipivoxil	Hepsera™
Trastuzumab	Herceptin®
Insulina	Humalog®
Complejo humano de factor antihemofílico/factor de von Willebrand	Humate-P®
Somatotropina	Humatrope®
Adalimumab	HUMIRA™
Insulina humana	Humulin®
Hialuronidasa humana recombinante	Hylanex™
Interferón alfacon-1	Infergen®
Eptifibatida	Integrilin™

ES 2 871 818 T3

Interferón alfa	Intron A®
Palifermina	Kepivance
Anakinra	Kineret™
Factor antihemofílico	Kogenate®FS
Insulina glargina	Lantus®
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Leukine®/Leukine® líquida
Lutropina alfa para inyección	Luveris
Lipoproteína OspA	LYMERix™
Ranibizumab	LUCENTIS®
Gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg™
Galsulfasa	Naglazyme™
Nesiritida	Natrecor®
Pegfilgrastim	Neulasta™
Oprelvekin	Neumega®
Filgrastim	Neupogen®
Fanolesomab	NeuroSpec™ (anteriormente LeuTech®)
Somatropina [ADNr]	Norditropin®/Norditropin Nordiflex®
Mitoxantrona	Novantrone®
Suspensión de insulina cinc	Novolin L®
Suspensión de insulina isofánica	Novolin N®
Insulina normal	Novolin R®
Insulina	Novolin®
Factor de coagulación VIIa	NovoSeven®
Somatropina	Nutropin®
Inmunoglobulina intravenosa	Octagam®
PEG-L-asparaginasa	Oncaspar®
Abatacept, proteína de fusión soluble completamente humana	Orencia™
Muromomab-CD3	Orthoclone OKT3®
Hialuronano de alto peso molecular	Orthovisc®
Gonadotropina coriónica humana	Ovidrel®
Bacilo <i>Calmette-Guerin</i> vivo atenuado	Pacis®
Peginterferón alfa-2a	Pegasys®
Versión pegilada de interferón alfa-2b	PEG-Intron™
Abarelix (suspensión inyectable); antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina	Plenaxis™
Epoyetina alfa	Procrit®
Aldesleucina	Proleukin, IL-2®
Somatrem	Protropin®
Dornasa alfa	Pulmozyme®
Efalizumab, bloqueador selectivo reversible de linfocitos T	RAPTIVA™
Combinación de ribavirina e interferón alfa	Rebetron™
Interferón beta 1a	Rebif®
Factor antihemofílico	Recombinate® rAHF/
Factor antihemofílico	ReFacto®
Lepirudina	Refludan®

Infliximab	REMICADE®
Abciximab	ReoPro™
Retepplasa	Retavase™
Rituxima	Rituxan™
Interferón alfa-2a	Roferon-A®
Somatropina	Saizen®
Secretina porcina sintética	SecreFlo™
Basiliximab	Simulect®
Eculizumab	SOLIRIS®
Pegvisomant	SOMAVERT®
Palivizumab; mAb humanizado producido de forma recombinante	Synagis™
Tirotropina alfa	Thyrogen®
Tenecteplasa	TNKase™
Natalizumab	TYSABRI®
Soluciones intravenosas al 5% y el 10% de inmunoglobulina humana	Venoglobulin-S®
Interferón alfa-n1 linfoblastoideo	Wellferon®
Drotrecogina alfa	Xigris™
Omalizumab, anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que tiene inmunoglobulina-E como diana	Xolair®
Daclizumab	Zenapax®
Ibritumomab tiuxetán	Zevalin™
Somatotropina	Zorbtive™ (Serostim®)

5 En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es un antígeno expresado por una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el polipéptido recombinante o terapéutico es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En algunas realizaciones, el polipéptido recombinante o terapéutico se selecciona de HER2, CD20, 9-O-acetil-GD3, βhCG, antígeno A33, marcador CA19-9, marcador CA-125, calreticulina, carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CCR5, CCR8, CD19, CD22, CD25, CD27, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD63, CD70, CC123, CD138, antígeno embrionario de carcinoma (CEA; CD66e), desmogleína 4, neopítipo de E-cadherina, endosialina, efrina A2 (EphA2), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM, por sus siglas en inglés), ErbB2, receptor de acetilcolina fetal, antígeno de activación de fibroblastos (FAP), fucosil GM1, GD2, GD3, GM2, gangliósido GD3, Globo H, glucoproteína 100, HER2/neu, HER3, HER4, receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina, Lewis-Y, LG, Ly-6, proteoglicano sulfato de condroitina específico del melanoma (MCSP, por sus siglas en inglés), mesotelina, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5_{AC}, MUC5_B, MUC7, MUC16, receptor de sustancia inhibidora de Müller (MIS) tipo II, antígeno de células plasmáticas, poli SA, PSCA, PSMA, sonic hedgehog (SHH), SAS, STEAP, antígeno sTn, precursor de TNF-alfa y combinaciones de los mismos.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es un receptor de activación y se selecciona de 2B4 (CD244), integrinaα₄β₁, integrinasβ₂, CD2, CD16, CD27, CD38, CD96, CD100, CD160, CD137, CEACAM1 (CD66), CRTAM, CS1 (CD319), DNAM-1 (CD226), GITR (TNFRSF18), formas de activación de KIR, NKG2C, NKG2D, NKG2E, uno o más receptores de citotoxicidad natural, NTB-A, PEN-5 y combinaciones de los mismos, opcionalmente en los que las integrinas β₂ comprenden CD11a-CD 18, CD11b-CD 18 o CD11c-CD 18, opcionalmente donde las formas de activación de KIR comprenden KIR2DS1, KIR2DS4 o KIR-S, y opcionalmente donde los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp30, NKp44, NKp46 o NKp80.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es un receptor inhibitorio y se selecciona de KIR, ILT2/LIR-1/CD85j, formas inhibitorias de KIR, KLRG1, LAIR-1, NKG2A, NKR-P1A, Siglec-3, Siglec-7, Siglec-9 y combinaciones de los mismos, en donde opcionalmente las formas inhibitorias de KIR comprenden KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 o KIR-L.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es un receptor de activación y se selecciona de CD3, CD2 (LFA2, OX34), CD5, CD27 (TNFRSF7), CD28, CD30. (TNFRSF8), CD40L, CD84 (SLAMF5), CD137 (4-1BB), CD226, CD229 (Ly9, SLAMF3), CD244 (2B4, SLAMF4), CD319 (CRACC, BLAME), CD352 (Ly108, NTBA, SLAMF6), CRTAM (CD355), DR3 (TNFRSF25), GITR

(CD357), HVEM (CD270), ICOS, LIGHT, LT β R (TNFRSF3), OX40 (CD134), NKG2D, SLAM (CD150, SLAMF1), TCR α , TCR β , TCR $\delta\gamma$, TIM1 (HAVCR, KIM1) y combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido (producido, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) es un receptor inhibidor y se selecciona de PD-1 (CD279), 2B4 (CD244, SLAMF4), B71 (CD80), B7H1 (CD274, PD-L1), BTLA (CD272), CD160 (BY55, NK28), CD352 (Ly108, NTBA, SLAMF6), CD358 (DR6), CTLA-4 (CD152), LAG3, LAIR1, PD-1H (VISTA), TIGIT (VSIG9, VSTM3), TIM2 (TIMD2), TIM3 (HAVCR2, KIM3) y combinaciones de los mismos.

10 Otros polipéptidos ejemplares (producidos, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) incluyen, sin limitación, 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; o cualquier conjugado, variante, análogo o fragmento funcional de los polipéptidos recombinantes descritos en este documento.

15 Otros productos proteicos recombinantes (producidos, por ejemplo, por una célula y/o según los métodos descritos en este documento) incluyen supercóntigos sin anticuerpos o supercóntigos proteicos alternativos, tales como, sin limitación: DARPinas, aficuerpos y adnectinas. Dichos supercóntigos que no son de anticuerpos o supercóntigos de proteínas alternativos pueden diseñarse para reconocer o unirse a uno o dos o más—por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 o más—dianas o antígenos diferentes.

Aplicaciones

20 Los métodos de identificación, selección y/o cultivo de células descritos en este documento se pueden usar para generar células útiles para producir diversos productos, evaluar diversas líneas celulares o evaluar la producción de diversas líneas celulares para su uso en un biorreactor o recipiente o tanque de procesamiento, o, más generalmente, con cualquier fuente de alimentación. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son adecuados para cultivar cualquier línea celular deseada, incluidas, por ejemplo, líneas celulares procariontas y/o eucariotas. Además, en las realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en este documento son adecuados para cultivar células en suspensión o células (adherentes) dependientes del anclaje y son adecuados para operaciones de producción configuradas para la producción de productos farmacéuticos y biofarmacéuticos, tales como productos polipeptídicos, productos de ácido nucleico (para ejemplo ADN o ARN), o células y/o virus tales como los usados en terapias celulares y/o virales.

30 En las realizaciones, las células expresan o producen un producto, tal como un producto terapéutico o de diagnóstico recombinante. Como se describe con más detalle a continuación, ejemplos de productos producidos por las células incluyen, entre otros, moléculas de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos), miméticos de anticuerpos (moléculas de polipéptido que se unen específicamente a antígenos pero que no están relacionadas estructuralmente con anticuerpos tales como, por ejemplo, DARPinas, aficuerpos, adnectinas o IgNAR), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión Fc, citocinas quiméricas), otras proteínas recombinantes (por ejemplo, proteínas glicosiladas, enzimas, hormonas), terapéutica viral (por ejemplo, virus oncolítico anticanceroso, vectores virales para terapia génica e inmunoterapia viral), terapéutica celular (por ejemplo, células madre pluripotentes, células madre mesenquimales y células madre adultas), vacunas o partículas encapsuladas en lípidos (por ejemplo, exosomas, partículas similares a virus), ARN (tal como, por ejemplo, ARNip) o ADN (como, por ejemplo, ADN plasmídico), antibióticos o aminoácidos. En realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en este documento pueden usarse para producir biosimilares.

40 Como se mencionó, en las realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en este documento permiten la producción de células eucariotas—por ejemplo, células de mamífero o células eucariotas inferiores como, por ejemplo, células de levadura o células de hongos filamentosos—, o células procariontas como células grampositivas o gramnegativas y/o productos de las células eucariotas o procariontas, por ejemplo, proteínas, péptidos, antibióticos, aminoácidos, ácidos nucleicos (tales como ADN o ARN), sintetizados por las células eucariotas a gran escala. A no ser que se indique algo distinto en el presente documento, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden incluir cualquier volumen o capacidad de producción deseados, incluidas, entre otras, las capacidades a escala de laboratorio, a escala piloto y a escala de plena producción.

50 Además, y a no ser que se indique algo distinto en el presente documento, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar con cualquier reactor adecuado, incluidos, entre otros, tanque agitado, sustentación por aire, fibra, microfibra, fibra hueca, matriz cerámica, lecho fluidizado, lecho fijo y/o biorreactores de lecho de chorro. Como se usa en este documento, "reactor" puede incluir un fermentador o unidad de fermentación, o cualquier otro recipiente de reacción y el término "reactor" se usa indistintamente con "fermentador". Por ejemplo, en algunos aspectos, una unidad de biorreactor puede realizar uno o más, o la totalidad, de los siguientes: alimentación de nutrientes y/o fuentes de carbono, inyección de gas adecuado (por ejemplo, oxígeno), flujo de entrada y salida de fermentación o medio de cultivo celular, separación de las fases gaseosa y líquida, mantenimiento de la temperatura, mantenimiento de los niveles de oxígeno y CO₂, mantenimiento del nivel de pH, agitación (por ejemplo, movimiento circular) y/o limpieza/esterilización. Las unidades de reactor ejemplares, como una unidad de fermentación, pueden contener múltiples reactores dentro de la unidad; por ejemplo, la unidad

puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más biorreactores en cada unidad y/o una instalación puede contener múltiples unidades con uno o varios reactores dentro de la instalación. En diversas realizaciones, el biorreactor puede ser adecuado para procesos de fermentación por lotes, semicontinua, por lotes alimentados, de perfusión y/o continua. Puede usarse cualquier diámetro de reactor adecuado. En realizaciones, el biorreactor puede tener un volumen entre aproximadamente 100 ml y aproximadamente 50.000 l. Ejemplos no limitantes incluyen un volumen de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 750 ml, 1 litro, 2 litros, 3 litros, 4 litros, 5 litros, 6 litros, 7 litros, 8 litros, 9 litros, 10 litros, 15 litros, 20 litros, 25 litros, 30 litros, 40 litros, 50 litros, 60 litros, 70 litros, 80 litros, 90 litros, 100 litros, 150 litros, 200 litros, 250 litros, 300 litros, 350 litros, 400 litros, 450 litros, 500 litros, 550 litros, 600 litros, 650 litros, 700 litros, 750 litros, 800 litros, 850 litros, 900 litros, 950 litros, 1000 litros, 1500 litros, 2000 litros, 2500 litros, 3000 litros, 3500 litros, 4000 litros, 4500 litros, 5000 litros, 6000 litros, 7000 litros, 8000 litros, 9000 litros, 10.000 litros, 15.000 litros, 20.000 litros y/o 50.000 litros. Además, los reactores adecuados pueden ser de usos múltiples, de un solo uso, desechables o no desechables y pueden estar formados de cualquier material adecuado, incluidas aleaciones metálicas como acero inoxidable (por ejemplo, 316 L o cualquier otro acero inoxidable adecuado) e Inconel, plásticos y/o vidrio. En algunas realizaciones, los reactores adecuados pueden ser redondos; por ejemplo, cilíndricos. En algunas realizaciones, los reactores adecuados pueden ser cuadrados; por ejemplo, rectangulares. En algunos casos, los reactores cuadrados pueden proporcionar beneficios sobre los reactores redondos, como facilidad de uso (por ejemplo, carga y configuración por parte de personas expertas), mayor mezcla y homogeneidad del contenido del reactor y menor espacio ocupado en el suelo.

En realizaciones y a no ser que se indique algo distinto en el presente documento, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar con cualquier operación unitaria adecuada y/o equipo no mencionado de otra manera, tal como operaciones y/o equipo para la separación, purificación y aislamiento de tales productos. Se puede utilizar cualquier instalación y entorno adecuados, tales como instalaciones tradicionales construidas con varillas, instalaciones modulares, móviles y temporales, o cualquier otra construcción, instalación y/o distribución adecuada. Por ejemplo, en algunas realizaciones se pueden utilizar salas limpias modulares. Además, y a no ser que se indique algo distinto, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden alojar y/o realizar en una única ubicación o instalación o, alternativamente, se pueden alojar y/o realizar en ubicaciones y/o instalaciones separadas o múltiples.

A título de ejemplos no limitantes y sin limitación, las publicaciones de EE.UU. n^{os} 2013/0280797, 2012/0077429, 2011/0280797, 2009/0305626, y las patentes estadounidenses n^{os} 8.298.054, 7.629.167 y 5.656.491 describen instalaciones, equipos y/o sistemas ejemplares que pueden ser adecuados para su uso con las composiciones y los métodos descritos en este documento.

Las composiciones y los métodos descritos en este documento pueden utilizar un amplio espectro de células. En realizaciones, las células son células eucariotas; por ejemplo, células de mamífero. Las células de mamífero pueden ser, por ejemplo, líneas celulares o cepas celulares humanas o de roedores o bovinos. Ejemplos de tales células, líneas celulares o cepas celulares son, por ejemplo, líneas celulares de mieloma de ratón (NSO), líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), HT1080, H9, HepG2, MCF7, MDBK Jurkat, NIH3T3, PC12, BHK (células de riñón de hámster bebé), VERO, SP2/0, YB2/0, Y0, C127, células L, COS, por ejemplo, COS1 y COS7, QC1-3, HEK-293, VERO, PER.C6, HeLA, EB1, EB2, EB3, líneas de células oncolíticas o de hibridoma. Preferiblemente, las células de mamífero son líneas de células CHO. En una realización, la célula es una célula CHO. En una realización, la célula es una célula CHO-K1, una célula CHO-K1 SV, una célula DG44 CHO, una célula DUXB11 CHO, una célula CHOS, una célula CHO GS inactivada, una célula CHO FUT8 GS inactivada, una célula CHOZN o una célula derivada de CHO. La célula CHO GS inactivada (por ejemplo, la célula de GSKO) es, por ejemplo, una célula CHO-K1 SV GS inactivada. La célula CHO FUT8 inactivada es, por ejemplo, la Potelligent® CHOK1 SV (Lonza Biologics, Inc.). Las células eucariotas también pueden ser células, líneas celulares o cepas celulares aviares, como por ejemplo, células EBx®, EB14, EB24, EB26, EB66 o EBv13.

En una realización, las células eucariotas son células madre. Las células madre pueden ser, por ejemplo, células madre pluripotentes, incluidas células madre embrionarias (ESC), células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre específicas de tejido (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) y células madre mesenquimales (MSC).

En una realización, la célula es una forma diferenciada de cualquiera de las células descritas en el presente documento. En una realización, la célula es una célula derivada de cualquier célula primaria en cultivo.

En realizaciones, la célula es un hepatocito, tal como un hepatocito humano, un hepatocito animal o una célula no parenquimatosa. Por ejemplo, la célula puede ser un hepatocito humano apto para metabolismo plaqueable, un hepatocito humano apto para inducción plaqueable, un hepatocito humano Qualyst Transporter Certified™ plaqueable, un hepatocito humano apto para suspensión (incluidos los hepatocitos agrupados de 10 donadores y 20 donadores), células de Kupffer hepáticas humanas, células estrelladas hepáticas humanas, hepatocitos de perro (incluidos los hepatocitos individuales y agrupados de Beagle), hepatocitos de ratón (incluidos los hepatocitos CD-1 y C57Bl/6), hepatocitos de rata (incluidos los hepatocitos de Sprague-Dawley, Wistar Han y Wistar), hepatocitos de mono (incluidos los hepatocitos de mono Cynomolgus o Rhesus), los hepatocitos de gato (incluidos los hepatocitos del gato doméstico de pelo corto) y los hepatocitos de conejo (incluidos los hepatocitos de conejo blanco de Nueva Zelanda). Hay hepatocitos ejemplares disponibles comercialmente en Triangle Research Labs, LLC, 6 Davis Drive

Research Triangle Park, Carolina del Norte, EE. UU. 27709.

5 En una realización, la célula eucariota es una célula eucariota inferior, como, por ejemplo una célula de levadura (por ejemplo, del género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri* *Pichia angusta*), del género *Komagataella* (por ejemplo, *Komagataella pastoris*, *Komagataella pseudopastoris* *Komagataella phaffii*), del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces uvarum*), del género *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*), del género *Candida* (por ejemplo, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Candida boidinii*), del género *Geotrichum* (por ejemplo, *Geotrichum fermentans*), *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* o *Schizosaccharomyces pombe*. Se prefiere la especie *Pichia pastoris*. X33, GS115, KM71, KM71H; y CBS7435 son ejemplos de cepas de *Pichia pastoris*.

10 En una realización, la célula eucariota es una célula fúngica (por ejemplo, *Aspergillus* (tal como *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. nidula*), *Acromonium* (tal como *A. thermophilum*), *Chaetomium* (tal como *C. thermophilum*), *Chrysosporium* (tal como *C. thermophilum*), *Cordyceps* (tal como *C. militaris*), *Corynascus*, *Ctenomyces*, *Fusarium* (tal como *F. oxysporum*), *Glomerella* (tal como *G. graminicola*), *Hypocrea* (tal como *H. jecorina*), *Magnaporthe* (tal como *M. oryzae*), *Myceliophthora* (tal como *M. thermophilum*), *Nectria* (tal como *N. haematococca*), *Neurospora* (tal como *N. crassa*), *Penicillium*, *Sporotrichum* (tal como *S. thermophilum*), *Thielavia* (tal como *T. terrestris*, *T. heterothallica*), *Trichoderma* (tal como *T. reesei*) o *Verticillium* (tal como *V. dahlia*)).

15 En una realización, la célula eucariota es una célula de insecto (por ejemplo, células Sf9, Mimic™ Sf9, Sf21, High Five™ (BT1-TN-5B1-4) o BT1-Ea88), una célula de alga (por ejemplo, de los géneros Amphora, Bacillariophyceae, Dunaliella, Chlorella, Chlamydomonas, Cyanophyta (cianobacterias), Nannochloropsis, Spirulina u Ochromonas), o una célula vegetal (por ejemplo, células de plantas monocotiledóneas (por ejemplo, maíz, arroz, trigo o Setaria), o de plantas dicotiledóneas (por ejemplo, mandioca, patata, soja, tomate, tabaco, alfalfa, Physcomitrella patens o Arabidopsis).

20 En realizaciones, las células cultivadas se usan para producir proteínas- por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o proteínas recombinantes- para uso terapéutico. En realizaciones, las células cultivadas producen péptidos, aminoácidos, ácidos grasos u otros intermedios bioquímicos o metabolitos útiles. Por ejemplo, en realizaciones, se pueden producir moléculas que tienen un peso molecular de aproximadamente 4000 daltones a más de aproximadamente 140.000 daltones. En realizaciones, estas moléculas pueden tener un intervalo de complejidad y pueden incluir modificaciones postraduccionales que incluyen glicosilación.

Ejemplificación

30 **Ejemplo 1: Investigación de la expresión de la pirrolina-5-carboxilato sintasa e inhibidores de la misma para su uso en un sistema de selección del metabolismo de la prolina en mamíferos**

35 La pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) es la enzima limitante responsable de la síntesis de prolina a partir del glutamato. En la Figura 1 se muestra una ilustración simplificada de esta vía. Dado que el metabolismo de la prolina es fundamental para la supervivencia celular, las células cultivadas en medios sin prolina deberían ser incapaces de sobrevivir. Alternativamente, aquellas células con abundante expresión de P5CS y, por tanto, con capacidad de generar prolina eficazmente a partir de glutamato, deberían permitir la supervivencia celular en estas condiciones, facilitando así la selección apropiada de las células deseadas.

40 Para evaluar esta hipótesis, primero se sintetizó y clonó un vector portador del gen P5CS para generar un constructo que incluyera este gen de interés y el gen indicador eGFP (Figura 2). Tras la transfección, este vector debería inducir niveles de expresión de P5CS más allá de los observados endógenamente en las células CHO, lo que permite altas tasas de síntesis de prolina y, por lo tanto, facilita la supervivencia celular en ausencia de prolina externa normalmente presente en el medio. En teoría, las células que expresan abundante P5CS debido a la transfección del constructo también deberían expresar el gen eGFP.

45 Si bien una sobreexpresión de P5CS puede ser suficiente para seleccionar células en ausencia de prolina, los inhibidores de esta enzima pueden mejorar la rigurosidad de este sistema. La propia prolina es un inhibidor eficaz de P5CS, ya que forma parte de un circuito de retroalimentación endógena en las células CHO. Los inhibidores identificados para su uso en este sistema incluyen análogos de prolina. En el presente documento se muestra que los inhibidores ejemplares son inhibidores eficaces de actividad de P5CS *in vitro*.

Crecimiento celular en ausencia de prolina

50 En un experimento, se cultivaron células diseñadas para inactivar la expresión de glutamina sintetasa endógena (células GSKO) en ausencia de prolina para determinar el efecto que esto tenía sobre el crecimiento. Las células GSKO se sembraron a $0,2 \times 10^6$ células/ml en un volumen de cultivo total de 20 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Las células se cultivaron usando CD-CHO con (Glut 6 mM) o sin L-glutamina (Sin glut) o en medio CM76 sin prolina (Sin pro) pero con L-glutamina 6 mM. Los recuentos de células viables y la viabilidad del cultivo se midieron cada 24 horas utilizando un instrumento ViCell.

Las células GSKO no pudieron crecer cuando se cultivaron en ausencia de prolina (Figura 3). Sin embargo, las

células cultivadas en ausencia de L-glutamina mostraron una disminución en la viabilidad del cultivo a lo largo del tiempo. Esto era de esperar, ya que estas células se han diseñado para eliminar la expresión endógena de glutamina sintetasa, la enzima que limita la velocidad en la producción de glutamina.

Tasa de reversión de células cultivadas en ausencia de prolina

5 Se determinó el número de células revertidas que surgen de cultivos incubados en medio sin prolina para evaluar la idoneidad de aprovechar el metabolismo de la prolina para su uso en un sistema de selección. Sucintamente, las células GSKO de Lonza se sembraron en CD-CHO con L-glutamina 6 mM, CD-CHO sin L-glutamina o CM76 con L-glutamina 6 mM y sin prolina, ya fuera a 1000 o 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, de manera que el volumen de cultivo fue de 200 μ l por pocillo. Se sembraron un total de 30 placas en cada medio donde se cultivaron 15 a 1000 células por pocillo y 15 se cultivaron a 5000 células por pocillo. Las colonias revertidas se identificaron usando microscopía observada después de 11 días.

15 El 100% de los pocillos sembrados en CD CHO con L-glutamina 6 mM confluyeron después de 11 días, mientras que no se observaron colonias revertidas cuando se cultivaron en medio sin L-glutamina. De un total de $8,64 \times 10^6$ células cultivadas en ausencia de prolina, se observaron 15 colonias revertidas, 13 observadas en placas sembradas con 5.000 células por pocillo y 2 colonias observadas en placas sembradas con 1.000 células por pocillo.

Sobreexpresión de P5CS para seleccionar células que expresan un gen de interés

20 Se demostró anteriormente que la exclusión de prolina del medio de cultivo dio como resultado una falta de crecimiento de células GSKO. Se planteó la hipótesis de que la sobreexpresión de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de prolina endógena, era suficiente para recuperar el crecimiento en ausencia de prolina exógena, proporcionando así un sistema de selección eficiente. Para evaluar esta hipótesis, se transfectaron células con plásmidos portadores del gen P5CS para facilitar su sobreexpresión y se cultivaron en ausencia de prolina. Sucintamente, los plásmidos se construyeron para que incluyeran glutamina sintetasa (GS) o P5CS, así como un gen indicador de eGFP. También se incluyó un vector de control que no contiene ningún gen o indicador de "selección"; incluye solo el gen Etanercept para inducir una carga celular similar a la de otros plásmidos incluidos en este experimento. En la Figura 4 se muestran los esquemas de los vectores usados. Los plásmidos construidos se transfectaron transitoriamente en células GSKO mediante electroporación y se cultivaron en diferentes medios: CD-CHO, medio CM76 sin tirosina o medio CM76 sin prolina (todos los cuales se complementaron para incluir una concentración final de L-glutamina 6 mM). El volumen de cultivo total fue de 20 ml (originalmente sembrado a $0,2 \times 10^6$ células/ml) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml a 37°C agitando a 140 rpm y se tomaron muestras para recuentos y análisis mediante citometría de flujo a las 72 y 168 horas después de la transfección.

35 La Figura 5 muestra los datos obtenidos tras la transfección de células GSKO transfectadas transitoriamente con los vectores descritos en la Figura 4 y posteriormente cultivado en el medio especificado. Las células cultivadas en medio sin tirosina o sin prolina muestran una tasa de crecimiento reducida a las 72 horas después de la transfección en comparación con las células cultivadas en CD-CHO, independientemente del plásmido que se introdujo (Figura 5A). Esta observación es coherente con los patrones descritos anteriormente. Sin embargo, se observó un aumento de la concentración de células viables a las 168 horas después de la transfección con el vector que contenía P5CS en el medio libre de prolina en comparación con cuando se usó cualquier otro vector. Además, la introducción de este vector no dio como resultado un mayor número de células viables logrado en medio libre de tirosina, lo que sugiere que la P5CS fue capaz de compensar específicamente la ausencia de prolina exógena.

45 A pesar de las diferencias observables en las concentraciones de células viables, la viabilidad del cultivo no se vio afectada significativamente en general tras el cultivo en diferentes medios (Figura 5B). Es de destacar que la transfección con el constructo que contiene P5CS seguida de un cultivo posterior a las 72 horas fue menor que los valores obtenidos con transfecciones alternas cultivadas en el mismo medio. Es posible que esto se deba a una carga celular adicional sobre estas células debido al aumento de la síntesis de prolina, además de la falta de tirosina disponible. Esta tendencia no se observó en el instante de 168 horas. La viabilidad de las células cultivadas en CD-CHO fue generalmente menor en el instante de 168 horas, pero esto probablemente se debió a los perfiles de crecimiento típicos de estas células, que se espera que estén en fase de declive en este instante, a diferencia de las células cultivadas en otros medios que no han seguido las tendencias de crecimiento típicas.

50 El análisis usando citometría de flujo mostró que la combinación de transfección con el plásmido que contiene P5CS y el cultivo posterior en medio libre de prolina dio como resultado la fluorescencia media más alta de las condiciones medidas en ambos instantes (Figura 5C). En general, las células cultivadas en ausencia de prolina mostraron valores de fluorescencia media más altos que las cultivadas sin tirosina exógena y la inclusión de P5CS en el plásmido transitorio y el cultivo posterior en medio libre de tirosina mostraron una fluorescencia media más alta que cuando se incluyó GS en su lugar, lo que sugiere que la sobreexpresión de P5CS puede tener un efecto amplio sobre el aumento de la expresión de eGFP. Sin embargo, es evidente que la combinación de la sobreexpresión de P5CS tiene un efecto más profundo en las células cultivadas posteriormente en medio libre de prolina, confirmado por el gran aumento en los valores medios de fluorescencia y reforzado por valores muy aumentados observados en el porcentaje de células que superan un umbral de intensidad de fluorescencia predeterminada (Figura 5D).

Estos datos apoyan colectivamente la hipótesis de que el crecimiento celular detenido observado cuando se cultivan células GSKO en ausencia de prolina puede recuperarse mediante la sobreexpresión del gen P5CS. Además, esto puede tener un efecto significativo sobre la expresión de un gen indicador en términos tanto de expresión general como del porcentaje de células que expresan el gen indicador en una población transitoria.

5 **Generación de repositorios de células estables que expresan un gen de interés**

Para evaluar la capacidad del sistema de prolina/P5CS para generar repositorios de células recombinantes, los vectores que comprenden el gen P5CS y un gen de interés se transfectaron en células y posteriormente se cultivaron en ausencia de prolina en un intento de generar repositorios de células recombinantes. Sucintamente, se electroporaron 1×10^7 células GSKO de Lonza con 20 μg de plásmido que se linealizó primero usando la enzima de restricción PvuI (NEB) y se purificó usando precipitación con acetato de sodio y etanol. El constructo utilizado contenía tanto el gen P5CS para la evaluación como un marcador de selección como eGFP como gen indicador. Las transfecciones se llevaron a cabo en medio CM76 en ausencia de prolina pero complementadas con L-glutamina para lograr una concentración final de 6 mM. A continuación, las células se cultivaron en 25 ml de este medio en un matraz T75 durante 10 días antes de ser transferidas a 10 ml de cultivo en suspensión, también en medio ausente de prolina. El repositorio resultante se analizó mediante citometría de flujo. Las muestras de células se centrifugaron primero a 1.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 500 μl de PBS. A continuación, se cargaron las muestras en la sonda de un FACScalibur™ (BD biosciences) y se midió la intensidad de la fluorescencia en relación con el recuento de células. La dispersión directa (FSC, por sus siglas en inglés) se midió usando el amplificador E-1 y la dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés) se fijó en 465 mientras el FL1 registraba células en 473; todos los ajustes se convirtieron a escalas logarítmicas. Para facilitar la adherencia de las células en suspensión, los cubreobjetos se sumergieron primero en poli-L-lisina y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retiraron los cubreobjetos y se dejaron secar en un entorno estéril antes de transferirlos a una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron a 37°C durante la noche para facilitar la adherencia de las células al cubreobjetos antes de aspirar el medio y añadir 250 μl de paraformaldehído al 4% en PBS e incubaron durante 20 minutos a 37°C para fijar las células. Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados de 1 ml de PBS antes de añadir 250 μl de Triton X100 al 0,1% en PBS y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las células. Las células fijadas y permeabilizadas se bloquearon añadiendo 250 μl de BSA al 3% en PBS por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto se aspiró y los cubreobjetos se sacaron de los pocillos y se colocaron boca abajo sobre una gota previamente preparada de 100 μl de PBS, lo que se repitió tres veces más. Los cubreobjetos se secaron tocando el borde de un tejido y se transfirieron a una gota de 25 μl del anticuerpo primario apropiado. Esto se dejó incubar a 4°C durante la noche. El anticuerpo secundario apropiado se diluyó en consecuencia en BSA al 3% en PBS. Los cubreobjetos se colocaron boca abajo sobre gotas de 100 μl de Tween al 0,1% en PBS y se dejaron durante 5 minutos. Estos se transfirieron luego a gotas frescas cuatro veces y se dejaron durante 10 minutos entre las dos últimas transferencias. Luego se colocaron en gotas de anticuerpo secundario de 25 μl y se dejaron durante 2 horas y se dejaron en la oscuridad a 4°C. Se llevaron a cabo cinco lavados finales utilizando 5 gotas secuenciales de 100 μl . Cuando se requirió tinción con DAPI, los cubreobjetos se transfirieron a una gota de 50 μl de DAPI a 10 mg/ml entre la segunda y la tercera gotas de PBS. Por último, las células se montaron en portaobjetos de células utilizando el montante de fluorescencia ProLong Gold (ThermoScientific) y se dejaron reposar durante la noche. Las imágenes se recogieron utilizando un microscopio confocal Zeiss. El instrumento de citómetro de flujo se calibró de manera que las células anfitrionas no superaran el valor de intensidad de fluorescencia de 10^1 ; por tanto, se considera que las células que superan este umbral predeterminado expresan eGFP.

La Figura 6A muestra un histograma obtenido del repositorio generado usando el sistema de selección basado en P5CS usando citometría de flujo. Dado que muchas células tienen una intensidad de fluorescencia superior al umbral de 10^1 , es evidente que el sistema de selección P5CS es capaz de seleccionar las células que expresan un gen de interés. Sin embargo, hay presente una población de células con valores de intensidad de fluorescencia por debajo de 10^1 , lo que sugiere que sigue habiendo en el repositorio células que no lo expresan. Puede ser importante aumentar el rigor del sistema. La Figura 6B muestra una imagen del repositorio sintetizado obtenida mediante microscopía de fluorescencia. Esta imagen apoya los datos mostrados en la Figura 6A, dado que las poblaciones de células están presentes con diferentes niveles de expresión de eGFP y no todas las células presentes expresan necesariamente el gen indicador de eGFP.

Ambas Figuras 6B y 6C muestran los patrones de expresión de los genes P5CS. Estas imágenes muestran puntos puntiformes coherentes con la localización de P5CS en las mitocondrias que se ha documentado previamente en la bibliografía. Además, la Figura 6C muestra una comparación del repositorio P5CS/eGFP con el anfitrión GSKO. Las imágenes muestran que el repositorio seleccionado tiene niveles de expresión más altos de P5CS que el anfitrión, pero esta observación no es exclusiva de las células que expresan el gen indicador eGFP. Dado que se demostró que una fracción de las células anfitrionas podían revertirse en ausencia de prolina, es posible que las células que no contienen el vector transfectado pudieran sobrevivir al proceso de selección descrito sin la necesidad de sobreexpresión de P5CS. Quizás la ausencia de prolina también selecciona las células que expresan endógenamente una P5CSamplia.

Los repositorios de células construidos usando el sistema P5CS se examinaron mediante análisis de transferencia Western de muestras de lisado tomadas de los repositorios de células. Todos los vectores utilizados para generar estos

repositorios contenían el gen de P5CS y uno de eGFP o SCD1 (impulsado por el promotor SV40 o mCMV), marcado, y la muestra de control se construyó utilizando un vector que contenía P5CS solo. Las células GSKO se transfectaron mediante electroporación con los vectores linealizados antes mencionados y posteriormente se cultivaron en ausencia de prolina durante dos semanas antes de transferirlos a cultivos en suspensión. Como se muestra en la Figura 7, las transferencias Western de lisados de los repositorios de células resultantes mostraron que se sobreexpresaba SCD1 en los repositorios de células relevantes (SV40 SCD1 y mCMV SCD1), en comparación con los controles eGFP y nulos, lo que muestra que el sistema P5CS era adecuado para procesos de construcción de líneas celulares. Además, también se transfectó un vector de control que carecía del gen P5CS, pero las células resultantes no crecieron en ausencia de prolina, lo que demuestra que la sobreexpresión de P5CS es crucial para su supervivencia.

10 **Repositorios de células cultivadas en presencia de inhibidores de P5CS**

Repositorios de células cultivadas en placas de 96 pocillos profundos

Los datos se obtuvieron a partir de repositorios de células construidas usando el vector P5CS/eGFP (como se ha descrito anteriormente) cuando se cultivaron en un medio que carecía de prolina pero complementado con diferentes concentraciones del inhibidor de P5CS ácido L-azetidina-2-carboxílico. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos y se sembraron a razón de $0,2 \times 10^6$ células/ml en suspensión. El número de células viables (Figura 8A), la viabilidad del cultivo (Figura 8B), la fluorescencia media (Figura 8C), las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^2 (Figura 8D) y las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^3 (Figura 8E) se determinaron todos a las 24, 96, 168 y 216 horas de cultivo. Si bien un aumento en la concentración de inhibidor dio como resultado un crecimiento celular más lento, también se observó una fluorescencia media más alta, lo que muestra que la adición del inhibidor pudo enriquecer la expresión de eGFP de una población policlonal existente. La Figura 8F muestra el análisis de transferencia Western de muestras de lisado tomadas en los mismos instantes. Las transferencias se hibridaron para resaltar la P5CS, la β -actina y la eGFP.

Los datos se obtuvieron a partir de repositorios de células construidas usando el vector P5CS/eGFP (como se ha descrito anteriormente) cuando se cultivaron en un medio que carecía de prolina pero complementado con diferentes concentraciones del inhibidor de P5CS 3,4-deshidro-L-prolina. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos y se sembraron a razón de $0,2 \times 10^6$ células/ml en suspensión. El número de células viables (Figura 9A), la viabilidad del cultivo (Figura 9B), la fluorescencia media (Figura 9C), las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^2 (Figura 9D) y las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^3 (Figura 9E) se determinaron todos a las 24, 96, 168 y 216 horas de cultivo. Si bien un aumento en la concentración de inhibidor dio como resultado un crecimiento celular más lento, también se observó una fluorescencia media más alta, lo que muestra que la adición del inhibidor pudo enriquecer la expresión de eGFP de una población policlonal existente. La Figura 9F muestra el análisis de transferencia Western de muestras de lisado tomadas en los mismos instantes. Las transferencias se hibridaron para resaltarla P5CS, la β -actina y la eGFP.

Los datos se obtuvieron a partir de repositorios de células construidas usando el vector P5CS/eGFP (como se ha descrito anteriormente) cuando se cultivaron en un medio que carecía de prolina pero complementado con diferentes concentraciones del inhibidor de P5CS ácido L-4-tiazolidinacarboxílico. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos y se sembraron a razón de $0,2 \times 10^6$ células/ml en suspensión. El número de células viables (Figura 10A), la viabilidad del cultivo (Figura 10B), la fluorescencia media (Figura 10C), las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^2 (Figura 10D) y las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^3 (Figura 10E) se determinaron todos a las 24, 96, 168 y 216 horas de cultivo. Si bien un aumento en la concentración de inhibidor dio como resultado un crecimiento celular más lento, también se observó una fluorescencia media más alta, lo que muestra que la adición del inhibidor pudo enriquecer la expresión de eGFP de una población policlonal existente. La Figura 10F muestra el análisis de transferencia Western de muestras de lisado tomadas en los mismos instantes. Las transferencias se hibridaron para resaltarla P5CS, la β -actina y la eGFP.

Repositorios de células cultivadas en placas de 24 pocillos

Los datos se obtuvieron a partir de repositorios de células construidas usando el vector P5CS/eGFP (como se ha descrito anteriormente) cuando se cultivaron en un medio que carecía de prolina pero complementado con diferentes concentraciones del inhibidor de P5CS ácido L-azetidina-2-carboxílico. Las células se cultivaron en placas estáticas de 24 pocillos y se sembraron inicialmente a razón de $0,2 \times 10^6$ células/ml. El número de células viables (Figura 11A), la viabilidad del cultivo (Figura 11B), la fluorescencia media (Figura 11C), las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^2 (Figura 11D) y las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^3 (Figura 11E) se determinaron todos a las 24, 96, 168 y 216 horas de cultivo. Si bien un aumento en la concentración de inhibidor dio como resultado un crecimiento celular más lento, también se observó una fluorescencia media más alta, lo que muestra que la adición del inhibidor pudo enriquecer la expresión de eGFP de una población policlonal existente.

Los datos se obtuvieron a partir de repositorios de células construidas usando el vector P5CS/eGFP (como se ha descrito anteriormente) cuando se cultivaron en un medio que carecía de prolina pero complementado con diferentes

5 concentraciones del inhibidor de P5CS 3,4-deshidro-L-prolina. Las células se cultivaron en placas estáticas de 24 pocillos y se sembraron inicialmente a razón de $0,2 \times 10^6$ células/ml. El número de células viables (Figura 12A), la viabilidad del cultivo (Figura 12B), la fluorescencia media (Figura 12C), las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^2 (Figura 12D) y las células expresadas más allá de un umbral de fluorescencia predeterminado de 10^3 (Figura 12E) se determinaron todos a las 24, 96, 168 y 216 horas de cultivo. Si bien un aumento en la concentración de inhibidor dio como resultado un crecimiento celular más lento, también se observó una fluorescencia media más alta, lo que muestra que la adición del inhibidor pudo enriquecer la expresión de eGFP de una población policlonal existente.

10 **Ejemplo 2: modificadores del metabolismo de los lípidos para mejorar la producción de anticuerpos en las células anfitrionas**

15 Se ha demostrado que la manipulación de modificadores del metabolismo de lípidos (LMM) estearoil-CoA desaturasa-1 (SCD1), el factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador de esterol (SREBF1) y una isoforma SREBF1 truncada, SREB411, que comprende la porción de SREBF1 que migra al núcleo y carece de dominios reguladores SREBF1, mejora la producción del anfitrión CHOK1SV GS-KO y la calidad del producto de proteínas complejas y de los mAb estándar.

Se planteó la hipótesis de que si la expresión de estos LMM se modificaba en anfitriones CHOK1SV GS-KO de una manera industrial de GMPC, se produciría una mejora significativa en el título y la calidad del producto. El objetivo es insertar el gen LMM deseado en una línea celular existente o ser capaz de crear una nueva línea celular anfitriona que exprese uno de los genes LLM con el sistema de selección GS comercial intacto.

20 Para alcanzar este objetivo y probar la hipótesis, era necesario determinar el nivel de expresión y cuál de los genes LMM sería más aplicable. Para ello se produjeron varios vectores (Tabla 9): cuatro vectores (A-D) que expresan una proteína recombinante y el marcador de selección GS, y diez (1-10) que expresan una combinación específica de promotor + gen LMM.

Tabla 9. Vectores utilizados para generar repositorios de células de prueba de concepto que contendrán una molécula recombinante y sobreexpresarán un LMM.

Vector	Selección	Molécula recombinante
A	Glutamina sintetasa	B72.3
B	Glutamina sintetasa	Infliximab
C	Glutamina sintetasa	Cergutuzumab
D	Glutamina sintetasa	Etanercept
Vector	Promotor	Modificador del metabolismo lipídico (LMM)
1	SV40	SCD1
2	SV40	SREBF1 (CHO)
3	SV40	SREB411 (CHO)
4	mCMV	SCD1
5	mCMV	SREBF1 (CHO)
6	mCMV	SREB411 (CHO)
7	PGK	SCD1
8	PGK	SREBF1 (CHO)
9	PGK	SREB411 (CHO)
10	mCMV	N/D

5 Todas las combinaciones de estos vectores se seleccionarían luego cotransfectando un vector de molécula recombinante más un promotor + vector del gen LMM. La transfección se realizó utilizando el 4D-Nulcofactor (Lonza) siguiendo el protocolo estándar; esto produciría 96 cultivos duplicados por condición (cotransfección). A continuación, se evaluaría el crecimiento celular de estos repositorios duplicados de células transfectadas durante el cultivo y la producción de proteínas recombinantes en condiciones de lotes alimentados. Estos datos se analizarían luego para determinar qué combinaciones de promotor + LMM harían candidatos adecuados para un análisis adicional y/ola construcción de líneas celulares.

Crecimiento y transfección de células GSKO

15 Se cultivaron células GS-KO CHO en CD-CHO + L-glutamina 6 mM. Cada 4 días, los cultivos se subcultivaron; se contaron 0,6 ml de cada cultivo parental usando una máquina Vicell-XR, registrando 50 imágenes por cultivo. Los cultivos hijos se sembraron a razón de $0,2 \times 10^6$ células viables/ml; a continuación, los cultivos se gasificaron con CO₂ al 5% y se incubaron a 36,5°C, 140 rpm.

20 En el día 2 o 3 del subcultivo, se contaron las células GS-KO usando un ViCell-XR; a continuación, se tomó un volumen igual a 2×10^7 células viables/ml y se centrifugó a 100 g durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó mediante pipeteo y el sedimento se resuspendió en 200 µl de solución SF (proporcionada con el kit 4D-nucleofactor). A continuación, se añadieron los vectores deseados de la transfección a 200 µl de la suspensión de células/SF en volúmenes para dar 6 µg por vector (vector LMM y proteína recombinante). A continuación, la suspensión de ADN/células/SF se dividió en partes iguales por la mitad y se pipeteó en una cubeta de nucleofactor 4D con cuidado de no provocar la formación de burbujas en la cubeta. Los volúmenes añadidos a las cubetas dependieron del volumen total después de la adición de vectores de ADN (normalmente entre 103-108 µl).

25 A continuación, las cubetas se colocaron en el nucleofactor 4D y se sometieron a pulsaciones utilizando el código de impulso DU158. Si ambos impulsos fallaban (indicado por un “-” rojo en el medio de visualización) se tomó un nuevo volumen de 2×10^7 células y se reinició el método. Cuando pasó el impulso (indicado por un “+” verde en el medio de visualización), se pipetearon en la cubeta ~500 µl de 40 ml de un medio de transfección precalentado (37°C) (40 ml de CD-CHO, 0,4 ml de SP4, 0,04 ml de rojo de fenol concentrado ($\times 1000$)) y luego se transfirió todo el volumen de cultivo a los 40 ml del medio de transfección; a continuación, se utilizó una pipeta de Pasteur para “purgar” las células residuales de la cubeta utilizando el medio de transfección. El cultivo de células transfectantes se transfirió luego a dos placas de 96 pocillos (100 µl de cultivo por pocillo) y se incubó durante la noche a 36,5°C, 10% de CO₂.

35 El día 1 después de la transfección, se añadieron 100 µl por pocillo de medio de transfección + MSX 100 µM a cada placa de cultivos transfectados. Las placas/cultivos se incubaron a 36,5°C, 10% de CO₂ durante 6 días. El día 7 después de la transfección, se retiraron cuidadosamente 150 µl por pocillo/cultivo de cada placa de cultivos transfectados y se añadió medio de transfección nuevo + MSX 50 µM a cada pocillo/cultivo. A continuación, se monitorizó la recuperación de los cultivos tras la transfección.

Se observó recuperación celular después de la transfección aproximadamente a los 10 días después de la transfección. Esto se hizo observando el color del medio de transfección, así como utilizando espejos de clonación para evaluar la confluencia de cada pocillo mediante inspección visual. Los fondos de los pocillos aparecerían opacos si las células habían crecido y el rojo de fenol en el medio de transfección se volvía amarillo tras la producción de ácido láctico, que se utilizó como indicador del crecimiento celular. Una vez que se consideró que >75% de los cultivos eran confluentes en >75-80%, se consideró que los cultivos de la placa se recuperaron y se transfirieron a placas de pocillos profundos.

Como se muestra en la Figura 13, la tasa de recuperación entre las proteínas recombinantes con la excepción de Cergutuzumab pareció ser similar. Es posible que esto se deba a la naturaleza de la estructura del Cergutuzumab; tiene una molécula de IL-2 (interleucina-2) unida a la región Fc de la estructura de los anticuerpos. Es posible que esta IL-2 inhiba la tasa de crecimiento de las células transfectadas; posiblemente por su acción molecular sobre las células después de que la molécula de Cergutuzumab haya sido secretada por las células. También podría ser que se deba a que el constructo de mAB-IL-2 está limitando los recursos celulares, lo que ralentizará la tasa de recuperación.

Crecimiento de repositorios de células transfectadas en placas de pocillos profundos

Una vez que los cultivos se recuperaron, cada pocillo se mezcló mediante pipeteo para suspender las células que se asentaron en el fondo. Una vez que las células se suspendieron en cultivo, se transfirieron 150 μ l a 150 μ l de medio fresco (CD CHO, SP4 al 1%, MSX 50 μ M) en una placa de pocillos profundos (DWP, por sus siglas en inglés). A continuación, se incubaron placas de pocillos profundos con cultivo celular a 36,5°C, 5% de CO₂, 200 rpm y 90% de humedad.

El primer subcultivo en DWP se realizó el día 4, 5 o 6, dependiendo de la tasa de crecimiento de los cultivos. Las células se contaron mediante Celigo; a continuación, las células se sembraron en 300 μ l de CM66 + MSX 50 μ M a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células viables/ml. Las DWP hijas se incubaron entonces a 36,5°C, 5% de CO₂, 200 rpm y 90% de humedad. A continuación, se realizaron subcultivos posteriores en un programa de 4 días. Los cultivos/pocillos individuales se contaron utilizando el sistema Celigo; a continuación, se promediaron los recuentos en la condición para generar los resultados de la Figura 14. En el primer subcultivo, el medio se cambió del medio de transfección al medio de crecimiento, y en el subcultivo 3, el medio de crecimiento se cambió a medio de producción para comenzar el sobrecrecimiento de lotes alimentados abreviado (aFOG).

Las Figuras 14A-14D muestran la concentración de células viables (CCV) promediada de todas las células transfectadas recuperadas en cultivos en placa de pocillos profundos. Se recuperaron Etanercept + mCMV SREB411 y Etanercept + mCMV SREBF1 (Figura 14A) a una velocidad más lenta que las otras condiciones. Se decidió que, por razones prácticas, subcultivar las otras condiciones una vez más para permitir que todas las condiciones entren en el aFOG al mismo tiempo. Esta fue la razón de un subcultivo adicional registrado para las condiciones de Etanercept + LMM.

En general, la CCV promedio de los cultivos a través de las condiciones pareció estabilizarse/igualarse alrededor del tercer subcultivo, con todas las CCV promedio de las condiciones agrupadas entre sí.

Sobrecrecimiento de lotes alimentados abreviado de repositorios de transfectantes

Con el fin de evaluar la productividad de los repositorios de células LMM, los repositorios se colocaron en un sobrecrecimiento de lotes alimentados para simular las condiciones a escala de biorreactor. Sucintamente, en el tercer subcultivo en DWP, las células se contaron usando Celigo y posteriormente se sembraron en 300 μ l de CM71 a una concentración de $0,3 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se incubaron a 36,5°C, 5% CO₂, 200 rpm y 90% de humedad durante 12 días. El día 4 y el día 8 se alimentaron los cultivos y se contaron las concentraciones de células a través de Celigo. El día 12, las placas se centrifugaron a 300 rpm durante 10 minutos; se recogieron 200 μ l del sobrenadante en una placa estéril de 96 pocillos. El sobrenadante de los sedimentos celulares restante se lavó con 200 μ l de PBS y se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos; a continuación, se eliminó la mayor cantidad posible del lavado con PBS (~ 200 μ l) y se transfirieron los sedimentos celulares a -20°C. El sobrenadante recogido se centrifugó a 3000 rpm y luego se transfirieron 180 μ l a una nueva placa de 96 pocillos. El sobrenadante recogido se almacenó luego a 4°C durante la noche para su análisis mediante un instrumento Octet al día siguiente.

Las células se sembraron a una densidad celular más baja que el subcultivo rutinario ($0,3 \times 10^6$ CCV/ml: aFOG; $0,5 \times 10^6$ CCV/ml: Subcultivo), en el medio de producción, que es muy similar al medio de crecimiento de subcultivo, por lo que cualquier cambio en el perfil de crecimiento debido al cambio de medio debe ser mínimo (Figuras 15A-15D). La medición de la CCV se tomó los mismos días que la alimentación y la cosecha; esto permitió un esquema general de cada uno de los perfiles de crecimiento de las condiciones durante la producción. Este método proporciona datos de crecimiento limitados y, por lo tanto, es posible que no se alcanzara el pico de crecimiento para algunas de las condiciones. Estos datos ausentes afectarán el cálculo de la IVC (integral de tiempo de la concentración de células viables [por sus siglas en inglés] en un cultivo por hora por mililitro) y la Qp (productividad específica como pg/célula/h); como todos los cultivos y las condiciones tienen la misma limitación, los datos podrían considerarse comparables.

Los perfiles de crecimiento de varias de las condiciones en etanercept e infliximab sugieren que la CCV alcanza su

punto máximo entre los días 4 y 8. La expresión de SREBF1 podría retrasar el crecimiento del cultivo después del día 4. Esto es sugerido por el crecimiento de las condiciones de SV40/PGK SREBF1.

Lo más probable es que la varianza en cada instante se deba al hecho de que los cultivos que se cuentan son cada uno un repositorio de células transfectadas; por lo tanto, el número de copias de ambos vectores variará y esto afectará el crecimiento celular. La mitigación de la varianza se logró mediante el uso de 96 cultivos individuales por condición y tomando un promedio. Con esto, la expectativa es que si la combinación del promotor, el gen LMM y la proteína recombinante tuviera un efecto significativo, la variación completa de la condición cambiaría.

Medición de la concentración de producto posterior al aFOG

La concentración de producto se midió usando biosensores de proteína A en un instrumento Octet. El instrumento Octet es capaz de hibridar pocillos individuales en un formato de 96 pocillos, aunque se requieren dos columnas para los estándares y controles de la placa; por lo tanto, fue posible medir un máximo de 80 muestras por ciclo del instrumento Octet. Los estándares se prepararon entre 100-5 mg/l, los controles interplaca se diluyeron a 25 mg/l, y el sobrenadante recolectado de cada repositorio se diluyó en CD CHO para ajustarse a la curva estándar producida.

Las muestras requieren una concentración mínima para que los sensores Octet cuantifiquen el producto unido a los biosensores de proteína A. El número de cultivos cuantificables varió entre cada condición; en la Tabla 10 se enumera el número total de cultivos cuantificados. Estos datos muestran un cambio en los cultivos cuantificables totales en algunas condiciones del gen LMM en las condiciones de la proteína recombinante; es decir, el SV40 SREB411 mostró una disminución en los cultivos cuantificables en todas las condiciones de la proteína recombinante; era, como muestra la condición SV40 SREBF1, un número igual o mejorado de cultivo cuantificable.

Tabla 11. Productividad media (mg/l), desviación estándar de la productividad media y número de cultivos cuantificado (n) usando Octet y biosensores de proteína A para cada condición de promotor + gen LMM + molécula recombinante (cB72.3; Infl: infliximab; Cerg: cergutuzumab; Etan: etanercept)

Promotor + LMM	Productividad media (mg/l)				Desviación estándar				n			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SCD1	753	304	1020	515	611	376	831	273	75	45	63	75
SV40 SREBF1	1399	438	1070	660	829	456	635	281	79	60	52	77
SV40 SREB411	n/d	548	1460	443	n/d	490	933	277	n/d	14	29	54
mCMV SCD1	808	277	1028	464	710	278	750	246	64	33	35	68
mCMV SREBF1	n/d	n/d	n/d	644	n/d	n/d	n/d	278	n/d	n/d	n/d	48
PKG SCD1	1175	230	1238	n/d	731	198	926	n/d	77	45	59	n/d
PKG SREBF1	1743	475	1181	787	834	453	818	259	79	50	56	80
PKG SREB411	843	254	1077	418	718	174	1057	234	69	31	58	71
Vector vacío	845	345	890	663	653	434	665	255	78	44	43	78

Como se usaron repositorios de células transfectadas, cabría esperar que hubiera una diferencia en el número de copias de cada vector transfectado y la productividad inherente por célula en cada repositorio. Se produjeron un máximo de 80 sondeos de células por condición para mitigar esta variabilidad y brindar una imagen más precisa del crecimiento celular y la productividad en cada condición. El número de repeticiones cuantificables varió entre 14 y 80 repositorios.

Cálculo de productividad específica

Una vez que se recopilaron todos los datos de proteína A y de crecimiento, fue posible calcular la productividad específica para cada cultivo. Esto se hizo calculando pictogramas por célula por hora (Qp) y la integral de tiempo de la concentración de células viables en un cultivo por hora por mililitro (IVC), que se calculó resolviendo el área bajo la curva de crecimiento para cada uno de los cultivos. Estos datos pueden luego expresarse en un gráfico de burbujas de Qp en función de la IVC, mostrando cada burbuja (punto de datos) el título del producto por el diámetro de la burbuja. Los gráficos resultantes se pueden ver en las Figuras 16A-16D.

El intervalo de confianza del 95% para los datos de productividad media mostrados en la Tabla 11 se analizó para la media de cada RPLC (condición de proteína recombinante + promotor + LMM); estos datos se muestran en la Tabla 12 y los intervalos resultantes se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12. Análisis estadístico de datos de productividad medidos usando biosensores de proteína A para dar un intervalo de confianza del 95% en torno a la productividad media

Promotor + LMM	t(n-1)				t.estad (p=0,95)				X (t.estad*s)/√t(n-1)			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SCD1	74	44	62	74	1,666	1,68	1,67	1,666	118,224	95,2266	176,269	52,822

Promotor + LMM	t(n-1)				t.estad (p=0,95)				X (t.estad*s)/√t(n-1)			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SREBF1	78	59	51	76	1,665	1,671	1,675	1,665	156,266	99,2402	149,005	53,586
SV40 SREB411	n/d	13	28	53	n/d	1,771	1,701	1,674	n/d	240,777	299,881	63,637
mCMV SCD1	63	32	34	67	1,669	1,694	1,691	1,668	143,319	83,2512	217,483	50,101
mCMV SREBF1	n/d	n/d	n/d	47	n/d	n/d	n/d	1,678	n/d	n/d	n/d	67,941
PKG SCD1	76	44	58	n/d	1,665	1,68	1,672	n/d	139,631	50,0515	203,198	n/d
PKG SREBF1	78	49	55	79	1,665	1,677	1,673	1,664	157,159	108,584	184,573	48,569
PKG SREB411	68	30	57	70	1,668	1,697	1,672	1,667	145,284	54,0411	234,012	46,613
Vector vacío	77	43	42	77	1,665	1,681	1,682	1,665	123,916	111,331	172,553	48,419

Tabla 13. Valores finales calculados para el intervalo de confianza del 95% para la productividad media de cada una de las condiciones de proteína recombinante+promotor+LMM

Promotor + LMM	Superior				Medio				Inferior			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SCD1	871	399	1196	568	753	304	1020	515	635	209	844	462
SV40 SREBF1	1555	537	1219	714	1399	438	1070	660	1243	339	921	606
SV40 SREB411	n/d	789	1760	507	n/d	548	1460	443	n/d	307	1160	379
mCMV SCD1	957	360	1245	514	808	277	1028	464	659	194	811	414
mCMV SREBF1	n/d	n/d	n/d	712	n/d	n/d	n/d	644	n/d	n/d	n/d	576
PKG SCD1	1315	280	1441	n/d	1175	230	1238	n/d	1035	180	1035	n/d
PKG SREBF1	1900	584	1366	836	1743	475	1181	787	1586	366	996	738
PKG SREB411	988	308	1311	465	843	254	1077	418	698	200	843	371
Vector vacío	969	456	1063	711	845	345	890	663	721	234	717	615

5 Los datos mostrados en la Tabla 13 se representaron luego gráficamente para cada transfección de proteína recombinante, como se muestra en las Figuras 17A-17D.

Exposición

10 Considerando tanto los gráficos de productividad específica como los gráficos de intervalo de confianza del 95% (CIP, por sus siglas en inglés), fue posible identificar combinaciones de promotor + LMM que muestran una mejora en la expresión de las proteínas recombinantes en estas condiciones.

Etanercept

Estos datos mostraron que, en promedio, la condición de PGK + SREBF1 aumenta el título de Etanercept. Esto se observó en un promedio de 80 repositorios de células transfectadas.

Cergutuzumab

15 La condición SV40 + SREB411 mostró un aumento en el título en el CIP del 95%.

Infliximab

El número de cultivos medibles para infliximab fue generalmente menor en comparación con las condiciones de Etanercept y cB72.3.

20 El PGK/SV40 + SREBF1 mostró un aumento en el título de Infliximab. En el gráfico de burbujas de Infliximab, la mayoría de los puntos de datos por encima de $Q_p = 1$ parecían ser de esas condiciones. La condición PGK + SREBF1 tuvo una IVC más baja que la condición SV40 + SREBF1, aunque la condición PGK + SREBF1 tuvo un título promedio mayor, lo que también se puede ver por el número comparado de puntos de datos por encima de $Q_p = 1$. Estas dos condiciones también mostraron un aumento en el número de repeticiones medibles, lo que sugiere que la expresión de SREBF1 a estos niveles aumenta la capacidad de supervivencia celular cuando se expresa Infliximab.

cB72.3

La proteína recombinante cB72.3 es un anticuerpo monoclonal estándar y fue más fácil de expresar para las células en comparación con las otras proteínas recombinantes presentadas en este documento.

30 El CIP del 95% sugirió que el aumento de la expresión de SERBF1 puede aumentar el título final en estas condiciones. Las condiciones de SV40/PGK + SREBF1 mostraron ambas un aumento significativo en el título. La

condición de PGK + SCD1 también mostró un aumento en el título. En el gráfico de burbujas de cB72.3, los datos de SV40 + SREBF1 tendieron hacia una Qp más alta y una IVC más baja, mientras que para la condición PGK + SREBF1 sucedió lo contrario. Las condiciones de SCD1 parecían agruparse entre Qp = 0,5-3 e IVC = 500-1250. La condición de control tendió hacia una Qp más baja con una IVC más alta.

5 **Selección de combinación de promotor y LMM**

Las combinaciones de SV40/PGK + SREBF1 han mostrado una mejora en el título del producto y en Qp o IVC de los cultivos en los que se transfectaron. Las diferencias entre las secuencias de CHO y de ratón para SCD1 se pueden explorar idealmente con promotores fuertes, tales como hCMV o mCMV. Se contempla que estas combinaciones de promotores mejorarán el título del producto.

10 **Ejemplo 3: Aplicación del sistema de selección metabólica de prolina pirrolina-5-carboxilato sintasa para la generación de repositorios de células CHO GS-KO modificadas por ingeniería genética con LMM de forma estable**

Mediante los ejemplos anteriores, se ha demostrado que la manipulación de modificadores del metabolismo de lípidos (LMM) estearoil-CoA desaturasa-1 (SCD1), el factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador de esterol (SREBF1) y una isoforma SREBF1 truncada, SREB411, que comprende la porción de SREBF1 que migra al núcleo y carece de dominios reguladores SREBF1, mejora la producción del anfitrión CHOK1SV GS-KO y la calidad del producto de proteínas complejas y de los mAb estándar. Por tanto, la selección metabólica de prolina de P5CS se utilizó para generar repositorios de células GS-KO CHO modificadas con LMM de expresión estable que sobreexpresaban SCD1 o SREBF1 bajo el control de diferentes promotores.

20 La anfitriona GS-KO CHO se transfectó, por electroporación, con PGK SCD1 (CHO) o PGK SREBF1, utilizando el sistema de selección P5CS o PGK SCD1 (ratón) o SV40 SREBF1 en medio patentado de Lonza, químicamente definido, libre de proteínas, sin prolina. A continuación, las células transfectadas se sembraron en tres placas de 96 pocillos (100 µl de cultivo por pocillo) y se incubaron a 36,5°C, 10% de CO₂. El día 7 después de la transfección, se retiraron 150 µl por pocillo/cultivo de cada placa de cultivos transfectados y se añadió medio nuevo sin prolina a cada pocillo/cultivo. A continuación, se controló el crecimiento y la recuperación después de la transfección de los cultivos. Se observó recuperación celular después de la transfección desde aproximadamente 14 días después de la transfección. Una vez que se consideró que >75% de los cultivos eran >75-80% confluentes, se consideró que los cultivos de la placa se recuperaron y se transfirieron a placas de pocillos profundos.

30 Después del subcultivo en placas de 96 pocillos profundos, se recolectaron muestras de sedimentos celulares y se generaron lisados de proteínas y se analizaron mediante transferencia Western para la expresión del LMM diana (SCD1 o SREBF1), con la expresión de P5CS y la β-actina actuando como controles. A partir del análisis resultante, las cantidades de expresión de los repositorios de células de cada pocillo se clasificaron como “altas”, “medias” o “bajas” del LMM diana con respecto a otros y con respecto al control. Los 10 pocillos de células de expresión “más alta” se combinaron luego para generar un repositorio de células de expresión “alta”; los 10-15 pocillos distribuidos en las expresadoras “medias” agrupados para generar un repositorio de LMM de expresión “media”; y los 10-15 pocillos distribuidos en las expresadoras “bajas” se combinaron para generar un repositorio de LMM de expresión “baja”. En el caso de los repositorios medio y bajo, se tomaron pocillos de cada una de las tres placas. Estos repositorios de células modificadas por ingeniería genética con LMM se expandieron luego en matraces de agitación y se cultivaron en medio patentado de Lonza sin prolina. A continuación, se recogieron los lisados celulares para evaluar la expresión de LMM y P5CS en los repositorios de células modificadas genéticamente.

45 La Figura 18 muestra el análisis de transferencia Western de los repositorios de células generados, que confirma una expresión de P5CS nula o muy baja en la línea celular GS-KO CHO de control del anfitrión y cantidades similares de expresión de P5CS en los diferentes repositorios de LMM. Esto confirma que el sistema de selección de P5CS da como resultado el aislamiento de células que expresan la enzima P5CS. Se utilizó tubulina como control de carga. Se demostró que las cantidades de SCD1 estaban elevadas en los repositorios de PGK SCD1 CHO medios y altos en comparación con los repositorios bajos, mientras que la molécula precursora de SREBF1 diseñada en las células estaba elevada en los repositorios de PGK SREBF1 medios y altos en comparación con los repositorios bajos, como se muestra en la Figura 18. Se hizo una observación similar para el PGK SCD1 murino y las células SV40 SREBF1 modificadas por ingeniería genética. Por tanto, la Figura 18 muestra que el sistema de selección metabólica de prolina basado en P5CS acoplado a la expresión de LMM dio como resultado el aislamiento con éxito de células que expresan P5CS con cantidades aumentadas de LMM creciendo en un medio que carecía de prolina.

55 Los diferentes repositorios que expresan LMM se transfectaron luego con un vector para un compuesto bioterapéutico recombinante (Etanercept o Infliximab) y GS, se transfectaron como se describe en el Ejemplo 2 anterior y luego se recuperaron en medio libre de prolina y glutamina en placas de 96 pocillos. Se observó recuperación celular después de la transfección desde aproximadamente 14 días después de la transfección. Una vez que se consideró que >75% de los cultivos eran >75-80% confluentes, se consideró que los cultivos de la placa se recuperaron y se transfirieron a placas de pocillos profundos. Las células se subcultivaron posteriormente y se evaluó el título usando un instrumento Octet y luego los 10 pocillos más altos de cada repositorio transfectado modificado con LMM se combinaron y se cultivaron en matraces de agitación. A continuación, se evaluaron las

características de productividad y crecimiento de estos en un biorreactor en miniatura en condiciones de cultivo de lotes alimentados.

Las Figuras 19A-19D muestran un gráfico de Q_p en función de la concentración integral de células viables (IVC) (IVC, integral de tiempo de la concentración de células viables en un cultivo por hora por mililitro) y Q_p , productividad específica como pg/célula/h para cada repositoriomodificado por ingeniería genética con LMM, posteriormente transfectado con una molécula recombinante y evaluándose la productividad y el crecimiento en un biorreactor en miniatura ambr™ 15 en condiciones de lotes alimentados el día 9 de cultivo en cultivos duplicados.

La clave de la Figura 19A, arriba, dice (de arriba abajo) Cont. E1, Cont. E2, SV40-SBF1Hi E1, SV40-SBF1HiE2, SV40-SBF1MiE1, SV40-SBF1MiE2, SV40-SBF1LoE1, SV40-SBF1LoE2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 y 3500, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19A, abajo, dice (de arriba abajo) Cont. I1, Cont. I2, SV40-SBF1Hi I1*, SV40-SBF1HiI2, SV40-SBF1Mil1*, SV40-SBF1LoI1, SV40-SBF1LoI2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa con 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 y 0,3, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa con 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19B, arriba, dice (de arriba abajo) Cont. E1, Cont. E2, PGK-SBF1Hi E1, PGK-SBF1HiE2, PGK-SBF1MiE1**, PGK-SBF1MiE2, PGK-SBF1LoE1, PGK-SBF1LoE2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 y 0,7, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 y 3500, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19B, abajo, dice (de arriba abajo) Cont. I1, Cont. I2, PGK-SBF1Hi I2, PGK-SBF1HiI1, PGK-SBF1Mil1, PGK-SBF1LoI2, PGK-SBF1LoI1, PGK-SBF1Mil2. El eje y comienza, en la parte inferior, con -0,05 y continúa con 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 y 0,35, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa con 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19C, arriba, dice (de arriba abajo) Cont. E1, Cont. E2, PGK-MSCDHi E1, PGK-MSCDHiE2, PGK-mSCDMiE1, PGK-mSCDMiE2, PGK-mSCDLoE1, PGK-mSCDLoE2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6, y está etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 y 3500, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19C, abajo, dice (de arriba abajo) Cont. I1, Cont. I2, PGK-mSCDMi I2*, PGK-mSCDLoI2, PGK-mSCDHiI1. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa con 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 y 0,4 etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa con 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19D, arriba, dice (de arriba abajo) Cont. E1, Cont. E2, PGK-SCDHi E1, PGK-SCDHiE2, PGK-SCDMiE1, PGK-SCDMiE2, PGK-SCDLoE1, PGK-SCDLoE2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa con 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 y 0,45, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa con 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml). La clave de la Figura 19D, abajo, dice (de arriba abajo) Cont. I1, Cont. I2, PGK-SCDMi I1*, PGK-SCDMi I2, PGK-SCDHiI1, PGK-SCDHiI2, PGK-SCDLoI1, PGK-SCDLoI2. El eje y comienza, en la parte inferior, con 0 y continúa con 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 y 0,3, etiquetado como $Q_p(\text{pg/célula/h})$. El eje x comienza, a la izquierda, con 0 y continúa con 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000, etiquetado como IVC (10^6 células·h/ml).

La IVC de las células de control (círculos negros, FIG19, sin modificación por ingeniería genética con LMM) estuvo generalmente entre las más altas, pero en cada caso hubo varios repositorios LMM con Q_p más altas que el control e IVC similares al control cuando expresaban estas proteínas modélicas difíciles de expresar ("**" indica que el recipiente fue objeto de recolección el día 12 y "***" indica que fue objeto de recolección el día 14). Esto es coherente con la idea de que las células modificadas genéticamente con LMM, producidas y cultivadas mediante métodos de selección de P5CS, pueden tener una Q_p aumentada cuando se producen proteínas difíciles de expresar y una IVC comparable a las células modificadas sin LMM en condiciones similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar, seleccionar o cultivar una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico concreta, comprendiendo el método:
- a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende:
- 5 (i) la secuencia del ácido nucleico concreta; y
- (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS); y
- b) cultivar la célula que comprende la secuencia de ácido nucleico en presencia de un medio que tiene un nivel insuficiente de prolina para soportar el crecimiento de una célula que es igual que el de la célula que no tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de P5CS, en condiciones suficientes para permitir para el crecimiento de una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el medio, además, un inhibidor de la actividad de la enzima;
- 10 identificando, seleccionando o cultivando así una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico heteróloga.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el ácido nucleico heterólogo es un vector.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que el inhibidor es un análogo de prolina.
4. El método de la reivindicación 3 en el que el inhibidor es ácido L-azetidina-2-carboxílico, 3,4-deshidro-L-prolina o ácido L-4-tiazolidincarboxílico.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende seleccionar una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico heteróloga.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico heterólogo se integra en el genoma de la célula.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además seleccionar una célula que exhibe crecimiento.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la célula es una célula de mamífero.
- 25 9. El método de la reivindicación 8 en el que la célula es una célula CHO.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que se ha inactivado una copia endógena de una secuencia que codifica la enzima.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la secuencia de ácido nucleico concreta codifica una molécula polipeptídica heteróloga.
- 30 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende recuperar el producto de la célula o del medio.

FIG. 1

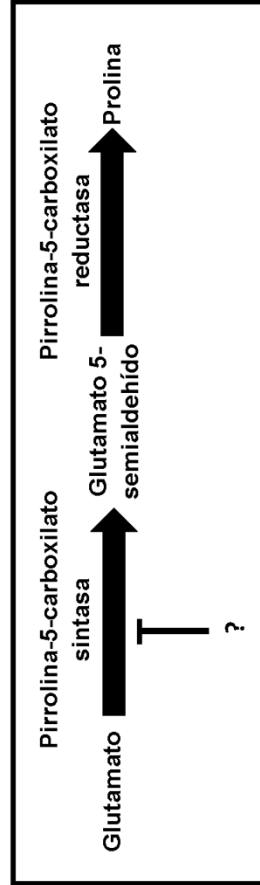


FIG. 2

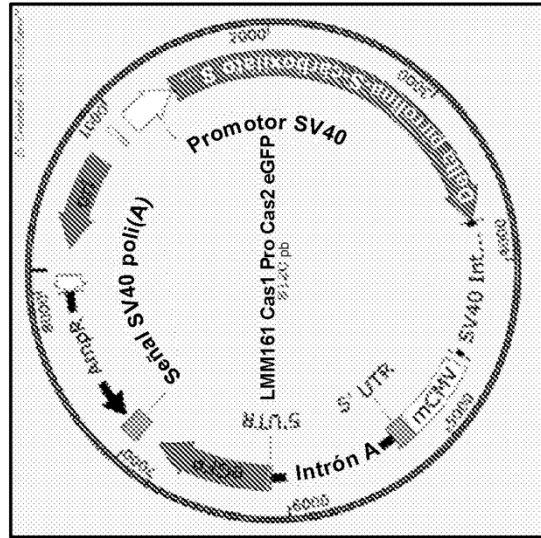


FIG. 3A

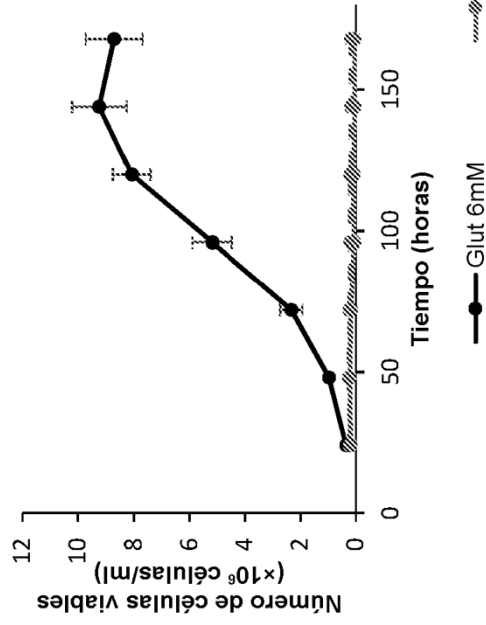


FIG. 3B

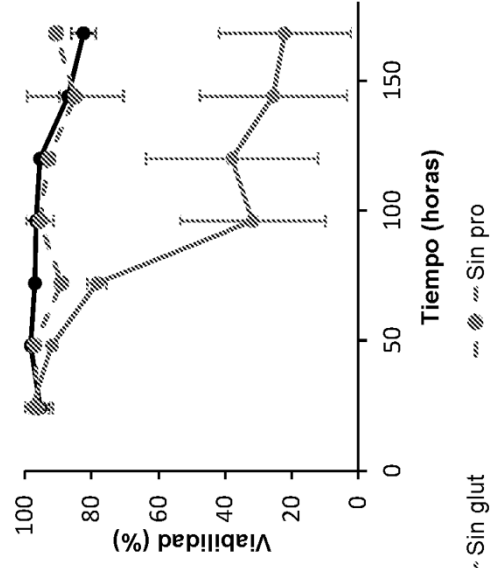


FIG. 4C

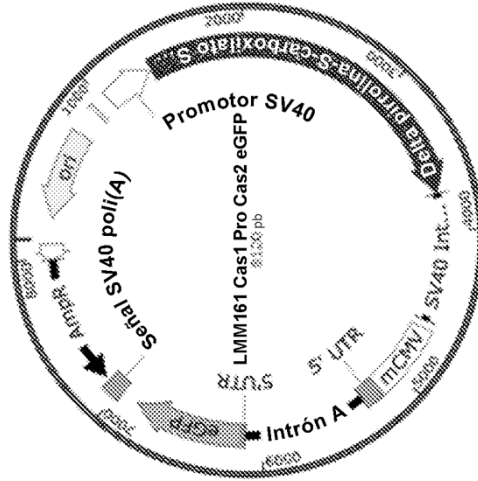


FIG. 4B

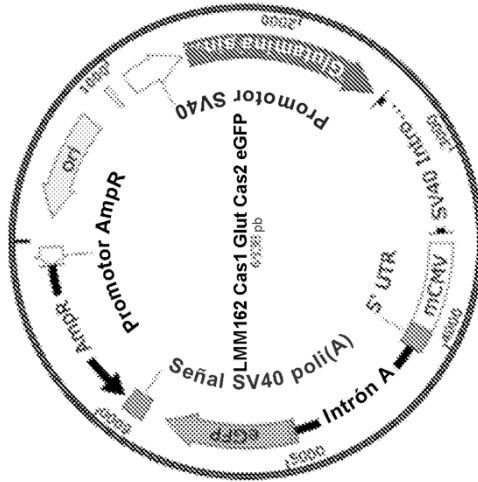


FIG. 4A

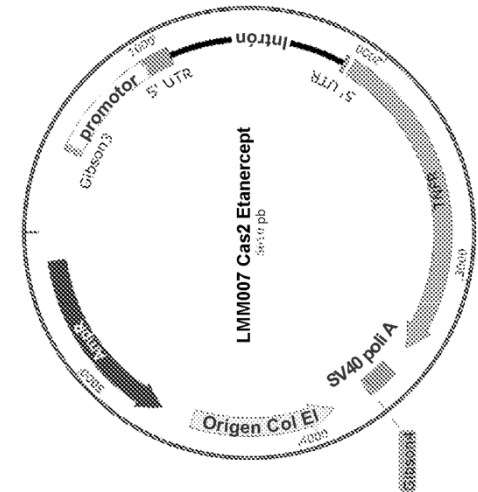
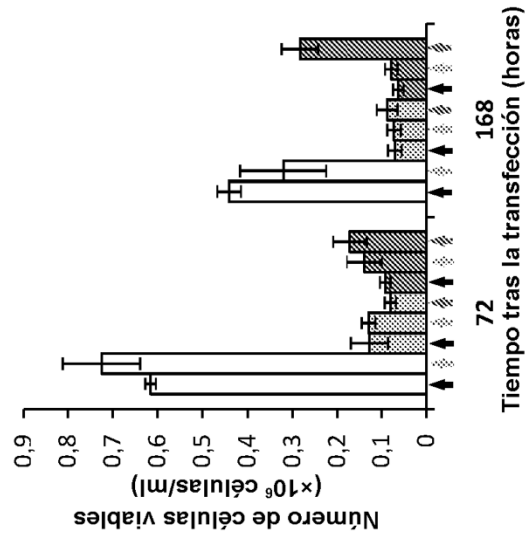
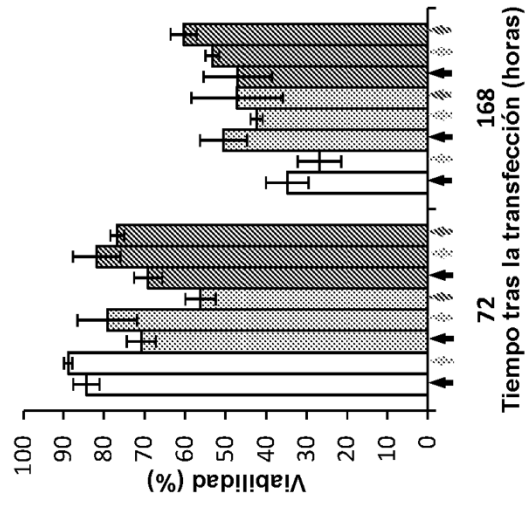


FIG. 5A



- ↑ = Control
- ◻ = eGFP/Glutamina sintetasa
- ▨ = eGFP/Pirrolina-5-carboxilato sintasa

FIG. 5B



- ◻ = CD-CHO
- ◻ = Sin tir
- ▨ = Sin pro

FIG. 5C

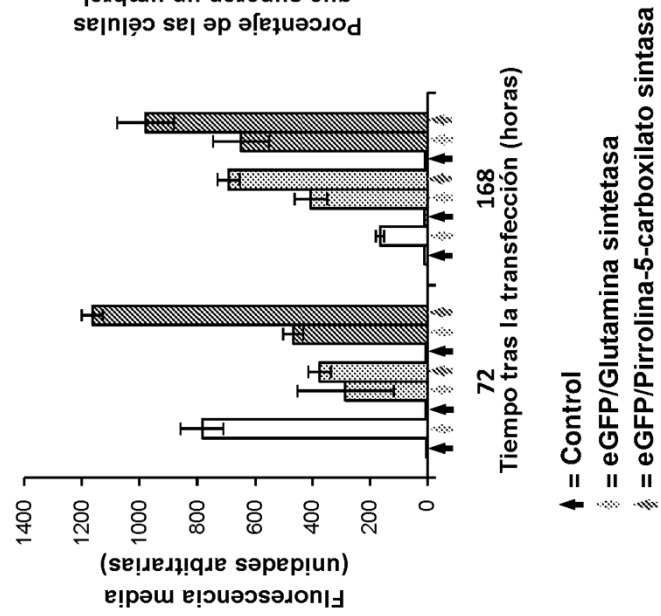


FIG. 5D

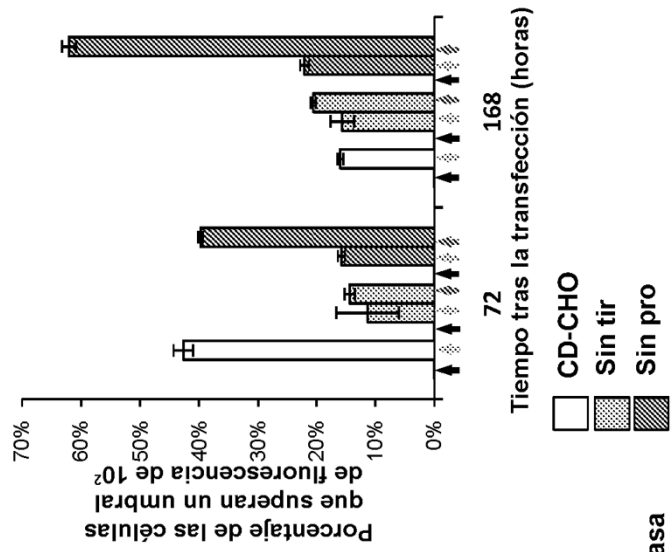


FIG. 6B

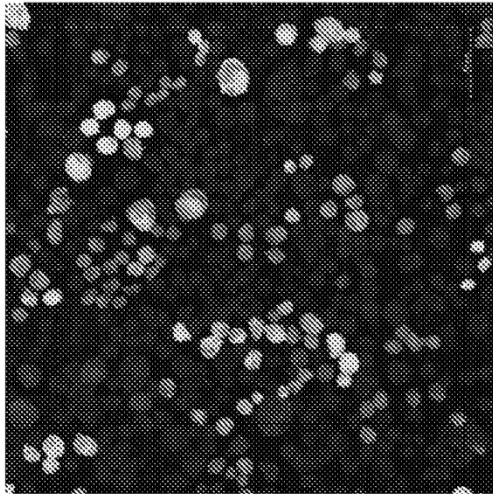


FIG. 6A

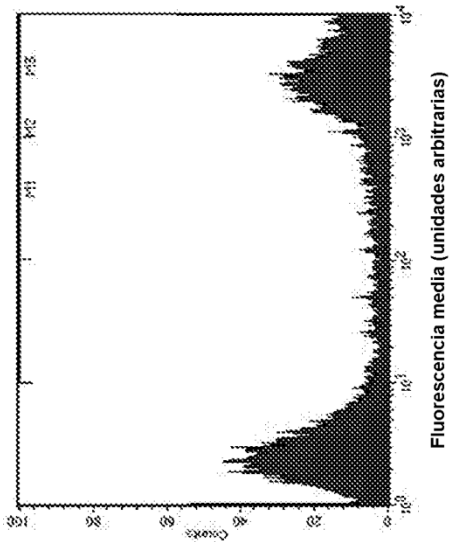
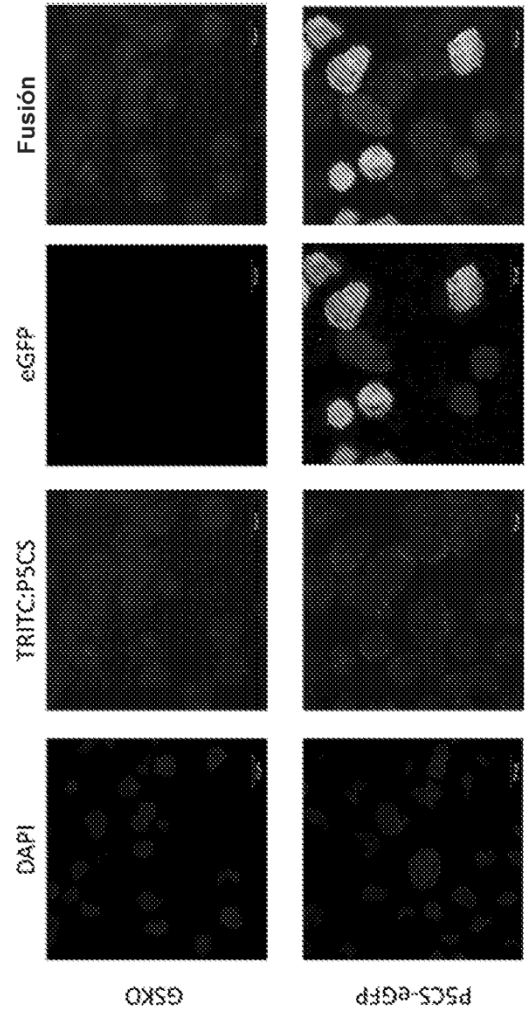


FIG. 6C



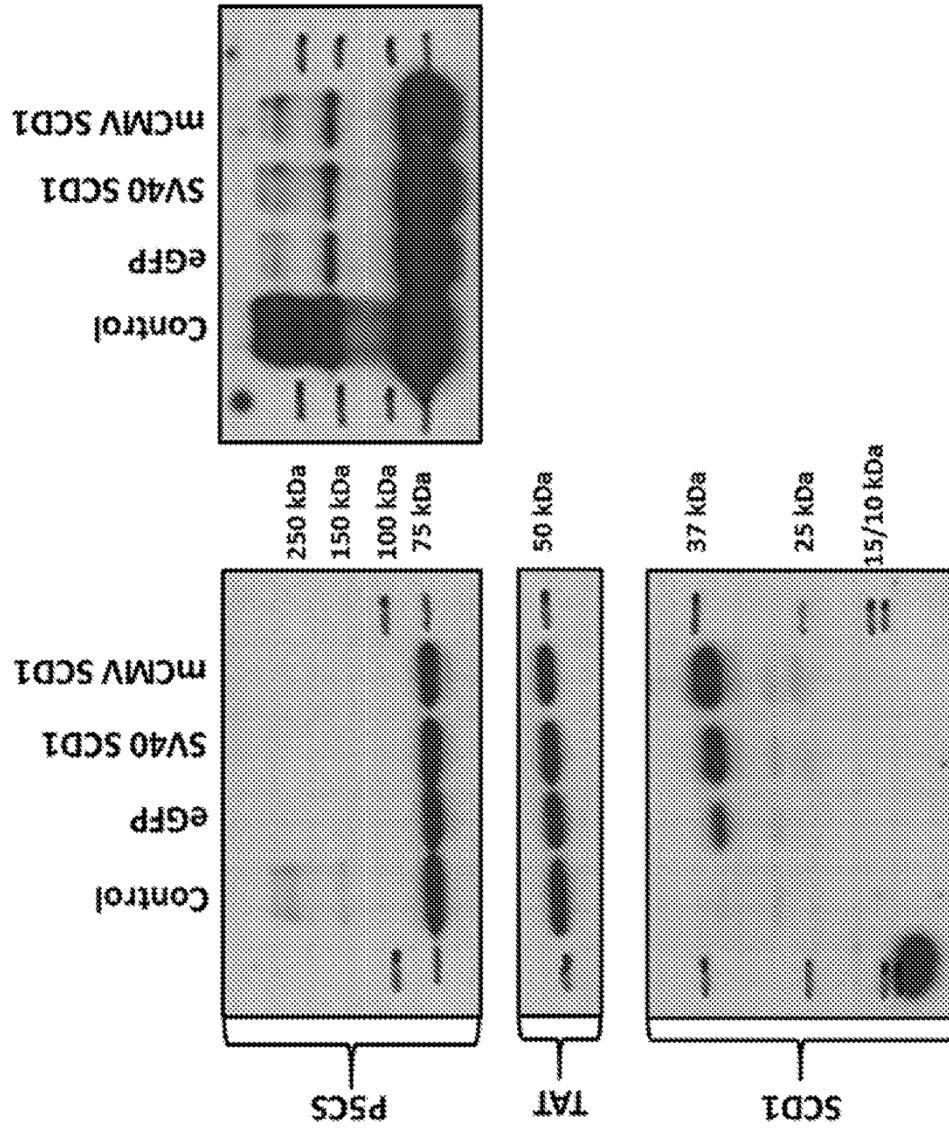


FIG. 7

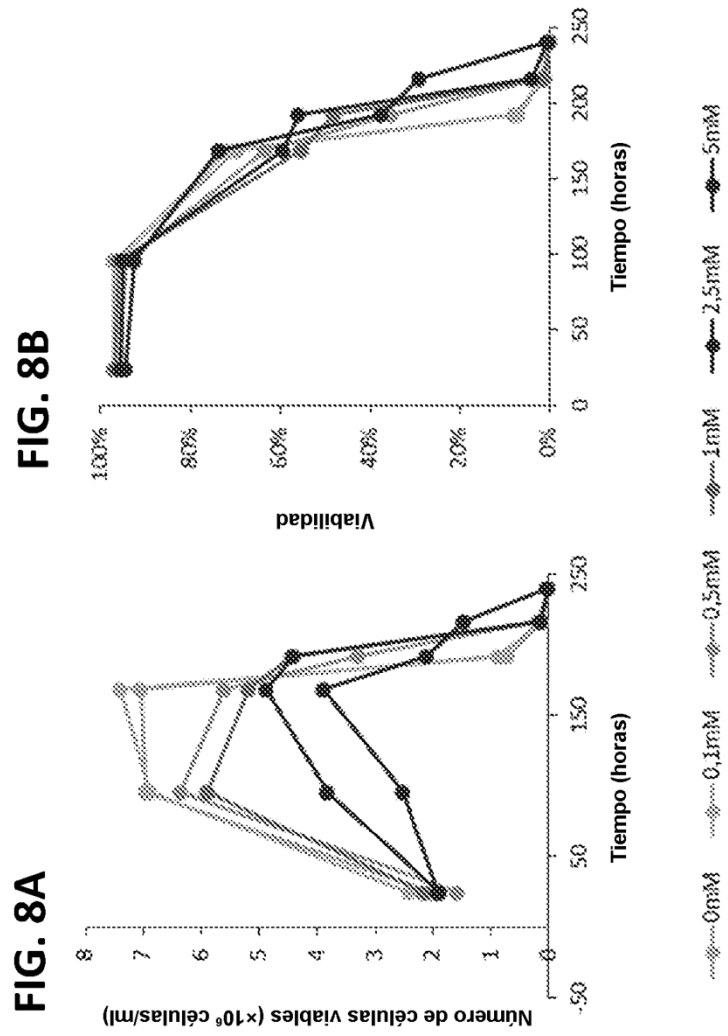


FIG. 8C

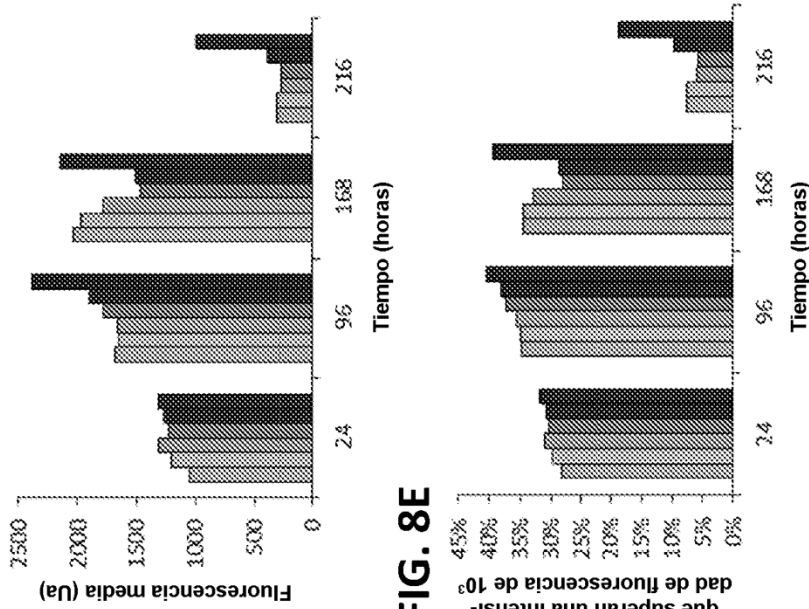


FIG. 8D

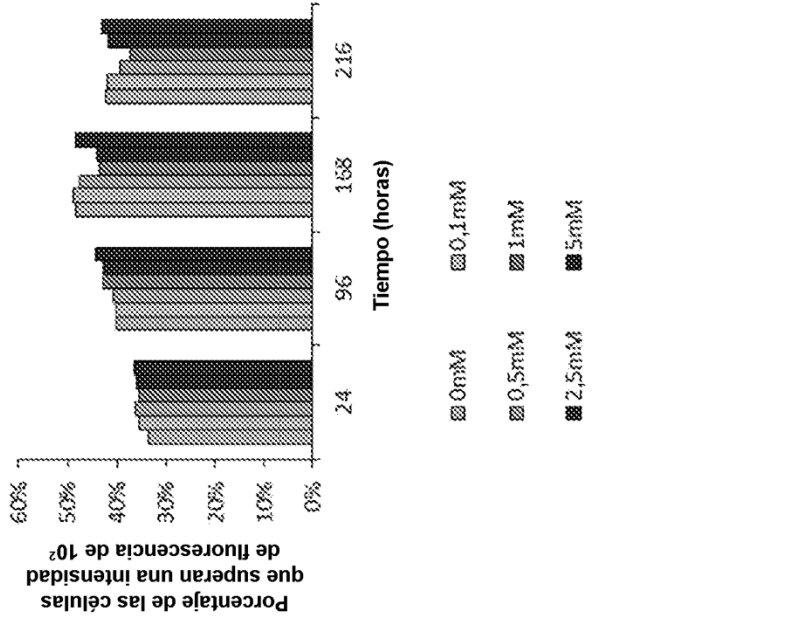


FIG. 8E

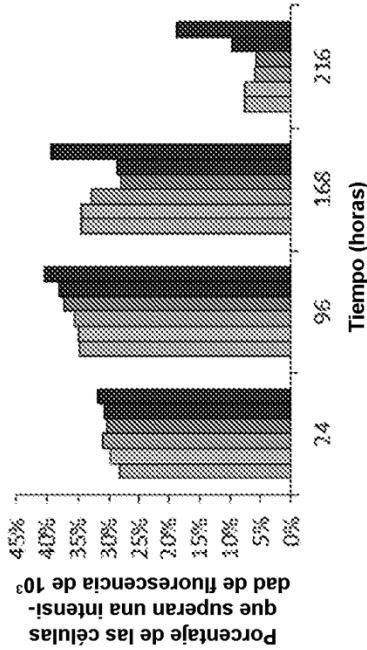


FIG. 8F

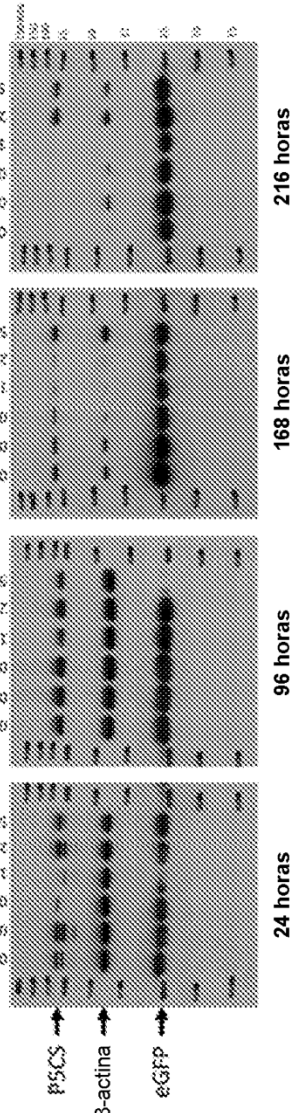


FIG. 9A

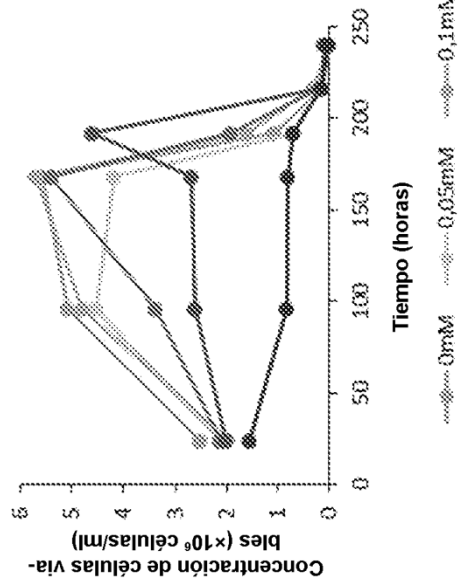


FIG. 9B

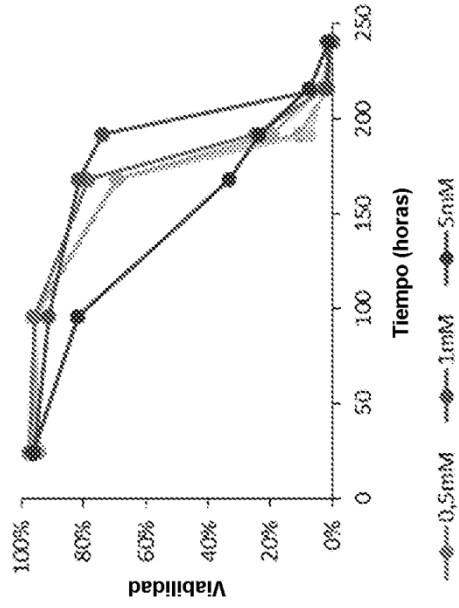


FIG. 9C

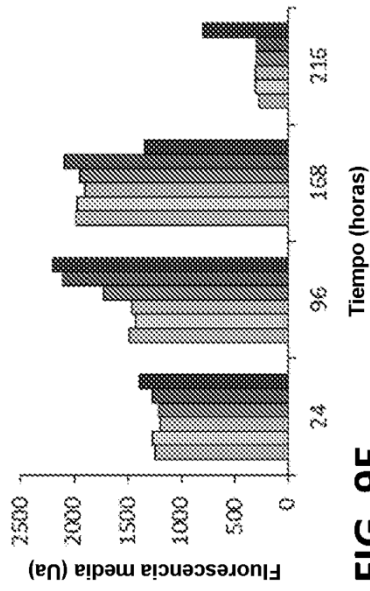


FIG. 9D

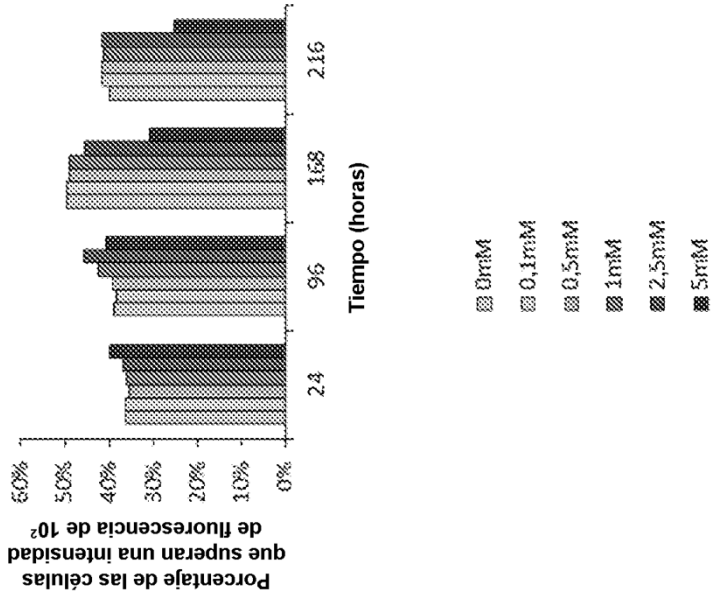


FIG. 9E

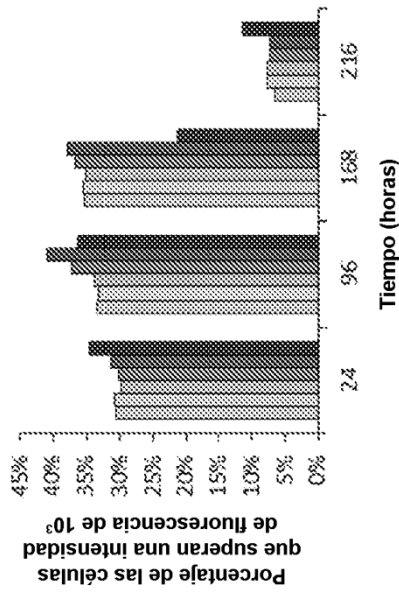


FIG. 9F

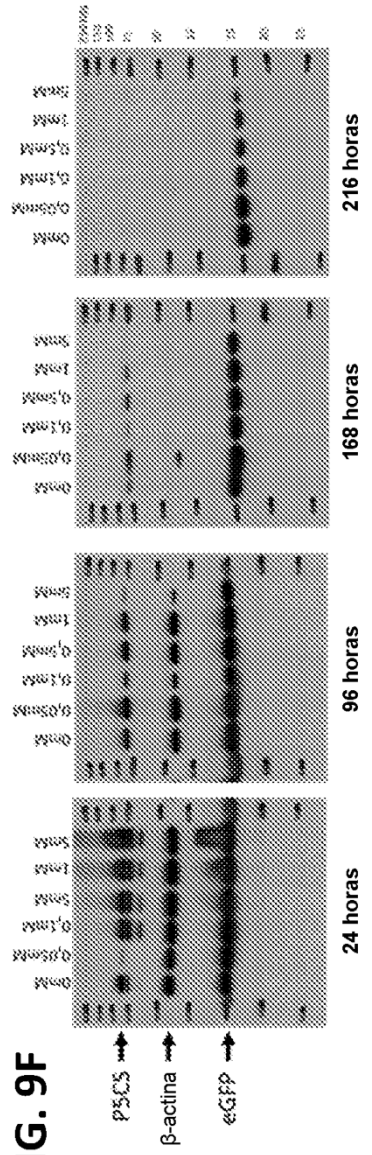


FIG. 10B

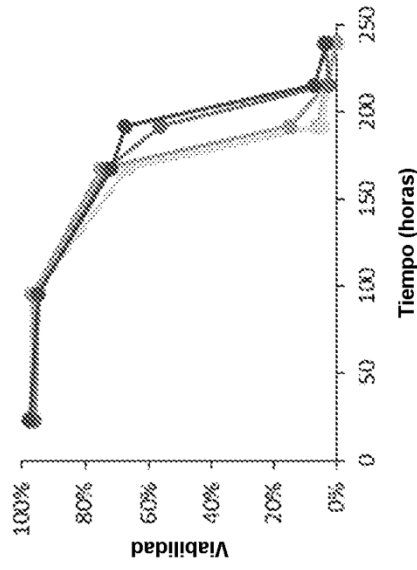


FIG. 10A

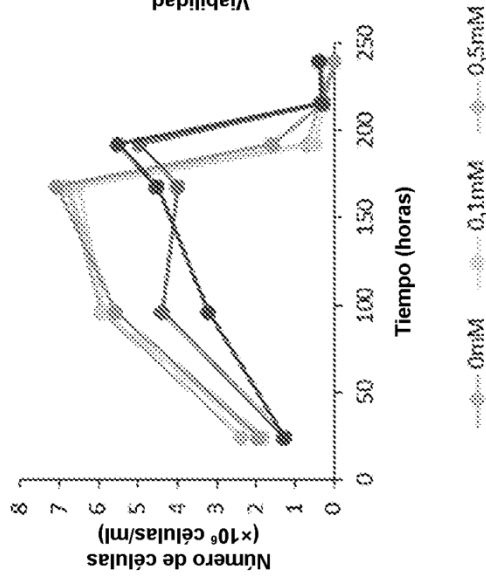


FIG. 10C

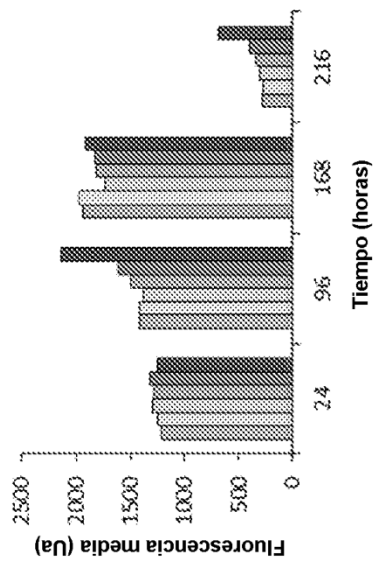


FIG. 10D

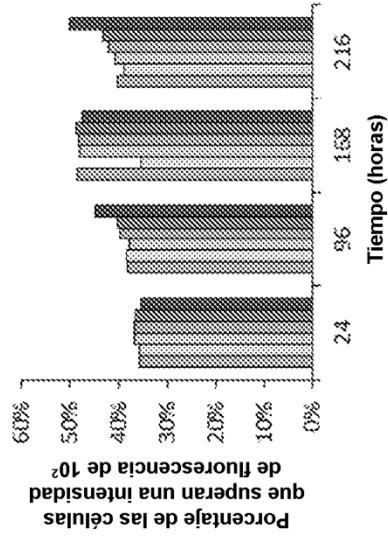


FIG. 10E

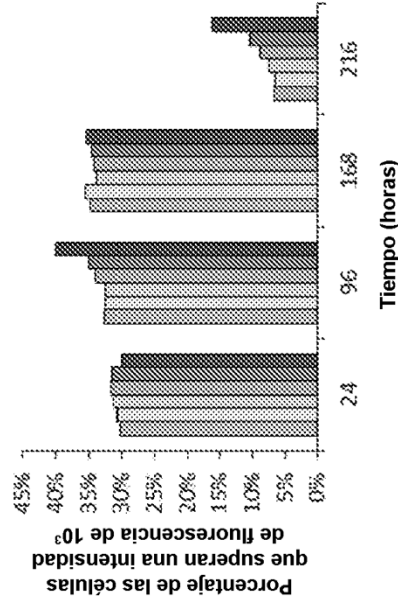


FIG. 10F

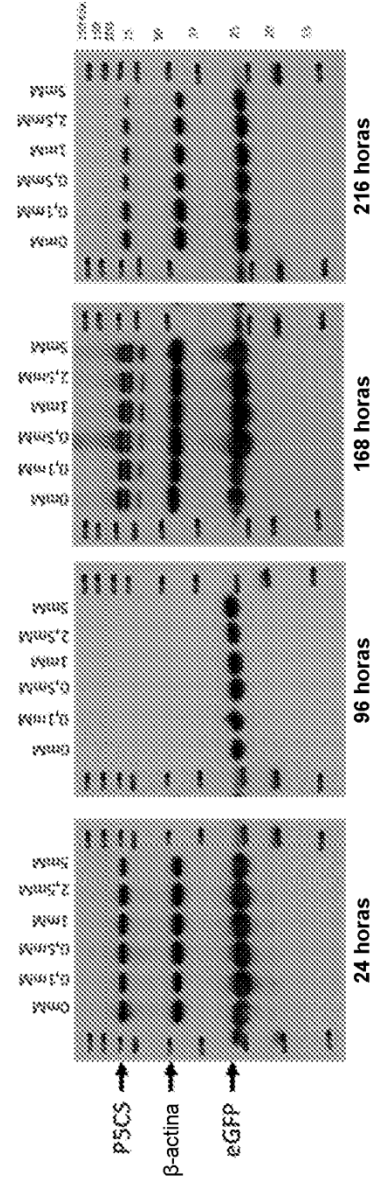


FIG. 11A

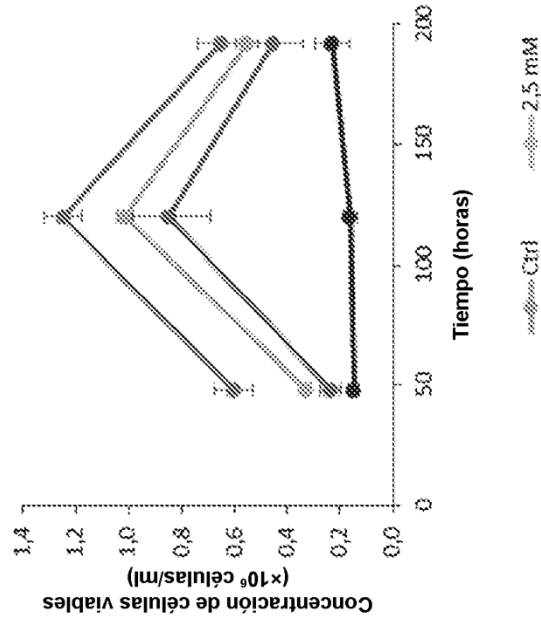


FIG. 11B

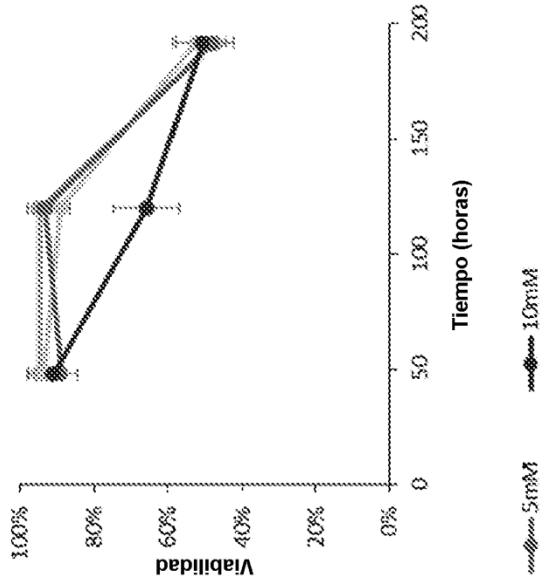


FIG. 11C

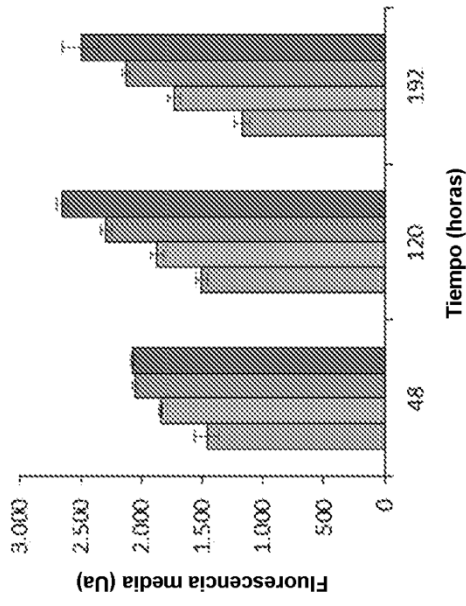


FIG. 11D

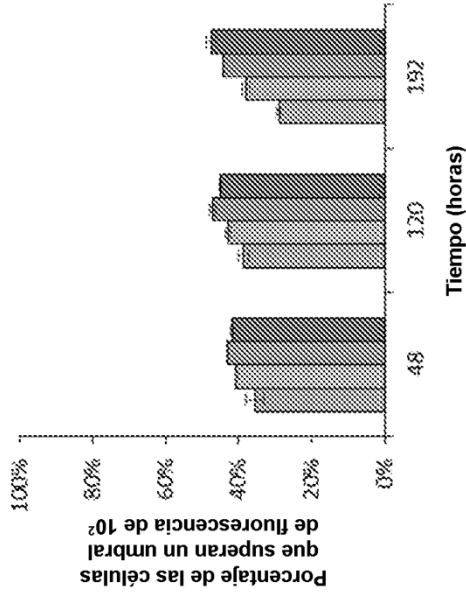


FIG. 11E

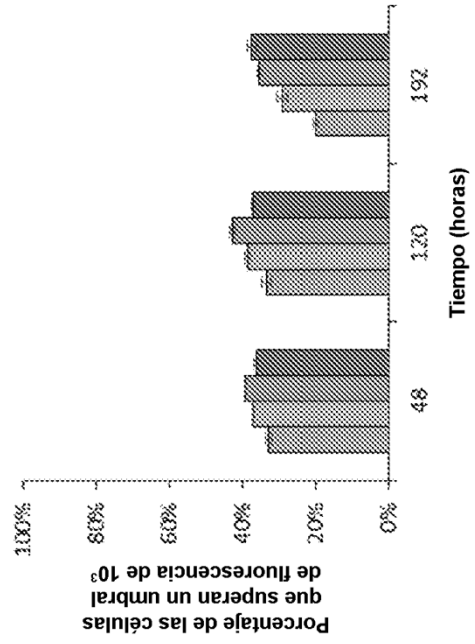


FIG. 12A

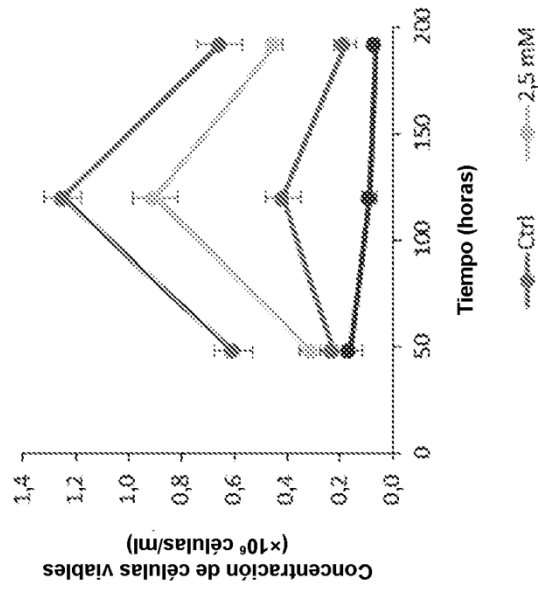


FIG. 12B

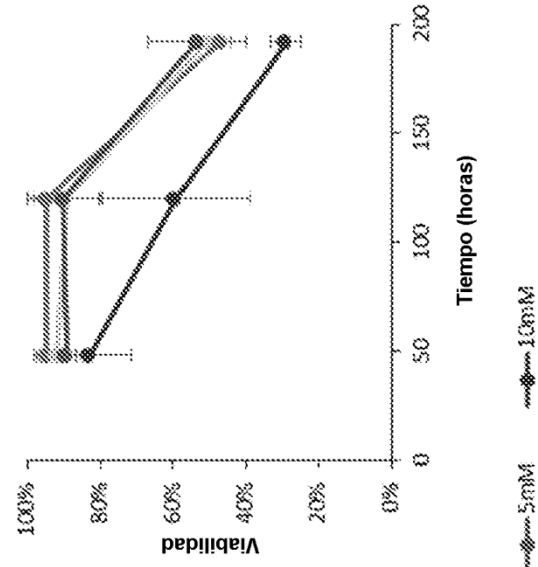


FIG. 12C

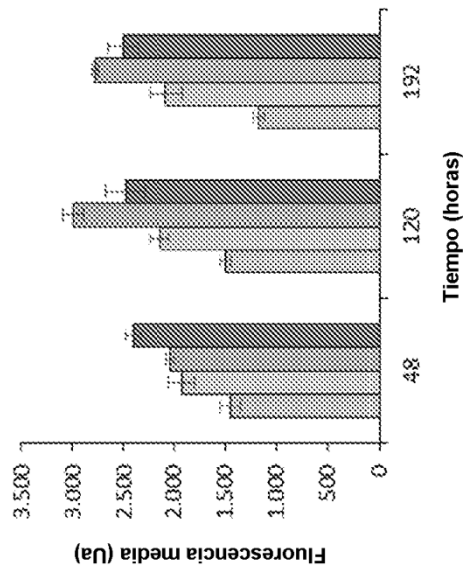


FIG. 12D

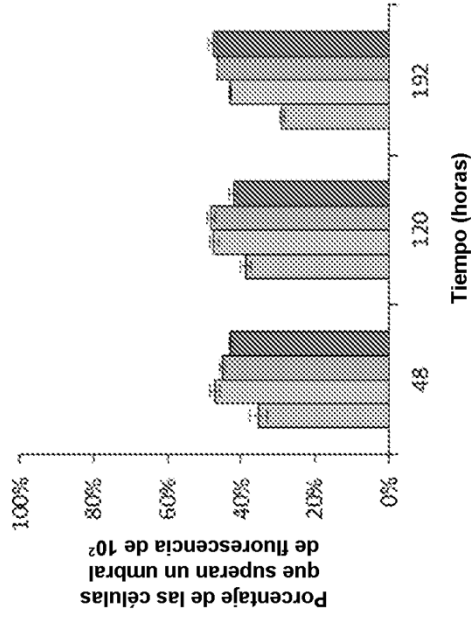


FIG. 12E

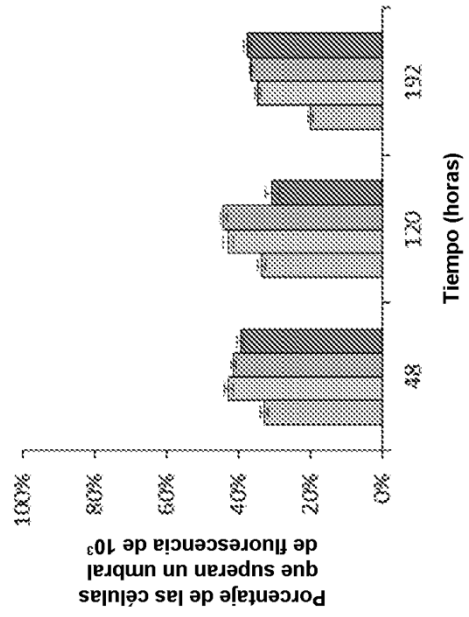
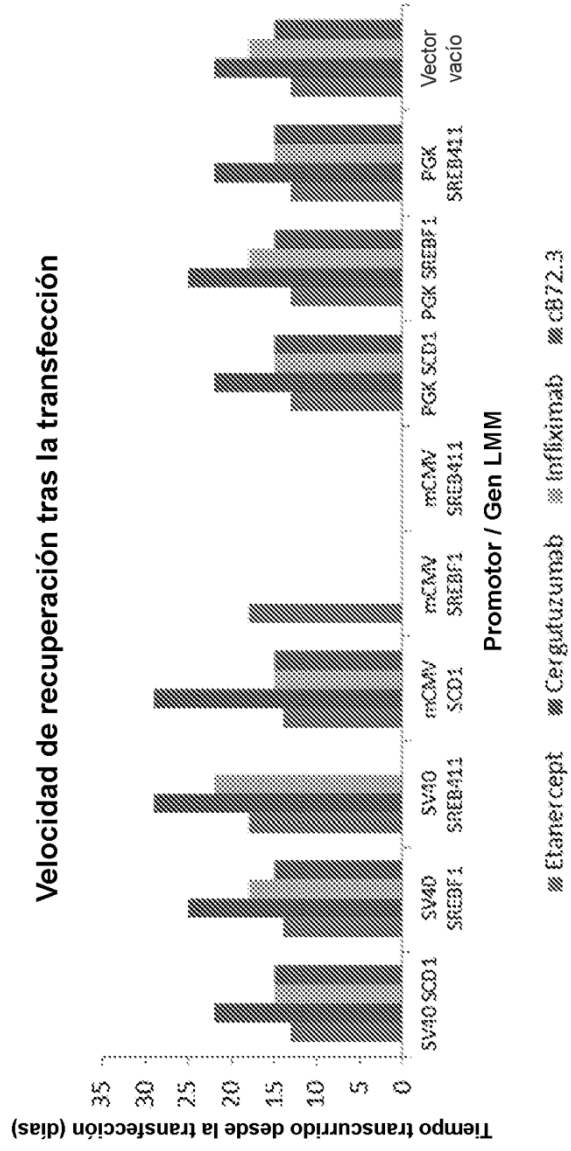


FIG. 13



Crecimiento con etanercept durante el subcultivo

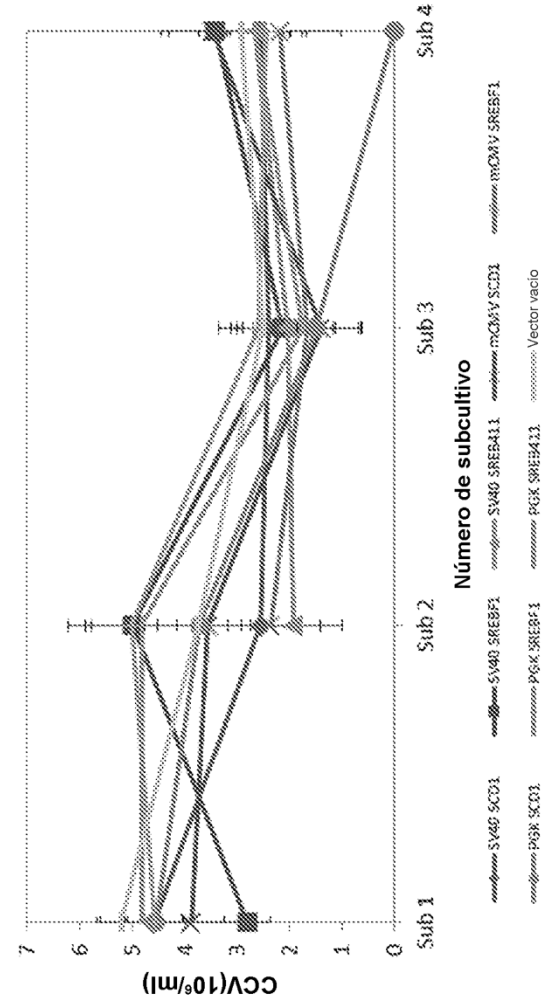


FIG. 14A

Crecimiento con certuzumab durante el subcultivo

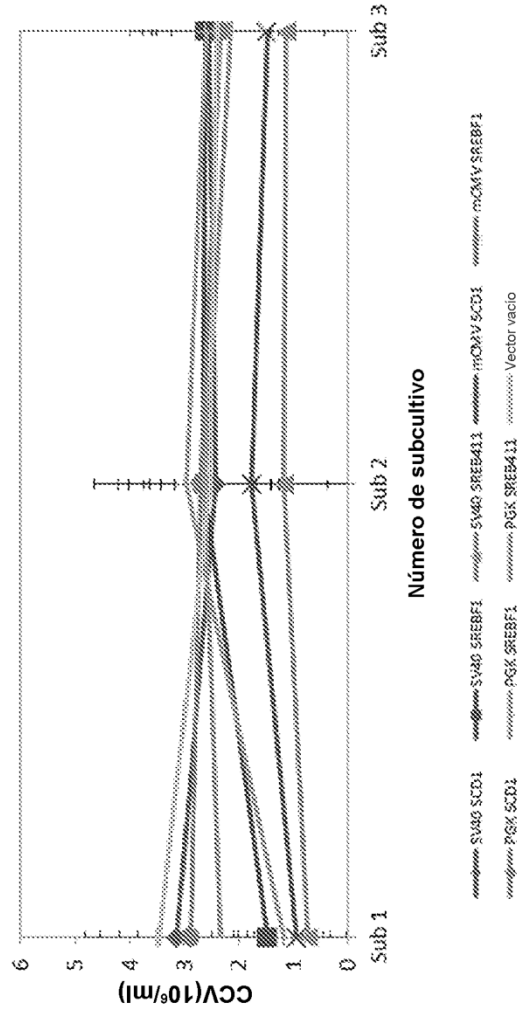
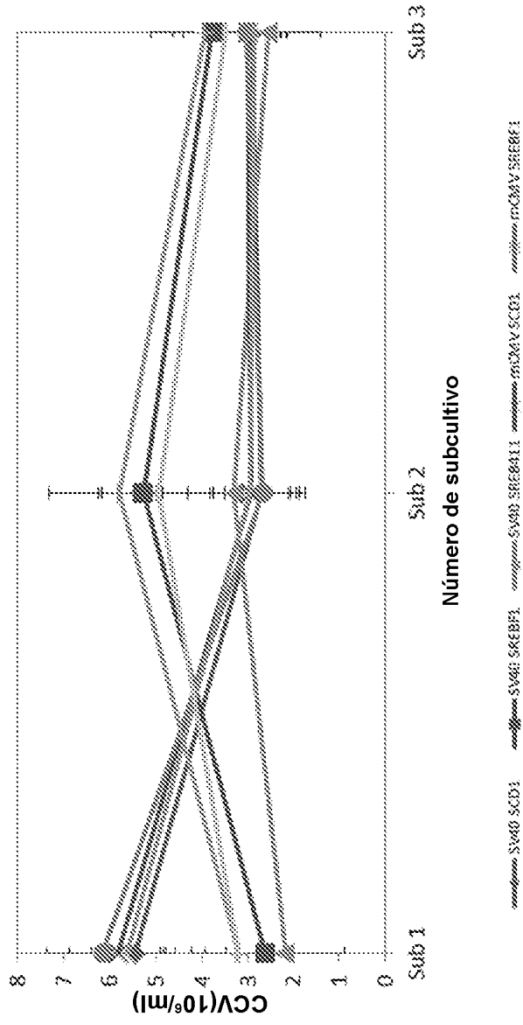


FIG. 14B

Crecimiento con infliximab durante el subcultivo

FIG. 14C



Crecimiento con cB72.3 durante el subcultivo

FIG. 14D

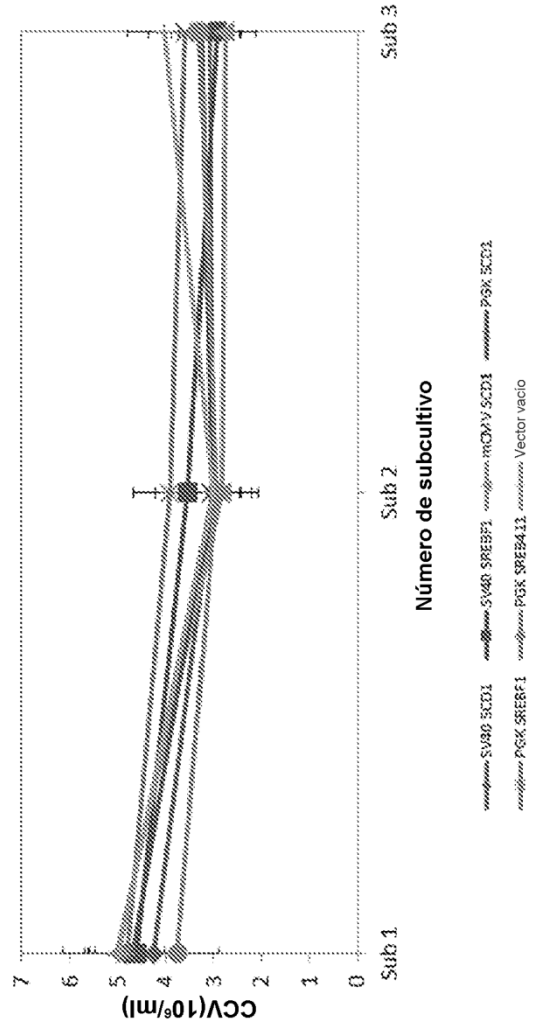


FIG. 15A

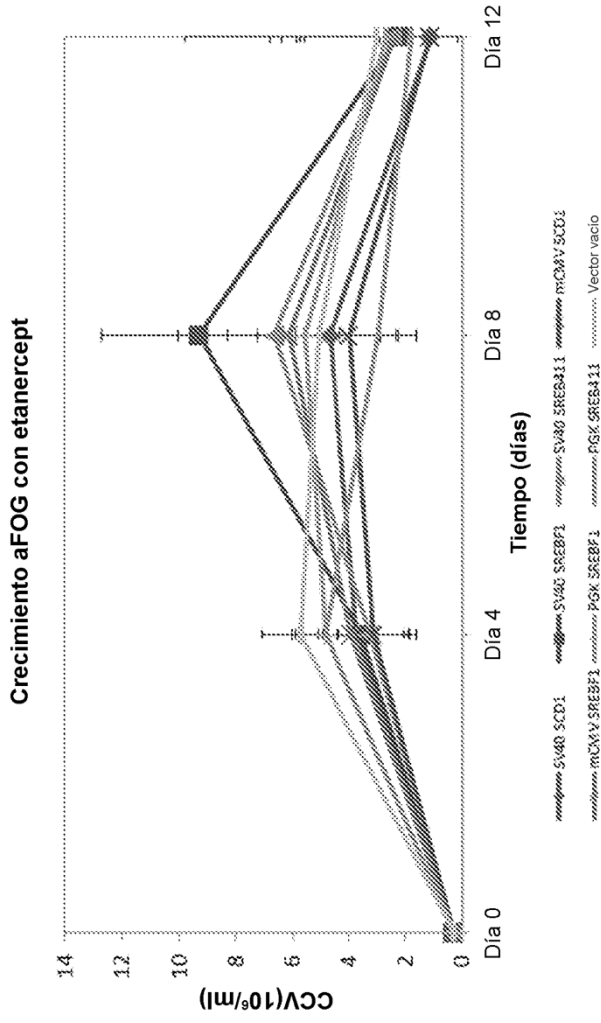


FIG. 15B

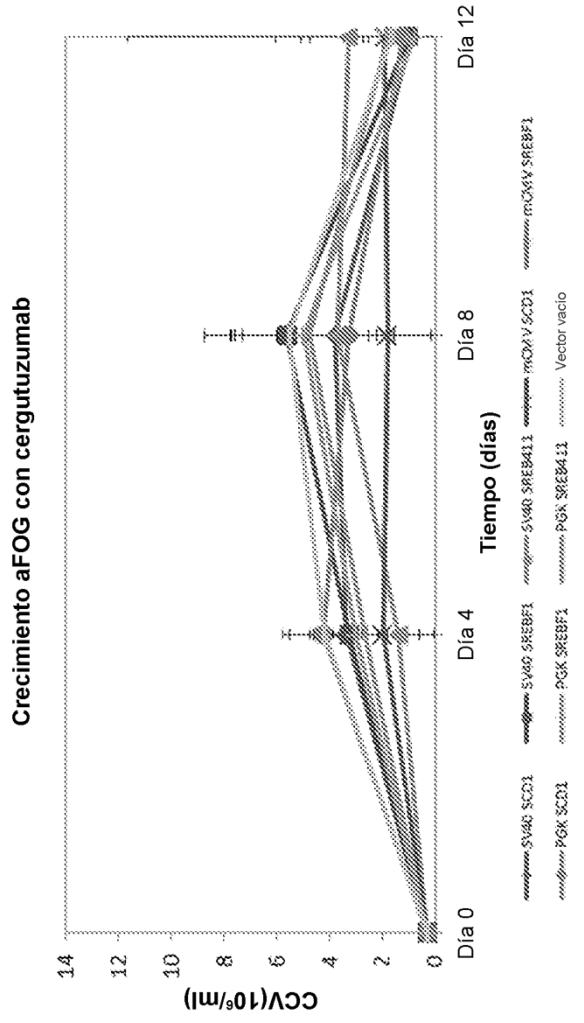


FIG. 15C

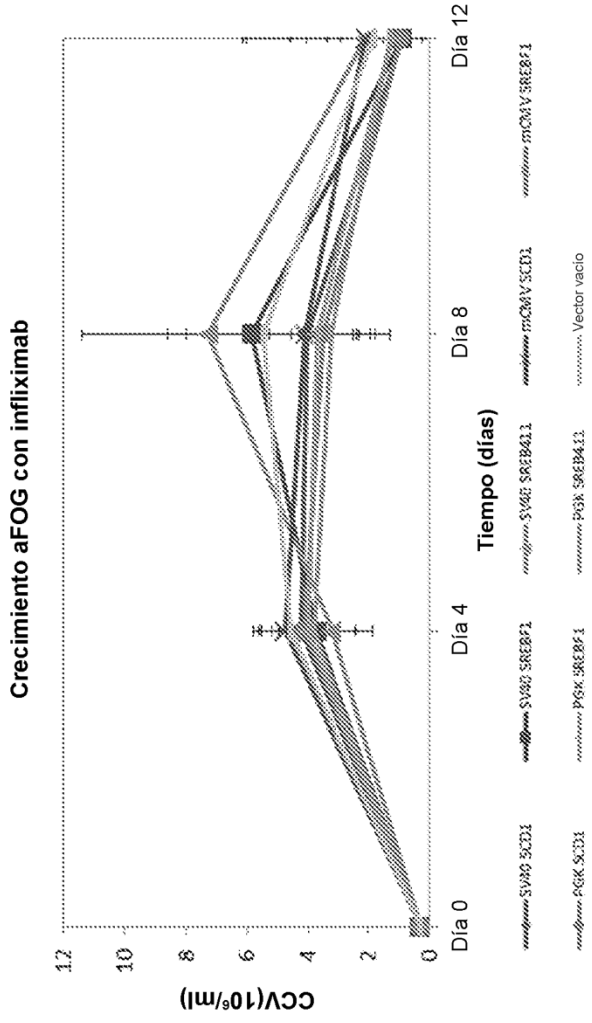


FIG. 15D

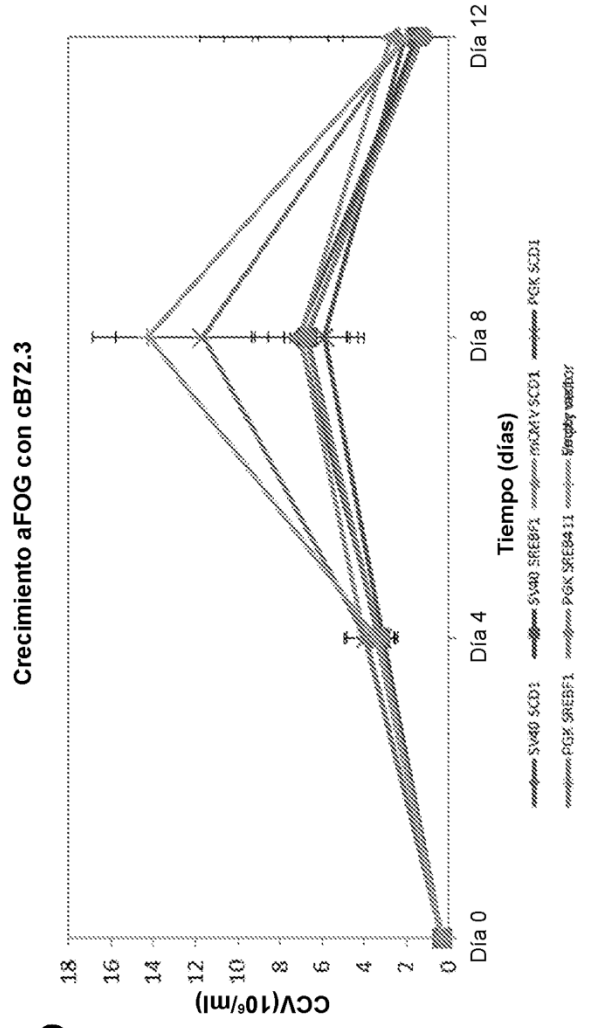


FIG. 16A
Productividad específica (Qp) del etanercept en función de la integral en el tiempo de la concentración de células viables (IVC)

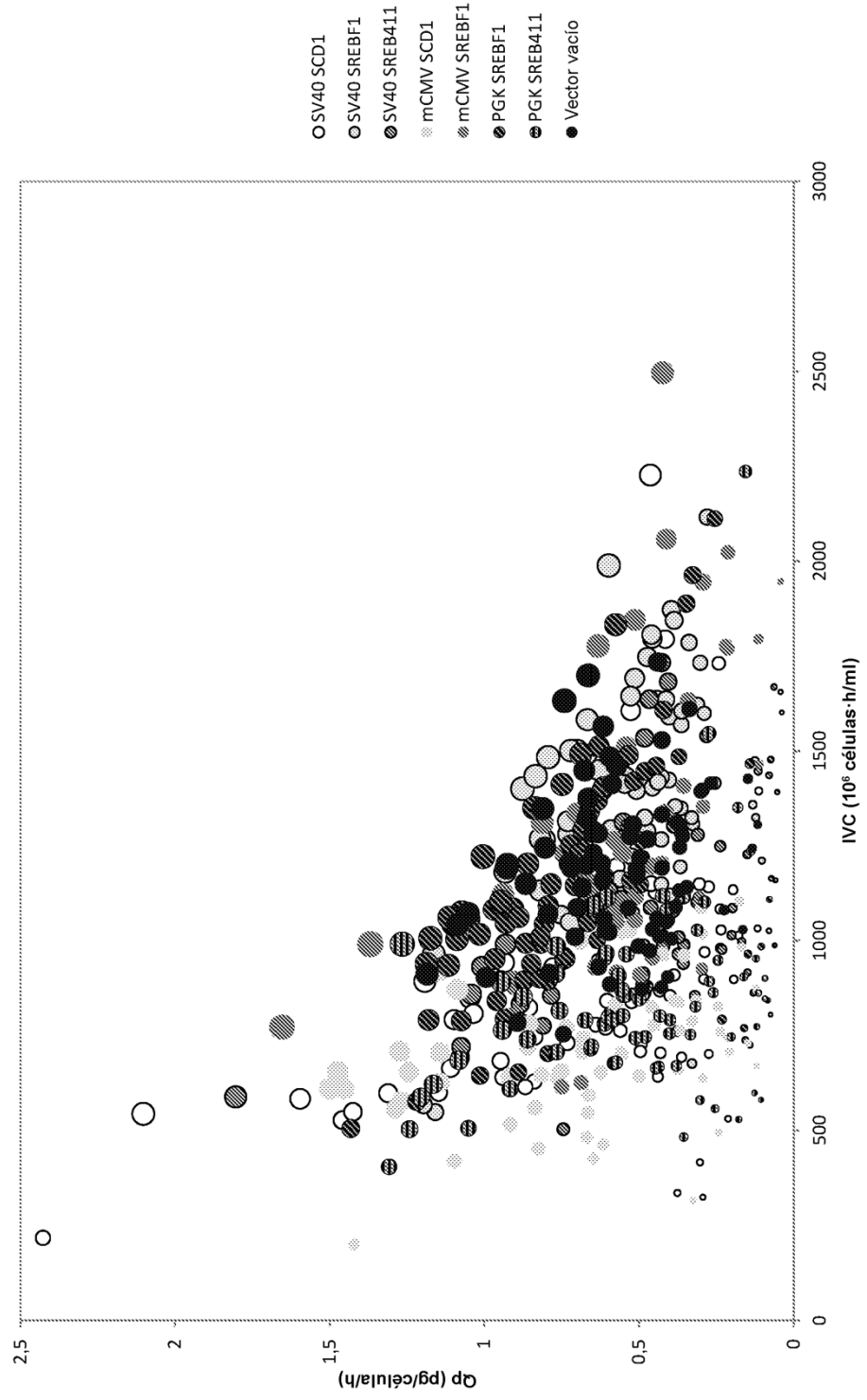


FIG. 16B
Productividad específica (Qp) del cergutuzumab-amunaleucina en función de la integral en el tiempo de la concentración de células viables (IVC)

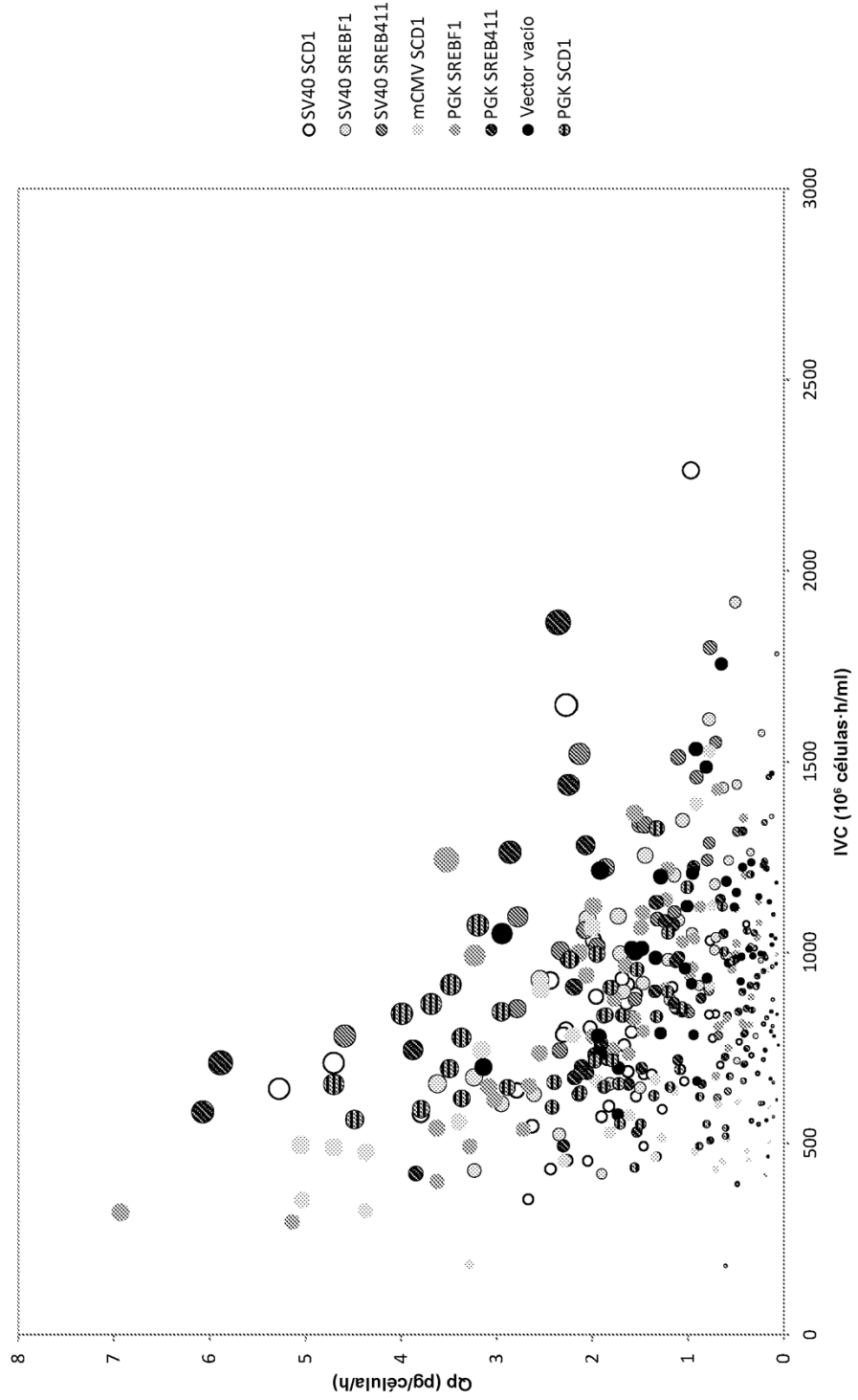


FIG. 16C
Productividad específica (Qp) del infliximab en función de la integral en el tiempo de la concentración de células viables (IVC)

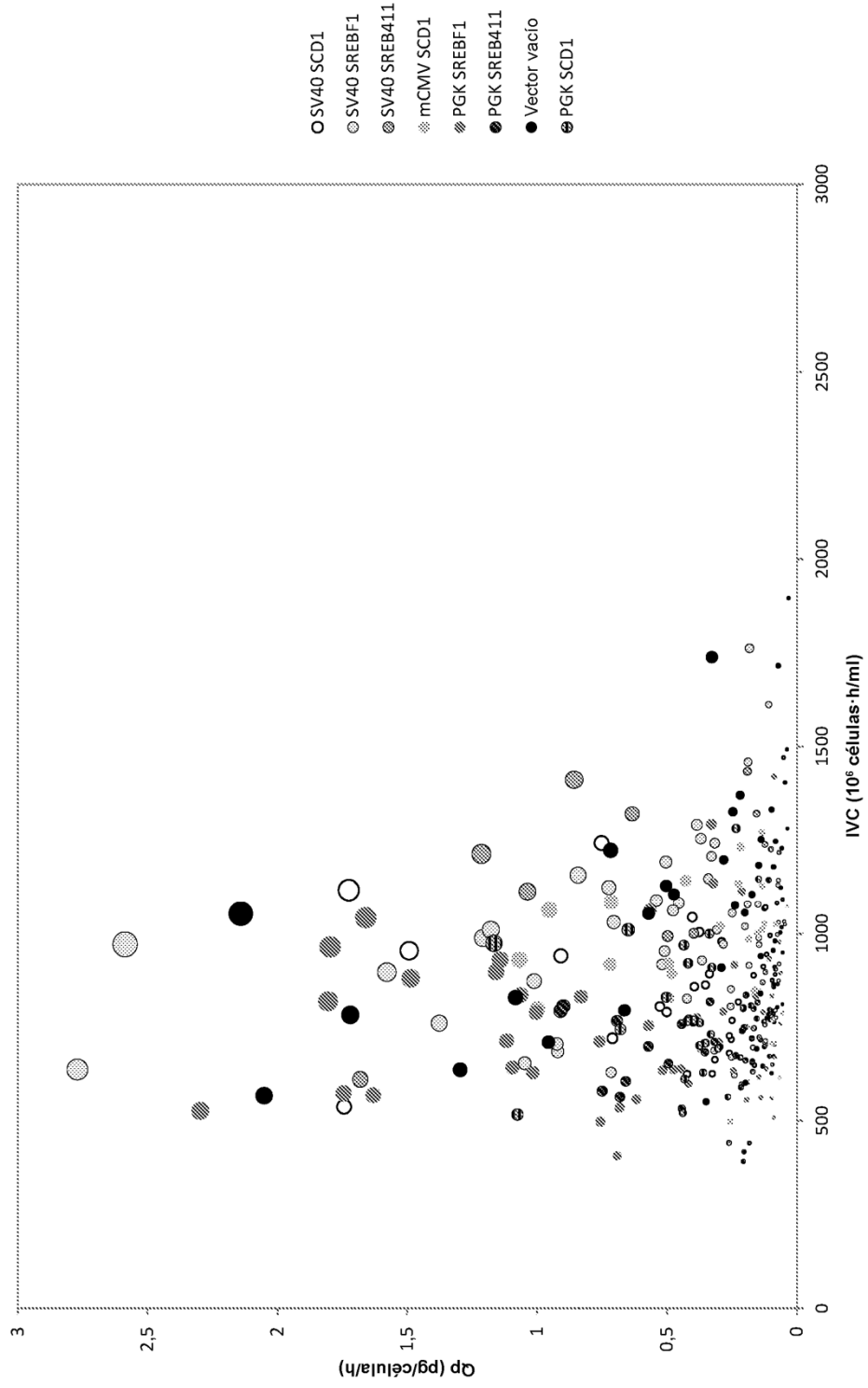


FIG. 16D
Productividad específica (Qp) del cB72.3 en función de la integral en el tiempo de la concentración de células viables (IVC)

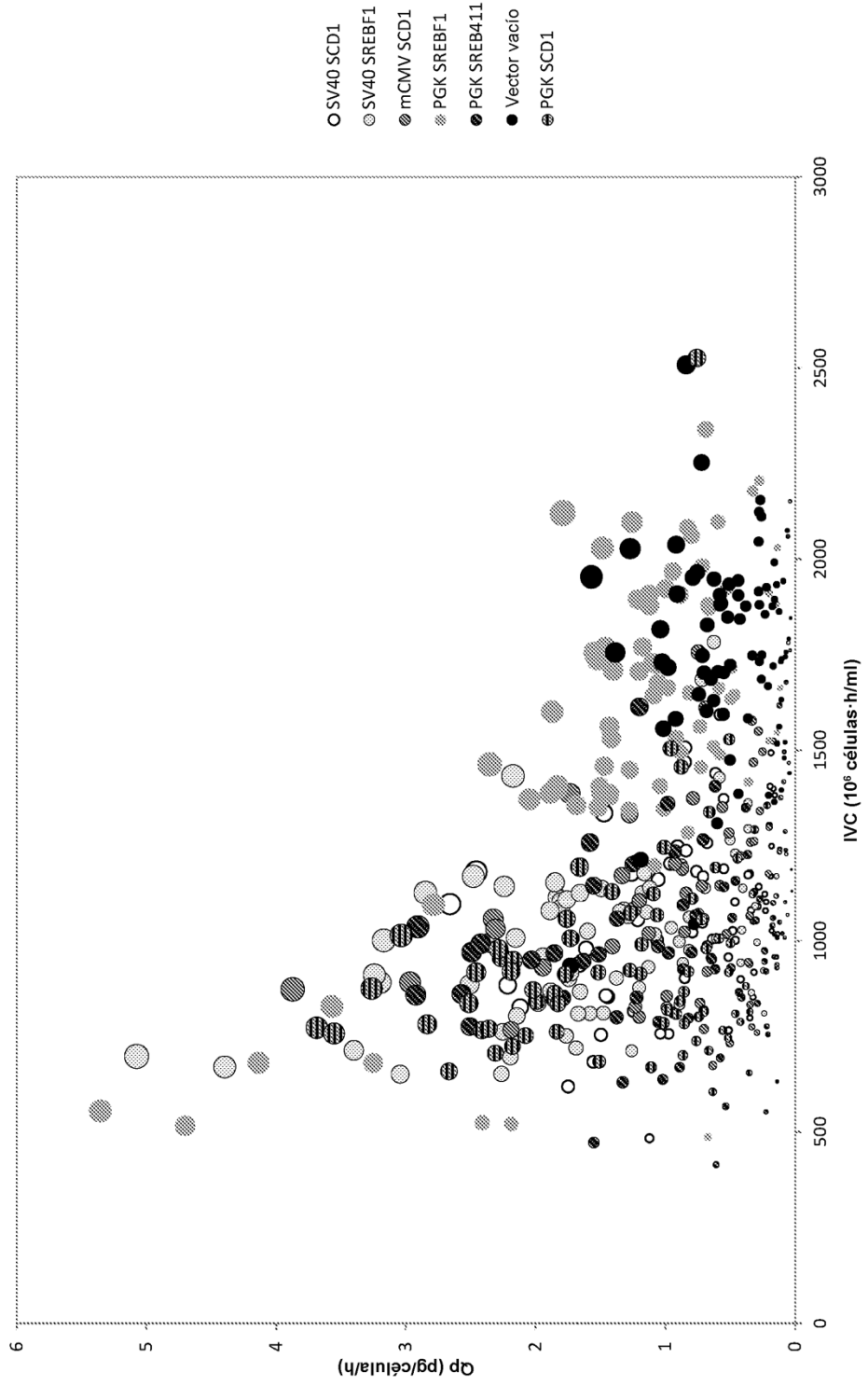


FIG. 17A

Diagrama del intervalo de confianza del 95% de etanercept

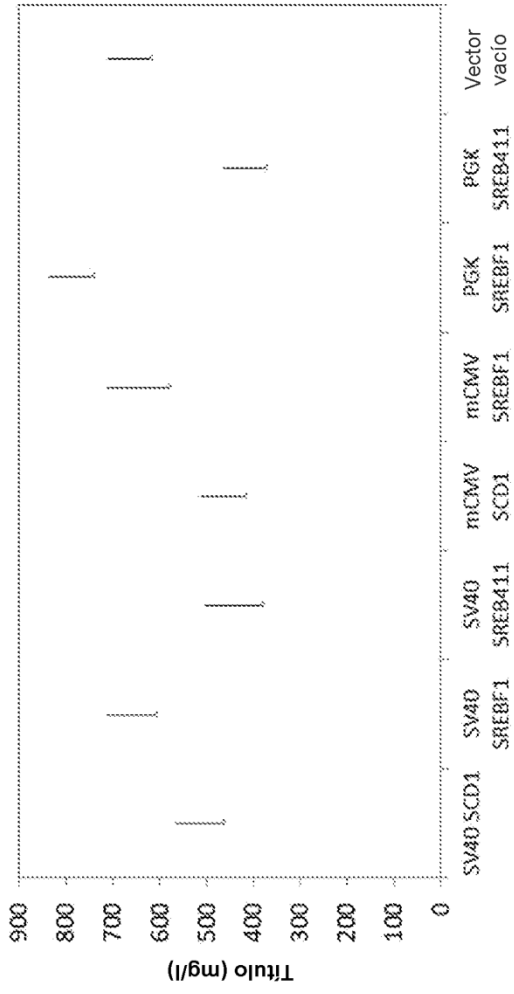


FIG. 17B

Diagrama del intervalo de confianza del 95% de cergutzumab

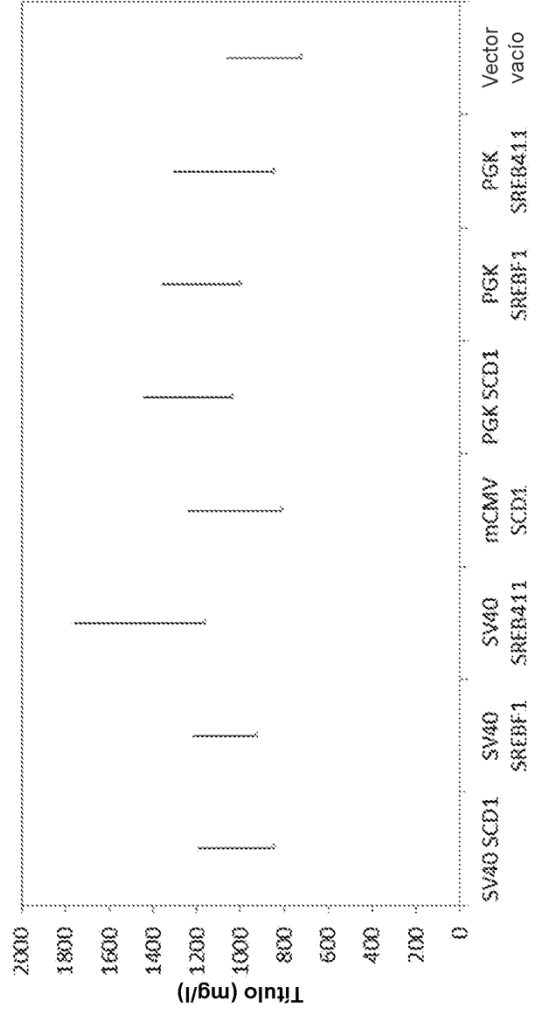


FIG. 17C

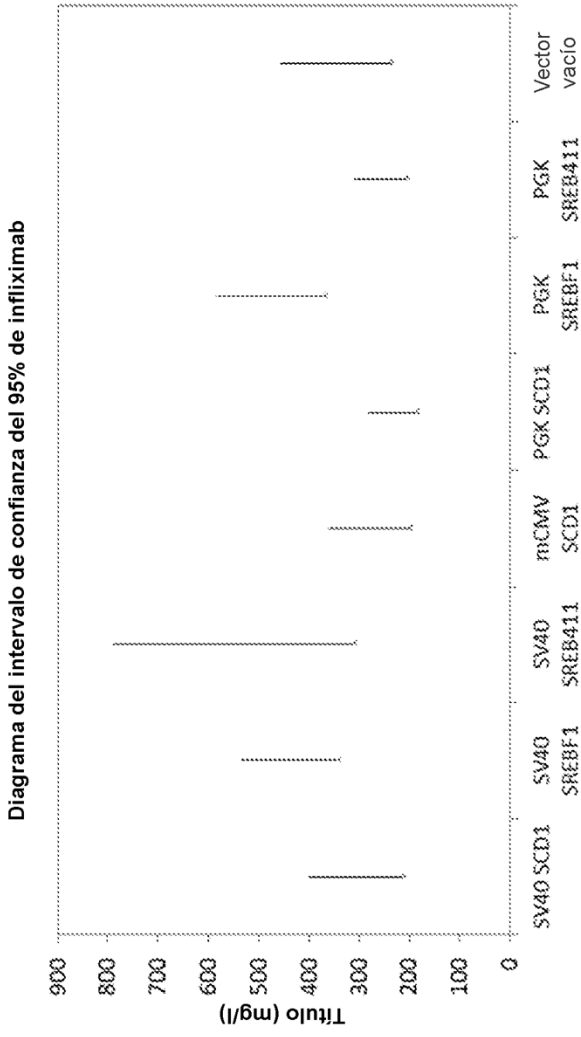


FIG. 17D

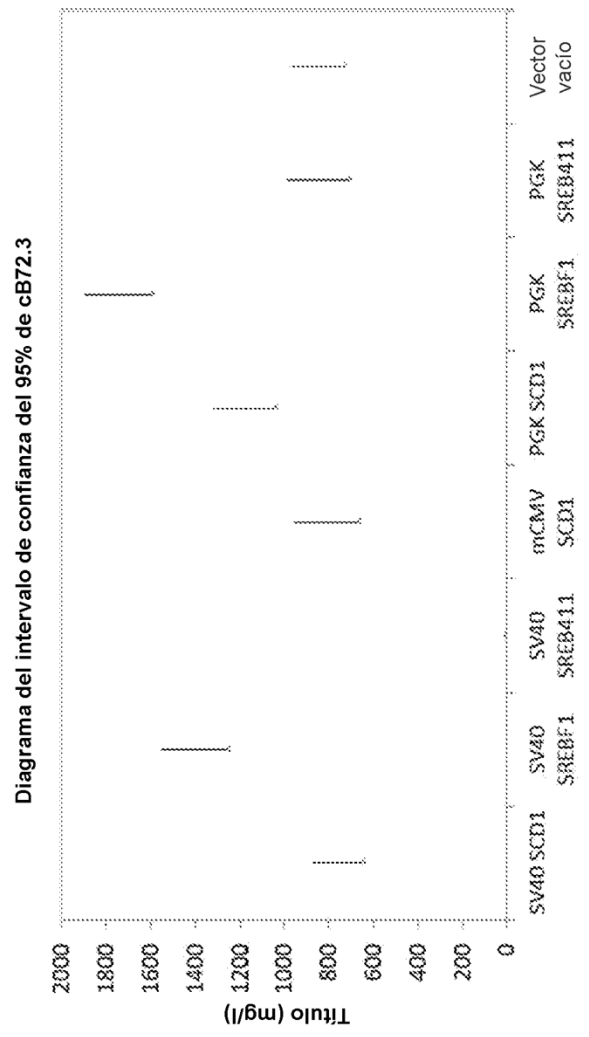


FIG. 18

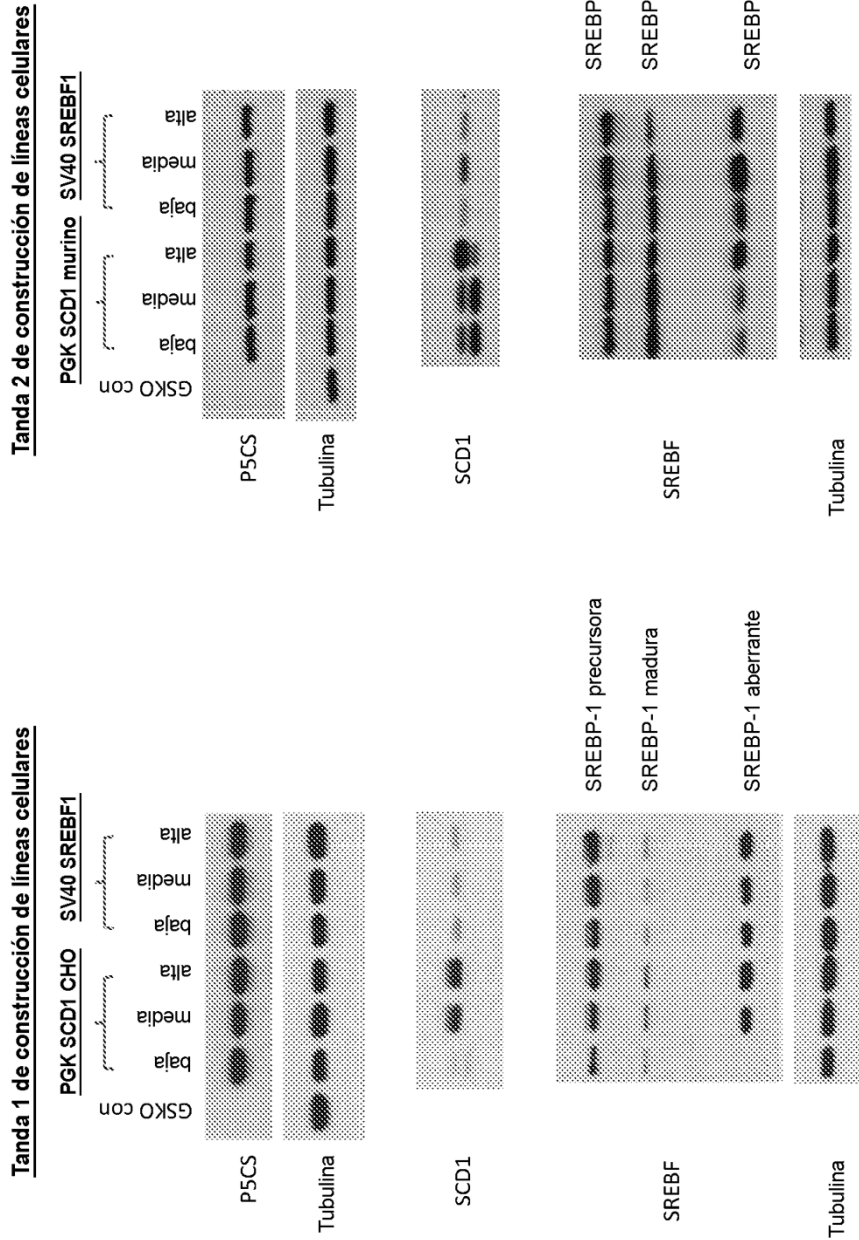


FIG. 19A

Repositorios de SV40-SREBF1 LMM

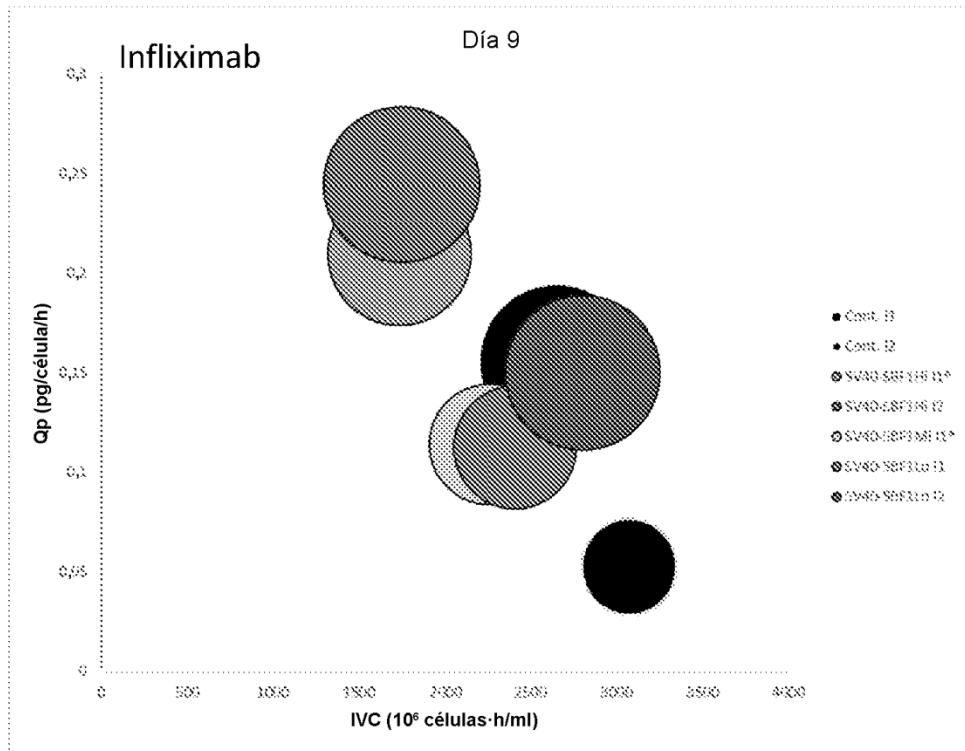
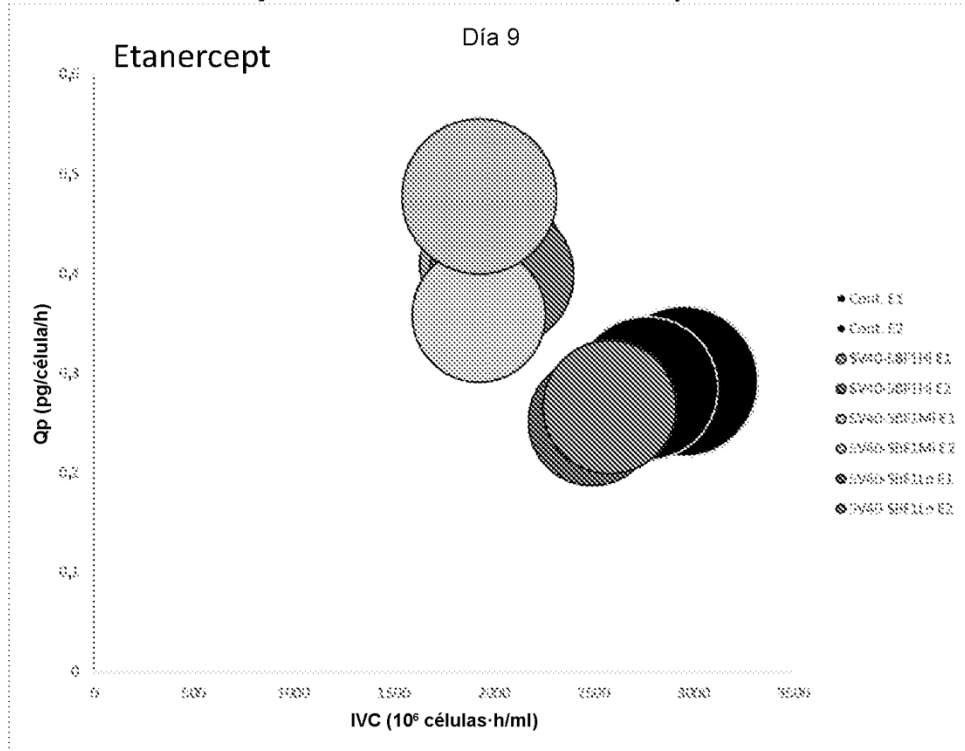


FIG. 19B

Repositorios de PGK-SREBF1 LMM

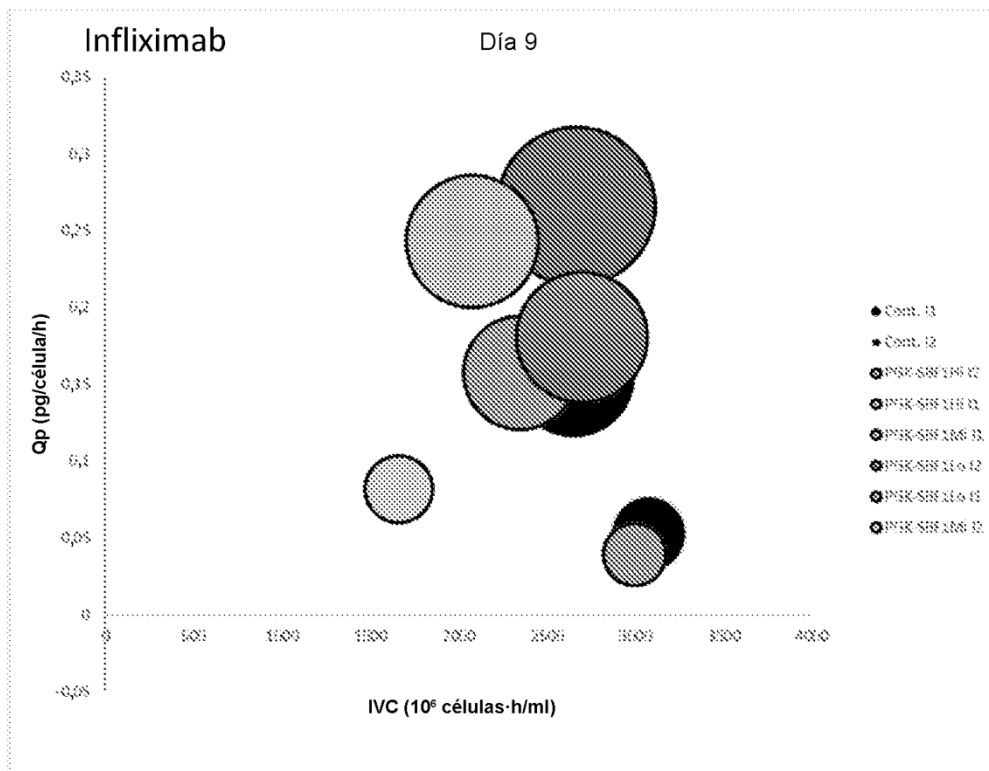
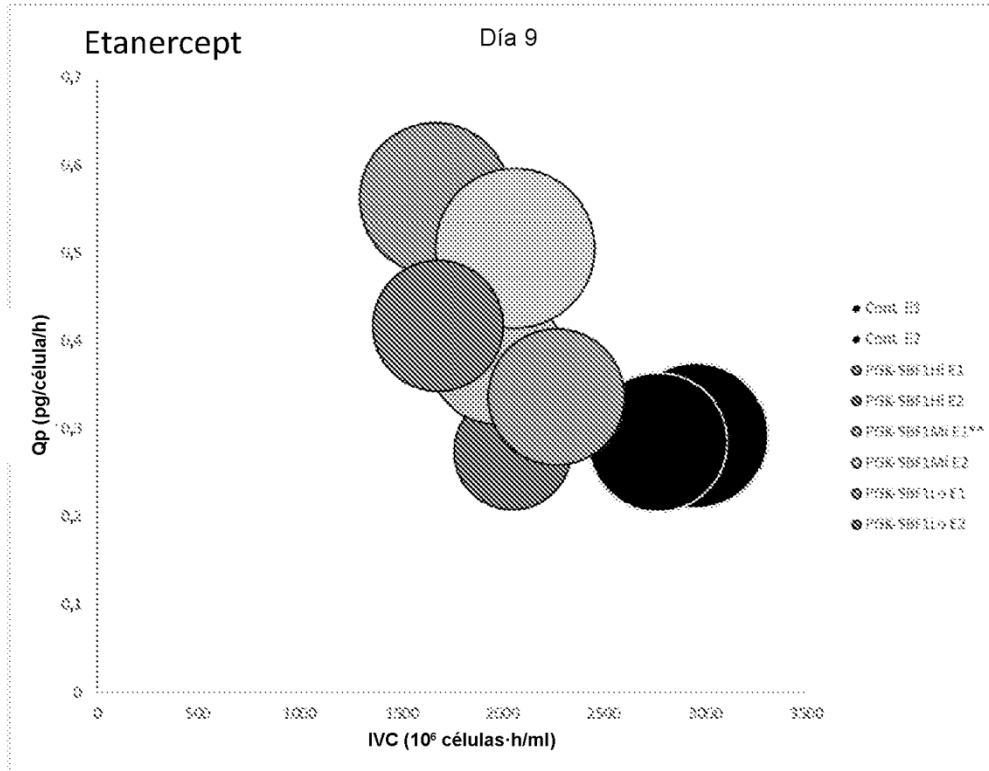


FIG. 19C

Repositorios de PGK-mSCD1 LMM

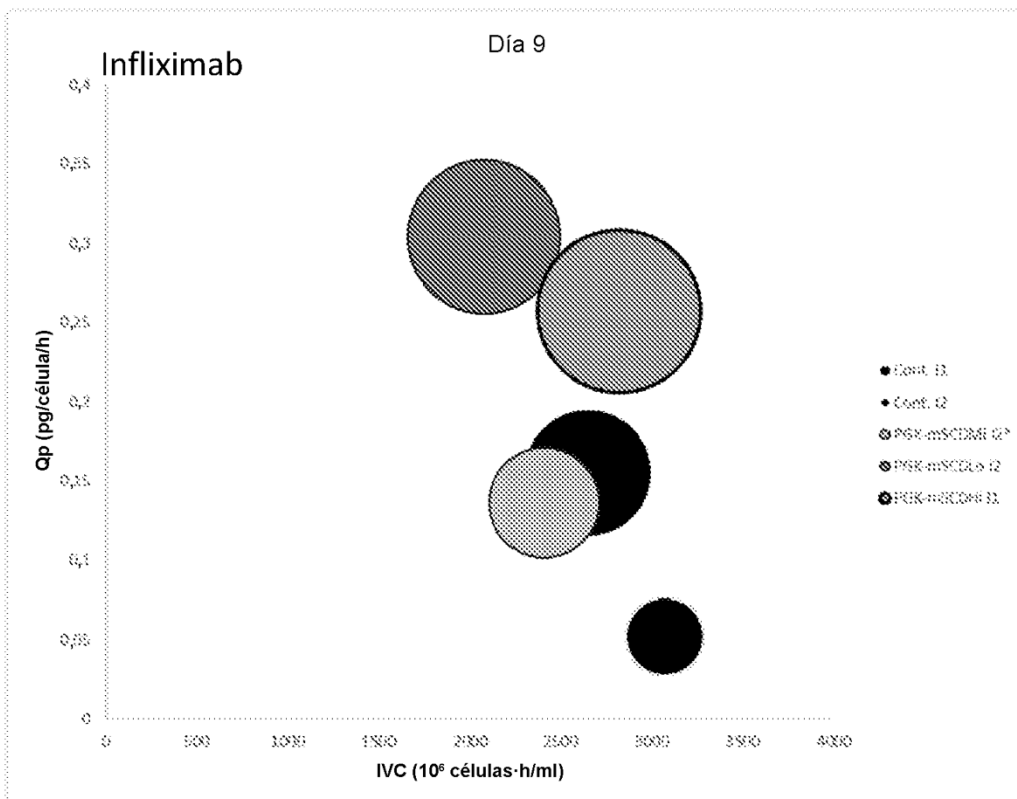
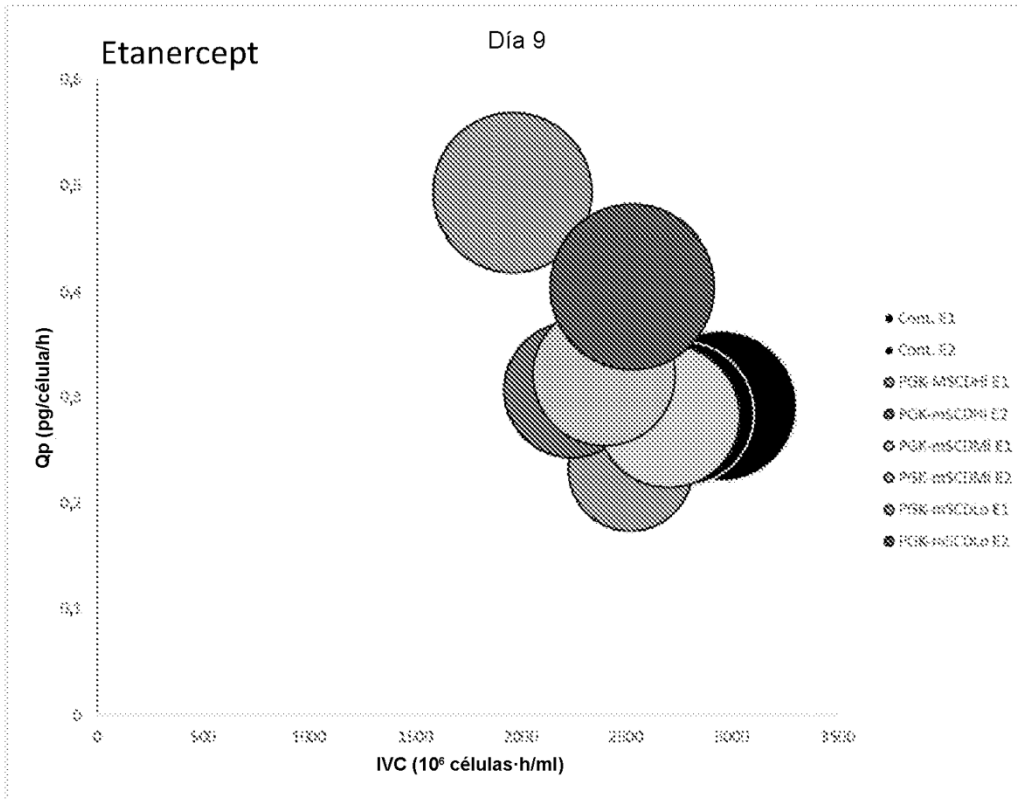


FIG. 19D

Repositorios de PGK-SCD1 LMM

