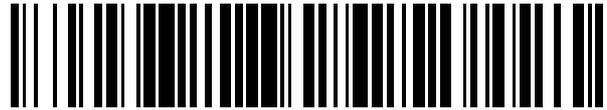


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 274**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08717274 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2126093**

54 Título: **Mejora de la producción de proteínas**

30 Prioridad:

02.03.2007 EP 07103406

15.03.2007 EP 07104226

13.09.2007 EP 07116358

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

05.03.2013

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO.
KG (100.0%)**

**BINGER STRA&SZLIG;E 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:

**KAUFMANN, HITTO;
FLORIN, LORE;
BECKER, ERIC;
OLAYIOYE, MONILOLA;
HAUSSER, ANGELIKA y
FUGMANN, TIM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 274 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

Mejora de la producción de proteínas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO TÉCNICO

10 La invención se refiere al campo de la tecnología de cultivo celular. Se refiere a un método para producir proteínas así como a un método para generar vectores de expresión novedosos y células anfitrionas para la fabricación de productos biofarmacéuticos. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas y a métodos de tratamiento.

15 ANTECEDENTES

El mercado de los productos biofarmacéuticos para uso en terapia humana continúa creciendo a una gran velocidad, evaluándose 270 nuevos productos biofarmacéuticos en estudios clínicos por ventas estimadas de 30 billones de dólares en 2003 (Werner, 2004). Los productos biofarmacéuticos pueden producirse a partir de diversos sistemas de células anfitrionas, incluyendo células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de planta y células de mamífero, incluyendo estirpes celulares derivadas de seres humanos. Actualmente, se produce un número creciente de productos biofarmacéuticos por células eucarióticas debido a su capacidad de procesar y modificar correctamente proteínas humanas. Es por tanto crucial una producción exitosa y de alto rendimiento de productos biofarmacéuticos a partir de estas células, y depende en gran medida de las características de la estirpe celular monoclonal recombinante utilizada en el proceso. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de generar nuevos sistemas de células anfitrionas con propiedades mejoradas y de establecer métodos para cultivar estirpes celulares productoras con altas productividades específicas como base para procesos de alto rendimiento.

Los enfoques anteriores se han centrado en el diseño de proceso y el diseño de reactor. Ahora, las principales mejoras están impulsadas por el desarrollo de la formulación de medios y la ingeniería genética de células anfitrionas. Los sistemas de células anfitrionas de mamífero industriales más comunes para la producción de productos biofarmacéuticos son estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO) inmortalizadas (Wurm, 2004). Las estrategias de ingeniería metabólica iniciales para mejorar las estirpes celulares de producción de mamíferos se han centrado en su capacidad de crecer en suspensión en medios exento de suero. La expresión estable de transferrina y factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) en células CHO-K1 dio como resultado una estirpe celular capaz de proliferar en condiciones exentas de proteína (Pak et al., 1996). Enfoques adicionales para mejorar las estirpes celulares de producción incluyeron el uso de elementos reguladores de ADN en los vectores de transfección dirigidos a orientar a o crear puntos calientes transcripcionales. Se ha mostrado que elementos reguladores tales como S/MARs (regiones asociadas a estructura/matriz) que afectan a la estructura de la cromatina y los UCOEs (elementos de apertura de cromatina ubicuos) derivados de genes constitutivos afectaban ambos positivamente a las productividades específicas de proteínas recombinantes producidas a partir de estirpes celulares CHO (Barnes y Dickson, 2006).

Ya que se ha mostrado que la apoptosis es la causa predominante de muerte celular en procesos de producción de cultivo de células de mamíferos (al-Rubeai y Singh, 1998), se ha investigado concienzudamente el efecto de la expresión de genes antiapoptóticos en células anfitrionas de mamífero sobre la viabilidad de cultivo. La mayoría de las estrategias de ingeniería antiapoptótica están centradas en la sobre-expresión de genes antiapoptóticos de la familia bcl-2 (por ejemplo, bcl-1 o bcl-xL; (Kaufmann y Fussenegger, 2003). Al aumentar la resistencia celular a los estímulos apoptóticos durante la fermentación, tales como el agotamiento de nutrientes y la acumulación de subproductos de desecho, los procesos de producción con estirpes celulares con la apoptosis modificada por ingeniería genética mostraron una viabilidad de cultivo prolongada y, en algunos casos, un aumento en el rendimiento de producto (Chiang y Sisk, 2005).

Puesto que la mayoría de los productos biofarmacéuticos son proteínas que se secretan por las células durante el proceso de producción, la maquinaria de transporte secretor de la estirpe celular de producción es otra diana interesante para estrategias novedosas de ingeniería genética de células anfitrionas.

La secreción de proteína es un mecanismo multietapa complejo: Las proteínas destinadas a ser transportadas al espacio extracelular o a la membrana plasmática externa se introducen en primer lugar cotraduccionalmente al retículo endoplásmico. Desde allí, se empaquetan en vesículas lipídicas y se transportan al aparato de Golgi y finalmente desde la red trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática, donde se liberan al medio de cultivo (Seth et al., 2006).

El rendimiento de cualquier proceso de producción biofarmacéutica depende en gran medida de la cantidad de producto proteico que secreten las células productoras por unidad de tiempo cuando crecen en condiciones de proceso. Son necesarios muchos procesos bioquímicos intracelulares complejos para sintetizar y secretar una proteína terapéutica por una célula eucariótica. Todas estas etapas tales como transcripción, transporte de ARN,

traducción, modificación post-traducciona l y transporte de proteína están estrechamente reguladas en la estirpe de célula anfitriona de tipo silvestre, y tendrán una repercusión sobre la productividad específica de cualquier estirpe celular productora derivada de este anfitrión.

5 Muchos enfoques de ingeniería genética han empleado la creciente comprensión de las redes moleculares que impulsan procesos tales como la transcripción y la traducción para aumentar el rendimiento de estas etapas en la producción de proteína. Sin embargo, como para cualquier proceso de producción multietapa, ampliar un cuello de botella durante las etapas tempranas de la cadena del proceso posiblemente crea cuellos de botella más adelante, especialmente después de la traducción. Hasta cierto umbral, se ha reseñado que la productividad específica de la
10 célula de producción se correlaciona linealmente con el nivel de transcripción génica del producto (Barnes et al., 2007). Sin embargo, una potenciación adicional de la expresión de producto a nivel de ARNm puede conducir a una sobrecarga de la maquinaria de síntesis, plegado o transporte de proteína, dando como resultado una acumulación intracelular del producto proteico. Es más, esto puede observarse frecuentemente en procesos de fabricación actuales (FIGURA 1).

15 Los enfoques de ingeniería genética orientados específicos dirigidos a enfrentarse a este problema y a mejorar eficazmente la secreción de productos proteicos a partir de células eucarióticas están restringidos por la falta actual de comprensión de la compleja red regulatoria que impulsa el transporte de proteínas a la membrana plasmática.

20 Los primeros estudios sobre ingeniería genética del transporte intracelular de proteínas terapéuticas secretadas se han centrado en la sobreexpresión de chaperonas moleculares como proteína de unión BiP/GRP78 y proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las chaperonas son proteínas celulares albergadas en el retículo endoplásmico (ER) que ayudan al plegamiento y ensamblaje de proteínas recién sintetizadas. En contraposición con lo que podría esperarse, se ha mostrado que la sobreexpresión de BiP en células de mamífero reduce en lugar de aumentar la
25 secreción de proteínas con las que se asocia (Dorner y Kaufman, 1994). Igualmente, la sobreexpresión de PDI en células CHO reducía la expresión de una proteína de fusión TNFR:FC (Davis et al., 2000), mientras que la velocidad de producción específica de un anticuerpo aumentaba un 40% (Borth et al., 2005). Una posible explicación para estos sorprendentes descubrimientos, que el aumento de la capacidad de plegamiento de la proteína celular crea un cuello de botella más adelante, es apoyada por un artículo que describe problemas de transporte de ER a cis-Golgi
30 para la producción de IFN-gamma en una estirpe celular CHO (Hooker et al., 1999).

Otro enfoque reciente para aumentar la capacidad de secreción de células de mamífero es la sobreexpresión heteróloga del factor de transcripción proteína de unión a la secuencia X 1 (XBP-1). La XBP-1 es uno de los reguladores maestros en la diferenciación de células plasmáticas, un tipo celular especializado optimizado para la
35 producción a alto nivel y la secreción de anticuerpos (Iwakoshi et al., 2003). La XBP-1 regula este proceso uniéndose a los denominados elementos sensibles al estrés del ER (ERSE) en los promotores de un amplio espectro de genes de la ruta secretora, dando como resultado (i) una extensión física del ER, (ii) una masa y función mitocondrial aumentados, (iii) un mayor tamaño de célula y (iv) una síntesis de proteína total potenciada (Shaffer et al., 2004).

40 Recientemente, se han descrito intentos de aumentar la secreción de proteína sobreexpresando XBP-1 en células no plasmáticas, especialmente en estirpes celulares de producción. En células CHO-K1, se mostró que aumentaba el nivel de producción de dos proteínas indicadoras (fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y alfa-amilasa secretada (SAMY)) después de la introducción de XBP-1 en células CHO-K1. Sin embargo, no pudo demostrarse ningún efecto
45 en estudios transitorios con otras estirpes celulares tales como células HEK293, HeLa o HT-1080 (Tigges y Fussenegger, 2006). La solicitud de patente WO2004111194 de Ailor Eric reivindica la sobreexpresión de XBP-1 o ATF6 para la generación de estirpes celulares altamente productivas.

50 Destacadamente, la XBP-1 no sólo regula la diferenciación de células plasmáticas, sino que también desempeña un papel importante en la respuesta de proteína no plegada (UPR) (Brewer y Hendershot, 2005). La UPR representa una compleja red de transducción de señal activada mediante la inhibición del plegamiento de proteína en el retículo endoplásmico (ER). La UPR coordina las respuestas adaptativas a esta situación de estrés, incluyendo la inducción de chaperonas moleculares residentes en el ER y la expresión de proteína plegasa para aumentar la capacidad de plegamiento de proteína del ER, la inducción de la síntesis de fosfolípidos, la atenuación de la traducción general y
55 la regulación positiva de la degradación asociada al ER para reducir la carga de proteína no plegada del ER. Bajo un estrés de ER grave o prolongado, la UPR induce en última instancia la muerte celular apoptótica (Schroder, 2006).

60 El proceso de diferenciación terminal, tal como la maduración a partir de un linfocito hasta una célula plasmática, se considera habitualmente un programa similar a la apoptosis, durante el cual la célula pierde su capacidad proliferativa para dar lugar a una célula secretora diferenciada terminalmente. De hecho, casi todos los tipos de células diseñados específicamente para secreción de proteína a alto nivel (por ejemplo, células glandulares, células beta pancreáticas) están diferenciadas terminalmente, no son capaces de proliferar y tienen una vida útil limitada, experimentando en última instancia muerte celular programada (Chen-Kiang, 2003). Por lo tanto, sobreexpresar XBP-1 como regulador de la diferenciación de células plasmáticas así como de UPR es potencialmente
65 desventajoso debido a su riesgo inherente de inhibir la proliferación y/o inducir la apoptosis.

Tomado en conjunto, existe la necesidad de mejorar la capacidad secretora de células anfitrionas para la producción de proteína recombinante. Esto podría hacerse aún más importante en combinación con tecnologías novedosas de potenciación de la transcripción y en procesos de alto título para evitar cuellos de botella post-traduccionales y la acumulación intracelular del producto proteico (FIGURA 1). Sin embargo, actualmente existen dos obstáculos importantes en el camino hacia la manipulación orientada de la maquinaria de transporte secretor: El conocimiento aún limitado sobre los mecanismos reguladores subyacentes y el requisito de evitar una respuesta inhibitoria del crecimiento o apoptótica concomitante de la célula productora.

La presente invención describe un papel novedoso y sorprendente para la proteína de transferencia de ceramida CERT en el transporte de proteínas secretadas a la membrana plasmática, y además proporciona un método para mejorar eficazmente la producción de proteínas que se transportan por la ruta secretora por células eucarióticas.

La CERT (también conocida como proteína de unión a antígeno Goodpasture) es una proteína citosólica esencial para el suministro no vesicular de ceramida desde su sitio de producción en el retículo endoplásmico (ER) a membranas de Golgi, donde tiene lugar la conversión en esfingomielina (SM) (Hanada et al., 2003).

Existen dos isoformas de CERT: la forma más abundantemente expresada, alternativamente cortada y empalmada, que carece de una región rica en serina de 26 aminoácidos (SEC ID N° 10, 11) y la proteína completa de 624 aminoácidos, designada CERT_L (SEC ID N° 12, 13) (Raya et al., 2000). Ambas isoformas de CERT poseen un dominio carboxi-terminal de transferencia de lípido (START) relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) que es necesario y suficiente para la unión y transporte de ceramida (Hanada et al., 2003). Los dominios START están altamente conservados desde mosca y gusano hasta seres humanos (FIGURA 2). Son de ~210 aminoácidos de longitud y forman un túnel hidrofóbico que acomoda un lípido monomérico (Alpy y Tomasetto, 2005; Soccio y Breslow, 2003). Los dominios START se encuentran en 15 proteínas de mamífero, estando CERT relacionada lo más estrechamente con la proteína de transferencia de fosfatidilcolina Pctp, que se une a y transporta fosfatidilcolina (PC) entre membranas, y StarD10, una proteína de transferencia de lípido específica de PC y PE (Olayioye et al., 2005; Soccio y Breslow, 2003; Wirtz, 2006). Además del dominio START, las proteínas CERT contienen adicionalmente un dominio PH aminoterminal con especificidad por PI(4)P que es responsable de la localización en Golgi (Hanada et al., 2003; Levine y Munro, 2002) y un resto FFAT (dos fenilalaninas en una extensión ácida) que orienta la proteína al ER mediante interacción con las proteínas transmembrana residentes en el ER VAP-A y VAP-B (Kawano et al., 2006; Loewen et al., 2003).

Se ha demostrado el papel fundamental de la CERT en el tráfico de lípidos en la estirpe celular de ovario de hámster chino LY-A, en la que la expresión de una proteína CERT mutante no funcional alteró el transporte de ceramida, dando así como resultado niveles celulares reducidos de esfingomielina (Hanada et al., 2003). Se cree que aparece transferencia de lípido no vesicular en los denominados sitios de contacto de membrana (MCS), en los que el ER entra en un estrecho contacto con otros orgánulos (Levine y Loewen, 2006). Por tanto, la CERT puede transportar una muy corta distancia entre el ER y membranas de Golgi, o quizás ponerse en contacto con ambos compartimentos simultáneamente. Cuando se sobreexpresa, el dominio START de CERT es suficiente para la transferencia de ceramida al aparato de Golgi (Kawano et al., 2006). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, tanto los restos de orientación a Golgi como a ER son esenciales para la función de CERT. En células LY-A, se identificó que la CERT contenía una mutación en su dominio PH (G67E), volviendo a la proteína defectiva de unión a PI(4)P (Hanada et al., 2003). El requisito de PI(4)P para la función de CERT está apoyado adicionalmente por un reciente artículo de que la actividad PI4KIII-beta es necesaria para un tráfico de ceramida eficaz a Golgi (Toth et al., 2006), cuya actividad enzimática está estimulada por la proteína cinasa D (PKD).

La PKD pertenece a una subfamilia de proteína cinasas específicas de serina/treonina (que comprende PKD1/PKC μ , PKD2 y PKD3/PKC ν), y se ha identificado recientemente que es de importancia crucial para la regulación del transporte de proteína desde la membrana de Golgi hasta la membrana plasmática (revisado en Rykx et al., 2003; Wang, 2006)). El agrupamiento y activación de PKD en la TGN están mediados por el lípido diacilglicerol (DAG; (Baron y Malhotra, 2002)), del que se genera un conjunto mediante la esfingomielina sintasa a partir de ceramida y fosfatidilcolina.

La presente invención muestra que la PKD fosforila la CERT en la serina 132 adyacente al dominio PH, con lo que se regulan negativamente la unión a PI(4)P, la orientación a Golgi y la actividad de transferencia de ceramida. Además, al transferir ceramida que es necesaria para la producción de DAG a membranas de Golgi, la CERT estimula la actividad PKD, estableciendo así un bucle de realimentación regulador que asegura el mantenimiento del transporte secretor constitutivo.

De forma importante, los datos proporcionados muestran además que en estirpes celulares eucarióticas diferentes (COS7 y HEK293), la introducción del gen que codifica CERT potencia significativamente la secreción de una proteína heteróloga en el medio de cultivo. Este efecto es aún más pronunciado cuando se utiliza una CERT mutante que no puede fosforilarse por PKD. La delección del sitio aceptor de fosforilación en CERT interrumpe el control negativo de PKD sobre CERT, pero dejando la realimentación positiva de CERT sobre PKD intacta mediante el soporte de la conversión de ceramida en esfingomielina y DAG. Por lo tanto, puede especularse que el mecanismo potenciador de la secreción de la presente invención puede ejercerse no sólo por CERT de tipo silvestre,

sino también por todos los mutantes de CERT que desacoplan la CERT de la influencia negativa de la PKD, incluyendo mutaciones puntuales de la serina aceptora, deleciones que incluyen este resto, así como la mutación o deleción del sitio de anclaje de PKD en CERT o incluso el dominio START solo.

5 La CERT pertenece a la familia de las proteínas de transferencia de lípido relacionadas con StAR (Soccio y Breslow, 2003), que se caracterizan por sus dominios START para unión a lípido. Ya que se ha demostrado que el dominio START de CERT es tanto necesario como suficiente para la acción de CERT (Hanada et al., 2003), es posible que el efecto promotor de la secreción de CERT pudiera observarse igualmente cuando se sobreexpresa otro miembro de esta familia de proteínas. Esto es especialmente probable para los miembros estrechamente relacionados de la subfamilia de PCTP, que comprende PCTP (SEC ID N° 26, 27), la CERT/GPBP misma, StarD7 y StarD10. Estas proteínas tienen distintas especificidades de unión a lípido y podrían tener igualmente una repercusión sobre la función de los orgánulos implicados en la secreción de proteínas heterólogas. Además, la expresión de las proteínas relacionadas STARD4 (SEC ID N° 20, 21) y STARD5 (SEC ID N° 22, 23), que están inducidas por estrés del ER, puede funcionar satisfaciendo la demanda aumentada de transferencia de lípido de células durante un proceso de producción.

La existencia de proteínas con dominio START en organismos eucarióticos desde mosca, gusano y ratón hasta seres humanos indica que los mecanismos básicos de tráfico de lípido están conservados en el reino eucariótico. Además, sugiere que el principio descrito en la presente invención, es decir el aumento de secreción por la expresión reforzada de CERT, puede ser bien aplicable a todas las células eucarióticas, incluyendo levadura.

En resumen, la presente invención proporciona un método para potenciar el transporte secretor de proteínas en células eucarióticas mediante la expresión heteróloga de CERT, CERT mutantes u otro miembro de la familia de la proteína START. Este método es particularmente útil para la generación de sistemas de células anfitrionas optimizados con capacidad de producción potenciada para la expresión y fabricación de productos proteicos recombinantes.

El método descrito en la presente invención es ventajoso en varios aspectos:

En primer lugar, se demuestra que la expresión heteróloga de CERT es una estrategia para potenciar la producción de proteína recombinante aumentando la capacidad secretora de la célula anfitriona. Potenciar la productividad específica de las células productoras se traduce en mayores rendimientos de producto en procesos de producción de proteína industrial. Con la actual tendencia hacia procesos de alto título y tecnologías de potenciación de la expresión más sofisticadas, los cuellos de botella post-traduccionales se convertirán en las etapas limitantes de la velocidad evidentes en la producción de proteína y, por tanto, atraerán una atención creciente hacia los enfoques de ingeniería genética de la secreción.

En segundo lugar, el dominio START de CERT está altamente conservado en eucariotas desde *C. elegans* hasta seres humanos. Esto sugiere firmemente que el método de la presente invención no sólo puede utilizarse en sistemas de células anfitrionas de mamífero, sino que es igualmente aplicable a la producción de proteína en todas las células eucarióticas, incluyendo células de insecto y células de levadura.

Como un tercer rasgo importante, la CERT como factor citosólico no es parte de la respuesta de proteína no plegada, y por tanto no está implicada en el programa de respuesta al estrés celular que induce la terminación de la traducción de proteína y, si no se resuelve, conduce a la detención del ciclo celular o incluso a la apoptosis. En contraposición, al desempeñar un papel independiente en el tráfico de lípido, orientarse a CERT podría conferir una secreción de proteína potenciada sin la inducción concomitante de apoptosis. Por tanto, sobreexpresar CERT en células anfitrionas productoras podría ser ventajoso frente a enfoques de ingeniería genética basados en XBP-1.

En cuarto lugar, se muestra en la presente invención que la mutación en Ser132 de CERT altera la fosforilación de CERT por PKD, lo que libera a la CERT de una influencia reguladora negativa. Mientras tanto, la estimulación positiva de PKD por CERT mediante DAG permanece intacta (FIGURA 3A). Este descubrimiento sitúa a la CERT en la ruta de señalización "por detrás" de la PKD, que se ha publicado que está implicada críticamente en la regulación de las etapas tardías de transporte secretor, a saber, el transporte desde la red trans-Golgi a la membrana plasmática (Liljedahl et al., 2001). Con respecto al transporte de proteína, esto significa que la CERT actúa "por delante" del ER, lo que hace a la CERT la diana preferible para manipulación comparada con XBP-1 o proteínas residentes en el ER específicas (FIGURA 3B).

Puesto que la CERT puede tener repercusión incluso sobre las últimas etapas de la ruta secretora, puede especularse que la expresión heteróloga de CERT tiene el potencial de potenciar la secreción sin crear cuellos de botella más adelante. A nuestro entender, la CERT es actualmente la diana de acción más adelantada para ingeniería genética de la ruta secretora para potenciar la producción de proteína heteróloga.

Tomado en conjunto, la repercusión de la proteína de transferencia de lípido CERT sobre el transporte secretor desde el ER hasta Golgi y desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática, sin la conexión desventajosa con una respuesta de estrés inhibitoria del crecimiento o inductora de la apoptosis, hace a CERT, mutantes de CERT y

otras proteínas de la familia de START dianas muy atractivas y prometedoras para enfoques de ingeniería genética que se dirigen a potenciar la capacidad secretora de células eucarióticas.

APLICABILIDAD

5 La manipulación orientada de CERT que se describe en la presente invención puede utilizarse para un amplio intervalo de aplicaciones. En particular, pueden distinguirse dos enfoques básicos:

- 10 (i) sobreexpresión y/o potenciación de la actividad de CERT o un derivado de CERT para aumentar la capacidad de transporte secretor de una célula, o
- (ii) reducción de la actividad y/o expresión de CERT como medio de terapia génica para reducir la proliferación y/o invasión celular por cáncer.

Aplicabilidad de la sobreexpresión de CERT

15 La invención descrita describe un método para generar células anfitrionas eucarióticas mejoradas para la producción de proteínas heterólogas mediante la introducción del gen que codifica CERT, mutantes de CERT u otras proteínas de la familia de la proteína START. Esto posibilitará potenciar el rendimiento de proteína en procesos de producción basados en células eucarióticas. Se reducirá así el coste de bienes de dichos procesos y al mismo tiempo se reducirá el número de lotes que se necesitan producir para generar el material necesario para estudios de investigación, diagnóstico, estudios clínicos o suministro comercial de una proteína terapéutica. La invención acelerará además el desarrollo de fármacos, ya que a menudo la generación de cantidades suficientes de material para estudios preclínicos es un paquete de trabajo crítico con respecto a los plazos.

20 La invención puede utilizarse para aumentar la propiedad de todas las células eucarióticas utilizadas para la generación de una o varias proteínas específicas con fines de diagnóstico, fines de investigación (identificación de diana, identificación de molécula de partida, optimización de molécula inicial) o fabricación de proteínas terapéuticas en el mercado o en el desarrollo clínico.

30 Como se muestra en la presente invención, la expresión heteróloga de CERT no sólo potencia la secreción de proteína, sino que también tiene influencia sobre la abundancia de proteínas transmembrana sobre la superficie celular. La inhibición o expresión reducida de CERT conduce a una reducción drástica de la cantidad de receptores de superficie celular tales como el receptor de transferrina (FIGURA 8). Ya que las proteínas secretadas y transmembrana comparten las mismas rutas secretoras y se transportan igualmente en vesículas lipídicas, estos datos subrayan la importancia de la CERT en la modulación de la secreción, así como en el transporte de receptores de superficie celular unidos a membrana.

40 Por lo tanto, el método descrito en la presente memoria puede utilizarse también con fines de investigación académica e industrial que se dirigen a caracterizar la función de receptores de superficie celular. Por ejemplo, puede utilizarse para la producción y posterior purificación, cristalización y/o análisis de proteínas de superficie. Esto es de crucial importancia para el desarrollo de nuevas terapias de fármacos humanos, ya que los receptores de superficie celular son una clase predominante de dianas de fármaco. Además, podría ser ventajoso para el estudio de los complejos de señalización intracelular asociados a receptores de superficie celular o al análisis de la comunicación célula-célula, que está mediado en parte por la interacción de factores de crecimiento solubles con sus correspondientes receptores sobre la misma u otra célula.

45 Aplicabilidad de reducir/inhibir la CERT

50 En la presente invención, se proporcionan pruebas de que la reducción de la expresión de CERT conduce a una secreción reducida de proteínas extracelulares solubles, así como a una menor abundancia de receptores de superficie celular. Esto hace a la CERT una diana atractiva para manipulación terapéutica.

55 Uno de los hitos en la conversión de una célula sana normal en una célula cancerosa es la adquisición de independencia de la presencia de factores de crecimiento exógenos (Hanahan y Weinberg, 2000). En contraposición con las células normales, las células tumorales son capaces de producir todos los factores de crecimiento necesarios para su supervivencia y proliferación por sí mismas. Además de este mecanismo autocrino, las células cancerosas muestran a menudo una expresión regulada positivamente de receptores de factor de crecimiento sobre su superficie, lo que conduce a una sensibilidad aumentada hacia factores de crecimiento de acción paracrina y de supervivencia secretados por células del tejido circundante. Al orientarse a CERT en células tumorales, por ejemplo, utilizando enfoques de ARNpi, podría ser posible desestabilizar los mecanismos estimuladores de crecimiento y/o de supervivencia tanto autocrinos como paracrinos de dos modos: (i) reduciendo el transporte y la secreción de factor de crecimiento y (ii) reduciendo la cantidad del receptor de factor de crecimiento correspondiente en células tumorales. Así, se reducirá tanto la cantidad de señal estimulante del crecimiento como la capacidad de la célula cancerosa de percibir y responder a estas señales. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de CERT en células cancerosas podría representar una poderosa herramienta para evitar la proliferación y supervivencia de células cancerosas.

La CERT podría ser además una potente diana terapéutica para suprimir la invasión y metástasis tumorales. Durante las últimas etapas de la mayoría de tipos de cáncer humano, los tumores primarios generan células colonizadoras que salen, invaden tejidos adyacentes y viajan a sitios distantes donde pueden tener éxito fundando nuevas colonias, conocidas como metástasis.

Como prerequisite para la invasión de tejido, las células cancerosas expresan un conjunto entero de proteasas que las posibilita migrar a través del tejido sano circundante, cruzar la membrana basal, entrar en la corriente sanguínea y finalmente invadir el tejido de destino. Algunas de estas proteasas se expresan como proteínas unidas a membrana, por ejemplo, MT-MMP (Egeblad y Werb, 2002) y ADAM (Blobel, 2005). Debido a su papel crucial en la remodelación de matriz, la diseminación de factores de crecimiento y la invasión tumoral, las proteasas mismas se discuten como dianas de fármaco para la terapia de cáncer (Overall y Kleinfeld, 2006). Se teoriza que la inhibición de la expresión y/o actividad de CERT en células tumorales reducirá la cantidad de proteasas unidas a membrana sobre la superficie de la célula diana. Esto podría reducir o incluso alterar la capacidad invasiva de la célula tumoral, así como su capacidad para diseminar factor de crecimiento, dando como resultado una invasividad y potencial metastásico reducidos del tumor. Por tanto, orientarse a CERT mediante la unión a un resto de secuencia de ARN de CERT. La tumorigénesis de etapa tardía, especialmente la conversión de un nódulo benigno/sólido en un tumor agresivo metastatizante.

Para aplicaciones terapéuticas, es por tanto el objetivo reducir y/o inhibir la actividad y/o expresión de CERT. Esto puede conseguirse mediante una composición nucleotídica que se utiliza como terapia humana para tratar una enfermedad inhibiendo la función de CERT, en la que el fármaco está compuesto por ARNi y ARNpi o un ARN antisentido que inhibe específicamente la CERT mediante la unión a un resto de secuencia de ARN de CERT. La reducción/inhibición de la actividad/expresión de CERT puede conseguirse también mediante una sustancia farmacéutica que contiene nucleótidos que se une a y silencia el promotor del gen CERT.

Además, una sustancia o producto farmacéutico puede estar compuesto por una nueva entidad química o péptido o proteína que inhiba la expresión o actividad de CERT. En el caso de que una proteína sea el compuesto farmacéutico activo, puede ser: (i) una proteína de unión al promotor de CERT, inhibiendo así la expresión de CERT, (ii) una proteína de unión a CERT o PKD, evitando así la unión de PKD y CERT y obstaculizando la fosforilación de CERT por PKD, (iii) una proteína similar a CERT, que sin embargo no satisface las funciones de CERT, lo que significa una variante CERT "dominante negativa", o (iv) una proteína que actúe como estructura tanto para CERT como PKD, dando como resultado una unión irreversible de CERT a PKD (=un complejo PKD/CERT estable) que no es funcional debido a la fosforilación inhibitoria de CERT por PKD y a la obstaculización de la disociación de CERT de dicho complejo.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención no es obvia a partir de la técnica anterior. Hasta este momento, los únicos datos experimentales disponibles sobre la proteína CERT apuntaban a un papel en el transporte de ceramida desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi como precursor de esfingomielina. Sólo los datos descritos en esta invención conducen a un nuevo modelo de trabajo para un papel de la CERT en el transporte de proteína desde Golgi a la membrana plasmática en células eucarióticas. La técnica anterior no proporciona ninguna pista sobre la posibilidad de potenciar la velocidad de transporte secretor de proteínas en estirpes celulares eucarióticas introduciendo el gen que codifica CERT u otro miembro de la familia de proteínas con dominio START.

El modelo de trabajo sorprendente e inesperado de la presente invención identifica a CERT como un sustrato de PKD *in vivo* novedoso y un regulador crucial de la función de Golgi.

La PKD es conocida por la técnica anterior. Es una familia de proteína cinasas específica de serina/treonina que comprende tres miembros estructuralmente relacionados: PKD1/PKC μ , PKD2 y PKD3/PKC ν . La PKD contiene dos restos aminoterminales ricos en cisteína similares a dedos de cinc que se unen a DAG, un dominio de homología con plecstrina (PH) que regula negativamente la función enzimática de PKD y un dominio cinasa carboxiterminal.

Las tres isoformas de PKD se localizan en el citosol, núcleo, complejo de Golgi y membrana plasmática, donde regulan diversos procesos celulares en el intervalo de proliferación, diferenciación, apoptosis, reorganización citoesquelética y metástasis hasta tráfico de vesícula (revisado en (Rykx et al., 2003; Wang, 2006)). Hasta ahora, sólo son conocidos unos pocos sustratos fisiológicos de PKD, que incluyen la proteína natural Kidins220, el efector Ras RIN1, histona desacetilasa 5, E-caderina y PI4KIII β (Iglesias et al., 2000; Jaggi et al., 2005; Vega et al., 2004; Wang et al., 2002). En la TGN, la PKD está implicada críticamente en la fisión de los vehículos de transporte en ruta a la superficie celular (Liljedahl et al., 2001; Yeaman et al., 2004). La PKD se agrupa en la TGN por sus regiones ricas en cisteína (Baron y Malhotra, 2002; Hausser et al., 2002; Maeda et al., 2001), donde se activa mediante fosforilación mediada por PKC ζ (az Anel y Malhotra, 2005).

Recientemente, se ha identificado a PI4KIII β , un jugador clave en la estructura y función del aparato de Golgi, como sustrato de PKD en este orgánulo (Hausser et al., 2005). La fosforilación mediada por PKD de PI4KIII β en la serina 294 estimula su actividad lípida cinasa, dando como resultado una producción potenciada de 4-fosfato de

fosfatidilinositol (PI(4)P) y el transporte de proteína G del virus de la estomatitis vesicular a la membrana plasmática (Hausser et al., 2005).

La proteína cinasa D (PKD) se ha identificado como un regulador crucial del transporte secretor en la red trans-Golgi (TGN). El agrupamiento y activación de la PKD en la TGN están mediados por el lípido diacilglicerol (DAG), del que se genera un conjunto mediante la esfingomielina sintasa a partir de ceramida y fosfatidilcolina. La transferencia no vesicular de ceramida desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi está mediada por la proteína de transferencia lipídica CERT. Esto se describe, por ejemplo, en Hanada et al, 2003, *Nature* Vol 426, 803-809 y Hanada 2006, *Molecular and Cellular Biochemistry* 286, 23-31, así como en las solicitudes de patente correspondientes WO2005004898 y EP1652530. Sin embargo, en ninguno de estos documentos Hanada muestra o apunta hacia una implicación de la modulación de la expresión o actividad de CERT (aún menos otras proteínas del dominio START) en un método de producción de proteínas con fines de diagnóstico, investigación o terapéutico. Además, estos documentos/solicitudes de patente no describen en modo alguno el uso de un agente de bloqueo que reduzca o bloquee completamente la expresión o actividad de CERT en una composición farmacéutica. Hanada concluye más bien en utilizar la CERT misma como fármaco para promover el transporte de ceramida.

Sin embargo, la presente invención identifica a CERT como un sustrato novedoso de PKD *in vivo*. La fosforilación en la serina 132 por PKD reduce la afinidad de CERT hacia su diana lipídica 4-fosfato de fosfatidilinositol en las membranas de Golgi y reduce la actividad de transferencia de ceramida, identificando a PKD como un regulador de la homeostasis lipídica. La presente invención muestra también que la CERT es a su vez crítica para la activación de PKD y el transporte de carga dependiente de PKD a la membrana plasmática. La interdependencia de PKD y CERT es por tanto una clave para el mantenimiento de la integridad de la membrana de Golgi y del transporte secretor.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: ACUMULACIÓN DE PRODUCTO INTRACELULAR.

Aumento del producto intracelular durante fermentaciones semicontinuas mostrado para tres procesos. Se realizó la fermentación semicontinua utilizando tres clones de células productoras CHO diferentes que expresan anticuerpos IgG humanos: Proceso A (círculos), B (rombos) y M (triángulos), respectivamente). Cada dos días, se tomaron muestras de células, se fijaron y se sometieron a inmunofluorescencia directa para detectar la cadena ligera de anticuerpo. Se midió la cantidad de producto por FACS y se representó respecto a la cantidad el día 1.

FIGURA 2: FAMILIA PROTEICA DEL DOMINIO START

Grupo filogenético de (A) proteínas con dominio START humano, (B) su organización con dominios (4 TM, cuatro transmembrana; Pre, presecuencia mitocondrial; Tio, acil-CoA tioesterasa) y (C) sus homólogos en mosca y gusano. (tomado de (Soccio y Breslow, 2003))

FIGURA 3: CERT ES UN REGULADOR CRUCIAL DE LA FUNCIÓN DE GOLGI Y ACTÚA POR DELANTE DE XBP-1 EN LA RUTA SECRETORA.

(A) La CERT y la PKD están conectadas en un bucle de realimentación regulador. El esquema resume las hipótesis de trabajo actuales en las que la PKD se activa por DAG y fosforila la CERT. La CERT fosforilada se separa de PI(4)P y libera ceramida en su sitio de destino. La ceramida en Golgi se convierte en esfingomielina y DAG, que a su vez es necesario para la activación de PKD. Este circuito puede interrumpirse mediante la mutación del sitio de fosforilación de CERT (S132A).

(B) El dibujo esquemático muestra el camino de una proteína secretada desde la transcripción y traducción a través de los compartimentos de ER y Golgi a la membrana plasmática, donde la proteína se libera finalmente de la célula en el medio. Las flechas representan enfoques de ingeniería genética recientes que se dirigen a potenciar la producción de proteína. La mayoría de los esfuerzos se centraron en tecnologías de potenciación de la transcripción, unos pocos en ingeniería genética de la traducción y, actualmente, sólo se han reseñado tres ejemplos que se orientan a proteínas implicadas en el procesamiento post-traduccional en el ER (BiP, PDI y XBP-1). La CERT actúa por delante del ER en la ruta secretora, y por tanto a nuestro entender representa la primera diana para ingeniería genética en etapas tardías del proceso de secreción.

FIGURA 4: LA CERT SE DETECTA POR UN ANTICUERPO DE SUSTRATO DE PKD.

(A) Se transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión que codifican CERTL y CERT con etiqueta FLAG. Se lisaron las células 24 h después de la transfección y se inmunoprecipitaron las isoformas de CERT con anticuerpo anti-Flag. Se sometieron las proteínas inmunoprecipitadas a PAGE-SDS, seguido de inmunotransferencia con anticuerpo de sustrato de PKD (pMOTIF; panel superior) y, después de eliminar reactivos, con anticuerpo anti-Flag (panel inferior).

(B) Se transfectaron células HEK293T con el plásmido de expresión Flag-CERT, junto con GFP-PKD1 K612W (PKD-KD) o un vector vacío. Se analizó la CERT mediante transferencia Western como se describe en (A). Se verificó la expresión de PKD-KD mediante inmunotransferencia con un anticuerpo específico de PKD (C20; panel inferior).

(C) Se cotransfectaron células COS7 con plásmidos de expresión Flag-CERT y PKD1-GFP, se fijaron y se tiñeron con anticuerpo específico de Flag (rojo). Las imágenes mostradas son apilamientos de varias secciones confocales. Barra de escala, 20 μ m.

5 FIGURA 5: LA PKD FOSFORILA LA CERT EN LA SERINA 132.

(A) Alineamiento de las secuencias peptídicas utilizadas para crear el anticuerpo de sustrato de PKD y dos restos PKD potenciales en CERT.

10 (B) Se transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (WT), CERT-S132A y CERT-S272A con etiqueta Flag. Se lisaron las células, se inmunoprecipitaron las proteínas CERT y se analizaron mediante transferencia Western como se describe en la FIGURA 4.

15 (C) Se incubaron proteínas de fusión GST-Flag-CERT de tipo silvestre (WT) y S132A recombinantes en tampón cinasa que contenía [32P]- γ -ATP en ausencia (-) y presencia (+) de PKD1 purificada durante 30 min. Se separaron las proteínas mediante PAGE-SDS y se transfirieron a membrana. Se analizó la incorporación de fosfato radiactivo utilizando un PhosphorImager (arriba), seguido de inmunotransferencia con anticuerpo específico de Flag para verificar una carga igual de proteínas CERT.

20 (D) Se sometieron las proteínas CERT recombinantes a una cinasa *in vitro* con PKD1 purificada como se describe en (C) en presencia de ATP frío. Se realizó una inmunotransferencia con el anticuerpo pMOTIF y, después de eliminar reactivos, con anticuerpo específico de Flag para verificar la carga igual de proteínas CERT. Las proteínas PKD1 y CERT se marcan con flechas; las bandas con asteriscos son debidas a unión no específica.

FIGURA 6: LA FOSFORILACIÓN DE CERT EN LA SERINA 132 MODULA LA UNIÓN A PI(4)P Y LA ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA DE CERAMIDA.

25 Se transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (WT, SEC ID N° 10, 12) y CERT-S132A (SEC ID N° 14) con etiqueta GFP. Se recogieron las células mediante lisis hipotónica 24 horas después de la transfección y se recuperó la fracción citosólica después de centrifugación a 100.000xg.

30 Se utilizaron muestras que contenían iguales cantidades de fluorescencia GFP para (A) ensayos de superposición de proteína-lípido. Se incubó citosol de células HEK293T que expresan transitoriamente variantes de CERT con membranas punteadas con un gradiente de concentración de las diferentes fosfoinosítidas, y se detectaron las proteínas CERT unidas mediante su etiqueta GFP. (B) Se mezclaron liposomas donantes que contenían TNPPE y pireno-ceramida con un exceso de 10 veces de liposomas aceptores no marcados. Después de 60 s, se añadió citosol de células que expresan transitoriamente CERT de tipo silvestre (WT) o S132A con etiqueta GFP, o GFP solo (con) y se registró la fluorescencia de pireno a 395 nm (excitación: 340 nm). Se normalizaron los espectros a la fluorescencia máxima en Triton X-100 y a la fluorescencia máxima de GFP.

35

FIGURA 7: LA CERT REGULA LA ACTIVACIÓN Y EL TRANSPORTE SECRETOR DE PKD.

40 (A) Transferencia Western de lisados de células enteras a partir de células HEK293T transfectadas con CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10, 12) o con CERT mutante S132A (SEC ID N° 14) con etiqueta Flag. Se sondeó la transferencia con anticuerpo pS916 fosfoespecífico de PKD (panel superior), un anticuerpo específico de PKD (panel medio) y un anticuerpo específico de Flag (panel inferior), respectivamente, para verificar la expresión de constructos de CERT con etiqueta Flag.

45 (B) Medida de la actividad HRP en los sobrenadantes de células HEK293T cotransfectadas con Flag-ss-HRP y vector vacío (barras negras), cinasa PKD1-GFP inactivada (KD, barras blancas), Flag-CERT de tipo silvestre (WT, barras sombreadas) o Flag-CERT-S132A (gris oscuro). Se representaron las unidades lumínicas relativas (RLU) en los puntos temporales indicados después del cambio de medio. Los valores corresponden a la media de muestras por triplicado, barras de error = EEM.

50 (C) Inmunofluorescencia confocal de GFP-CERT (verde) y el marcador cis/medial de Golgi GS28 (rojo) en células COS7. Las imágenes mostradas son apilamientos de varias secciones confocales. Barra de escala, 20 μ m.

(D) Apilamientos de imágenes confocales que muestran la colocalización de GFP-CERT (verde) y HRP-Flag (rojo) en células COS7. Barra de escala, 20 μ m y 5 μ m (aumento).

55 FIGURA 8: LA REGULACIÓN NEGATIVA DE CERT POR ARN INTERFERENTES INHIBE EL TRANSPORTE SECRETOR.

60 (A) Detección cuantitativa de la actividad HRP en los sobrenadantes de células COS7 tratadas con oligonucleótidos ARNpi ficticios (blanco), de lacZ (gris claro = ARNpi específico de lacZ, SEC ID N° 9) o específicos de CERT (gris oscuro = CERTpi n° 1 SEC ID N° 7 y negro = CERTpi n° 2 SEC ID N° 8). Se muestran las unidades lumínicas relativas (RLU) de experimentos por triplicado, barras de error= EEM.

(B) Transferencia Western de lisados celulares de (A) sondeados con un anticuerpo anti-receptor de transferrina. Se confirmó una carga igual utilizando un anticuerpo específico anti-tubulina.

FIGURA 9: TÉRMINOS DE CONSENSO PARA EL DOMINIO START

Se da el consenso en relación con el número de proteínas que se ajustan a esta secuencia de consenso, y no en relación con el número de aminoácidos que se ajustan. Esto significa que para una secuencia de consenso al 80%, un 80% de las proteínas con dominio START comparadas tienen el aminoácido dado en una posición particular, por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico abreviado con "h".

Esta secuencia de consenso se generó utilizando el programa basado en la WEB "SMART" (véase también Ponting y Aravind, 1999, TIBS 24, páginas 130 – 132).

(A) Secuencia de consenso al 80% (SEC ID N° 28) para las proteínas con dominio START.

(B) La secuencia de consenso de START se ha derivado de un alineamiento aminoacídico de proteínas con dominio START. El alineamiento incluye secuencias de consenso al 50%, 65% y 80%.

Véase el siguiente agrupamiento aminoacídico como ayuda sobre las abreviaturas y las clases correspondientes.

Clave de clase de restos

15	alcohol o	S,T
	alifático l	I,L,V
	cualquiera.	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	aromático a	F,H,W,Y
	cargado c	D,E,H,K,R
20	hidrofóbico h	A,C,F,G,H,I,K,L,M,R,T,V,W,Y
	negativo -	D,E
	polar p	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T
	positivo +	H,K,R
	pequeño s	A,C,D,G,N,P,S,T,V
25	diminuto u	A,G,S
	giro t	A,C,D,E,G,H,K,N,Q,R,S,T

FIGURA 10: LA INTRODUCCIÓN DE CERT AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL

30 Se introdujeron establemente constructos de expresión para CERT ficticia, CERT-WT o el mutante CERT-SA en una estirpe celular de producción CHO que secreta un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG. Se midió después el efecto de los transgenes sobre la productividad específica de IgG en estos clones estables (A) en cultivos madre en serie y (B) en condiciones de producción semicontinua como en la FIGURA 11, con n= 3-4 para cada genotipo. Las barras de error indican errores estándar. Se muestra un resultado representativo resultante de tres experimentos independientes.

FIGURA 11: LA CERT HETERÓLOGA AUMENTA LA SECRECIÓN DE HSA

40 (A) Título y productividad específica aumentados en cultivos en serie. Se transfectaron establemente células CHO secretoras de seroalbúmina humana (HSA) con un plásmido vacío ("ficticio"), CERT de tipo silvestre (CERT-WT) o el mutante de CERT S132A (CERT-SA). A partir de los conjuntos de células estables resultantes (n=3 por genotipo), se determinó el título de HSA durante 3-5 pasadas en serie. Se calcularon la productividad específica para HSA (barras negras) y el título (barras grises) para cada genotipo y se representaron como valores medios de los tres conjuntos. Las barras de error representan errores estándar.

45 (B) y (C) Se hicieron crecer las células de (A) en matraces agitados durante 7 días y se alimentaron cada 24 horas a partir del día 3. Se tomaron muestras del fluido de cultivo celular los días 3, 5 y 7 y se sometieron a la medida del título del producto de HSA recombinante. Se calcularon las productividades específicas (B) y el título (C), y se representaron frente al tiempo de fermentación. Se compararon las siguientes células: células ficticias (-□-), CERT-WT (-▲-) y CERT-SA (-●-); las barras de error representan los errores estándar de tres conjuntos estables por genotipo.

LEYENDAS PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 SEQ ID NO 1: cebador de PCR para ADN de CERT-S132A humana
- SEQ ID NO 2: cebador de PCR para ADN de CERT-S132Arev humana
- SEQ ID NO 3: cebador de PCR para ADN de CERT-S272A humana
- SEQ ID NO 4: cebador de PCR para ADN de CERT-S132Arev humana
- SEQ ID NO 5: cebador de PCR para ADN de CERT-S138truncation
- SEQ ID NO 6: cebador de PCR para ADN de CERT-S138truncationrev
- 60 SEQ ID NO 7: ARN_{pi}/ADN de CERT_{pi}-1
- SEQ ID NO 8: ARN_{pi}/ADN de CERT_{pi}-2
- SEQ ID NO 9: ARN_{pi}/ADN de LacZ_{pi}
- SEQ ID NO 10: humano: ADN_c de CERT
- SEQ ID NO 11: humano: proteína CERT
- 65 SEQ ID NO 12: humano: ADN_c de CERT L
- SEQ ID NO 13: humano: proteína CERT L

- SEQ ID NO 14: humano: ADNc de CERT S132A
 SEQ ID NO 15: humano: proteína CERT S132A
 SEQ ID NO 16: humano: ADNc con dominio START de CERT
 SEQ ID NO 17: humano: proteína con dominio START de CERT
 5 SEQ ID NO 18: humano: ADNc con dominio START de CERT L
 SEQ ID NO 19: humano: proteína con dominio START de CERT L
 SEQ ID NO 20: humano: ADNc de StarD4
 SEQ ID NO 21: humano: proteína StarD4
 SEQ ID NO 22: humano: ADNc de StarD5
 10 SEQ ID NO 23: humano: proteína StarD5
 SEQ ID NO 24: humano: ADNc de StarD6
 SEQ ID NO 25: humano: proteína StarD6
 SEQ ID NO 26: humano: ADNc de PCTP
 SEQ ID NO 27: humano: proteína PCTP
 15 SEQ ID NO 28: secuencia consenso del dominio START (Figura 9)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La modificación post-traducciona de proteínas mediante fosforilación es un mecanismo común para inducir cambios conformacionales que modulan la actividad enzimática, median las interacciones proteína-proteína o regulan la localización subcelular. La PKD es un regulador clave en el complejo de Golgi, siendo PI4KIII β el único sustrato local identificado hasta ahora. Para ensayar si la proteína CERT localizada en el complejo de Golgi puede servir como sustrato para la PKD, se hizo uso de un anticuerpo fosfoespecífico de sustrato denominado pMOTIF, creado contra restos de consenso fosforilados por PKD (Doppler et al., 2005). Se transfectaron células HEK293T con los vectores de expresión que codifican CERT y CERT_L con etiqueta Flag. Se inmunoprecipitaron las isoformas de CERT con anticuerpos específicos de Flag y se analizaron mediante transferencia Western con el anticuerpo pMOTIF (FIGURA 4A). Se detectó una señal de pMOTIF correspondiente al peso molecular de CERT y, más débilmente, al de CERT_L (FIGURA 4A). La detección más débil de la isoforma CERT_L fosforilada puede estar relacionada con su conocido comportamiento de formar agregados, que puede repercutir sobre la accesibilidad a fosfotios de las cinasas (Raya et al., 2000). Para investigar si el reconocimiento de CERT por el anticuerpo pMOTIF dependía de PKD, se expresó CERT junto con una variante cinasa inactivada de PKD1 (K621W) en células HEK293T. Se ha mostrado que este mutante se localiza en el complejo de Golgi y suprimía la fosforilación de PI4KIII β de manera dominante negativa (Hausser et al., 2005). La coexpresión de PKD inactiva anuló la detección de CERT con el anticuerpo pMOTIF, sugiriendo que la señal pMOTIF era debida de hecho a la fosforilación de CERT mediada por PKD (FIGURA 4B). Se cree que las proteínas de transferencia de lípido actúan en el MCS, que se forma entre el ER y la TGN (Levine and Loewen, 2006), donde se localiza la PKD. La tinción con inmunofluorescencia de CERT con etiqueta Flag en células COS7 coexpresadas con PKD1 con etiqueta GFP verificó que las dos proteínas se colocan en el complejo de Golgi (FIGURA 4C). Los experimentos con ARN interferentes sugieren que era necesaria la supresión génica simultánea de PKD1 y PKD2 para reducir la fosforilación de CERT, indicando que estas dos isoformas eran principalmente responsables de fosforilar la CERT, mientras que la PKD3 parecía desempeñar un papel menor (datos no mostrados) Esto está de acuerdo con las especificidades de sustrato superpuestas anteriormente reseñadas de PKD1 y PKD2. Por ejemplo, se mostró que ambas PKD1 y PKD2 fosforilaban PI4KIII β , mientras que PKD3 no consiguió hacerlo (Hausser et al., 2005).

Para identificar los sitios de reconocimiento de pMOTIF en CERT, se buscaron restos de consenso de PKD potenciales caracterizados por un resto de leucina, isoleucina o valina en la posición -5 y arginina en la -3 con respecto a una serina o treonina. Se intercambiaron por alaninas dos serinas en las posiciones 132 y 272, coincidentes con el resto de consenso de PKD y conservadas entre especies (FIGURA 5A), mediante mutagénesis dirigida a sitio. Se expresaron estos mutantes en células HEK293T y se ensayó el reconocimiento por el anticuerpo pMOTIF. De forma interesante, la mutación de la serina 132 a alanina anuló la detección de CERT con el anticuerpo pMOTIF y causó un aumento de la movilidad electroforética indicativo de pérdida de fosforilación, mientras que la mutación S272A no afectó a la señal pMOTIF (FIGURA 5B). Esto sugería que la serina 132 es un sitio de fosforilación de PKD reconocido específicamente por el anticuerpo de sustrato de PKD. Para confirmar que la PKD era capaz de fosforilar directamente este resto de serina en la CERT, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* con PKD1 purificada y proteínas de fusión CERT GST recombinantes producidas en *E. coli* que comprendían los primeros 138 aminoácidos de la proteína. Cuando se incubó la proteína de fusión de CERT de tipo silvestre truncada con PKD1 en presencia de [γ -³²P]-ATP, se detectó la incorporación de radiactividad (FIGURA 5C). Esto se alteró significativamente en el caso de la proteína de fusión CERT-S132A. Se muestra adicionalmente que la fosforilación *in vitro* de PKD de tipo silvestre pero no de CERT-S132A genera un sitio de reconocimiento para el anticuerpo pMOTIF (FIGURA 5D). Tomados en conjunto, estos resultados prueban que la CERT es un sustrato genuino de PKD *in vitro* e *in vivo* e identifica la serina 132 como un sitio de fosforilación específico de PKD en CERT.

La serina 132 está en muy estrecha proximidad con el dominio PH de CERT (aminoácidos 23 - 117), haciendo posible que la fosforilación en este sitio afecte a la unión a PI(4)P aumentando la carga negativa local. Por lo tanto, se cuantificó la unión a PI(4)P de CERT de tipo silvestre y el mutante CERT-S132A realizando ensayos de superposición de proteína-lípido. En estos, se incubó citosol de células HEK293T que expresan transitoriamente las

variantes con membranas punteadas con un gradiente de concentración de las diferentes fosfoinositidas y se detectaron las proteínas CERT unidas mediante su etiqueta GFP. Como se reseñó anteriormente, la proteína completa de tipo silvestre demostró una unión débil a varias especies de fosfolípido, pero exhibió una interacción fuerte con PI(4)P (Hanada et al., 2003; Levine y Munro, 2002). La unión de CERT-S132A a PI(4)P era detectable a concentraciones dos a cuatro veces menores en comparación con la de proteína de tipo silvestre, sugiriendo una afinidad aumentada del mutante CERT-S132A por este fosfolípido (FIGURA 6A). Conjuntamente, estos datos implican que la CERT, una vez unida al complejo de Golgi, se fosforila por la PKD. Esto reduce entonces la afinidad de CERT por PI(4)P y regula así la interacción de CERT con membranas de Golgi.

Se ha mostrado que la proteína CERT funciona como una proteína de transferencia de lípido (Hanada et al., 2003). Por tanto, se ha investigado si la fosforilación de CERT en la serina 132 influye en su capacidad de unirse a y transferir ceramida entre membranas. Con este fin, se expresaron transitoriamente versiones con etiqueta GFP de CERT de tipo silvestre y CERT-S132A en células HEK239T, y se analizó en la fracción citosólica la actividad de transferencia de lípido específica de ceramida utilizando un ensayo basado en FRET (FIGURA 6B). En este ensayo, se emplearon vesículas unilamelares pequeñas que contenían ceramida marcada con pireno como donante fluorescente y cantidades inactivantes de TNP-PE marcada en el grupo de cabeza (Olayioye et al., 2005; Somerharju, 2002). Cuando se mezclaron estos liposomas donantes con un exceso de liposomas aceptores no marcados, el aumento de la fluorescencia del pireno fue despreciable, indicando una transferencia de ceramida espontánea mínima a membranasceptoras (datos no mostrados). Tras la adición de citosol que contiene CERT de tipo silvestre, se observó un aumento constante de fluorescencia, que no se observó cuando se utilizó citosol de control de células transfectadas con vector (FIGURA 6B). Comparada con la proteína de tipo silvestre, la CERT-S132A exhibió una mayor velocidad de transferencia de lípido, evidente por un más rápido aumento en la fluorescencia del pireno (FIGURA 6B). Esto sugiere que la fosforilación de CERT en la serina 132 regula negativamente la actividad de transferencia de ceramida reduciendo la asociación de la proteína con membranas. Los datos anteriores han mostrado ya que la PKD regula el nivel de PI(4)P en el complejo de Golgi mediante activación mediada por fosforilación de PI4KIII β (Hausser et al., 2005). De forma interesante, la PI4KIII β es crítica para el transporte de ceramida entre el ER y el complejo de Golgi (Toth et al., 2006). En consecuencia, junto con los datos presentados aquí, resulta evidente un papel dual de la PKD en el mantenimiento de la homeostasis lipídica de membranas de Golgi mediante el control de la asociación (mediante los niveles de PI(4)P) y la disociación (mediante la fosforilación directa) de CERT.

La transferencia de ceramida de ER a TGN es esencial para la síntesis de SM en este compartimento (Hanada et al., 2003). La SM sintasa 1 (SMS1) localizada en Golgi utiliza ceramida y PC para generar SM y DAG (Perry y Ridgway, 2005), siendo este último un prerrequisito para el agrupamiento y activación de PKD (Baron y Malhotra, 2002). Los compuestos que bloquean la producción de DAG en la TGN inhiben la unión de PKD a membranas de la TGN e interfieren con el transporte secretor (Baron y Malhotra, 2002). Por lo tanto, una transferencia aumentada de ceramida de ER a TGN mediante la sobreexpresión de CERT debería dar como resultado un conjunto de DAG local elevado, y puede estimular en consecuencia la actividad PKD y el transporte secretor. Para ensayar esta hipótesis, se expresaron transitoriamente CERT de tipo silvestre y CERT-S132A en células HEK293T y se analizó la autofosforilación de PKD endógena. Comparado con el control, la expresión tanto de CERT de tipo silvestre como de CERT-S132A aumentó la actividad PKD, como se revela mediante análisis con un anticuerpo fosfoespecífico de PKD (FIGURA 7A). Esto muestra que la activación de PKD está regulada por proteínas CERT, probablemente debido a un suministro de ceramida aumentado y una síntesis de SM/DAG reforzada. Se ha descrito recientemente una función similar para la proteína de transferencia de lípido Nir2 en el mantenimiento de los niveles de DAG en el aparato de Golgi mediante la regulación de la ruta de la CDP-colina (Litvak et al., 2005). La supresión génica de Nir2 mediada por ARNi redujo los niveles de DAG y PKD en el complejo de Golgi y bloqueó el transporte secretor. De forma interesante, este efecto podía recuperarse mediante la adición de ceramida C₆ exógena (Litvak et al., 2005), indicando un papel crítico de la ceramida en la síntesis de DAG y el agrupamiento de PKD en el complejo de Golgi.

Para enfrentarse a la pregunta de si la activación de PKD mediada por CERT se traduce realmente en un transporte secretor potenciado, se hizo uso de un plásmido que codifica peroxidasa de rábano picante fusionada con una secuencia señal (ss). Puede utilizarse la proteína de fusión ss-HRP como indicador de la secreción de proteína constitutiva (Bard et al., 2006). En células de control, podía detectarse la secreción de ss-HRP al cabo de 1 hora y aumentaba con el tiempo (FIGURA 7B). La coexpresión de cinasa PKD1 inactivada, que inhibe el transporte secretor de proteínas de carga (Hausser et al., 2005; Liljedahl et al., 2001), anuló casi completamente la secreción de ss-HRP en el sobrenadante. Esto confirmó que la HRP se secretaba de manera dependiente de PKD en este ensayo. La coexpresión de CERT de tipo silvestre y CERT-S132A aumentó en gran medida la cantidad de HRP secretada (FIGURA 7B). De forma interesante, sólo se pudo detectar un ligero aumento de la secreción con el mutante CERT-S132A, comparado con el observado con la proteína CERT de tipo silvestre. Esto está de acuerdo con la activación comparable de PKD por CERT y CERT-S132A (FIGURA 7A), pero era inesperado a la vista de la actividad de transferencia de lípido *in vitro* significativamente potenciada del mutante de CERT (FIGURA 6B). Sin embargo, niveles elevados de ceramida pueden no traducirse necesariamente en aumentos equivalentes de DAG, porque la síntesis de DAG podría estar limitada por la disponibilidad de PC y la actividad de la SM sintasa. La acumulación de ceramida es conocida por afectar a la estabilidad de la membrana de Golgi e induce la fisión de vesícula (Fukunaga et al., 2000; Weigert et al., 1999). Por lo tanto, se investigó si la sobreexpresión del mutante CERT-S132A afectaba a su localización y/o causaba cambios morfológicos en el aparato de Golgi. Se ha demostrado que la CERT se

colocaliza con el marcador GS28 cis/medial de Golgi (Hanada et al., 2003). Los análisis de inmunofluorescencia de CERT con etiqueta GFP expresada en células COS7 mostraron que la proteína se localizaba en regiones Golgi positivas de GS28 (FIGURA 7C). En contraposición, además de la colocalización parcial con GS28 en el complejo de Golgi, la proteína mutante CERT-S132A exhibía una tinción dispersa puntual. Ha de observarse que se ha encontrado que algunas de estas estructuras vesiculares contenían la proteína de carga ss-HRP, proporcionando pruebas de que estas estructuras representan realmente vehículos de transporte derivados de Golgi (FIGURA 7D). Este descubrimiento está de acuerdo con los cambios observados en la estructura de la membrana de Golgi debidos a aumentos locales de los niveles de ceramida (Fukunaga et al., 2000; Weigert et al., 1999).

En conclusión, se ha identificado a CERT como un sustrato de PKD y se proporcionan pruebas de una relación novedosa entre la biogénesis de lípido de membrana y la secreción de proteína. Se muestra que la CERT desempeña un papel importante en procesos de transporte vesicular al proporcionar ceramida como sustrato para la síntesis del activador de PKD DAG en membranas de Golgi. Se demuestra adicionalmente que el sistema está estrechamente regulado por un bucle de realimentación negativa: La PKD activa fosforila la CERT en la serina 132, reduciendo así la afinidad de la CERT hacia su diana lipídica PI(4)P, asegurando series continuas de transferencia lipídica desde el ER al compartimento de Golgi.

Los datos de la presente invención demuestran claramente que la sobreexpresión de CERT potencia la secreción de proteína. Para investigar si también es cierto lo contrario, lo que significa que una expresión reducida de CERT daría como resultado una secreción reducida, se realizaron experimentos con ARNpi. Se detectó la actividad de HRP 3 horas después y mostró niveles comparablemente iguales en ambas células de control. En contraposición, se midió una reducción drástica de la actividad de HRP en células que se habían tratado con cualquiera de los oligonucleótidos de ARNpi específicos de CERT (FIGURA 8). Esto indica que niveles reducidos de CERT conducen a una secreción reducida de HRP de las células y además subraya el importante papel de la CERT en el transporte secretor.

De forma interesante, no sólo la secreción de proteína, sino también la abundancia de la proteína transmembrana receptor de transferrina se afectó por la reducción de CERT (FIGURA 8B). Cuando se agruparon las células de la FIGURA 8A y se sondearon los lisados con anticuerpos específicos de receptor de transferrina en experimentos de transferencia Western, resultó evidente una fuerte reducción de la cantidad de receptor de transferrina, mientras que se detectaron niveles de receptor de transferrina similares en ambas células de control.

Este descubrimiento sugiere que la proteína de transferencia de lípido CERT no sólo está implicada en el transporte de proteínas secretadas sino también en el de proteínas de superficie celular presentes en la membrana. Esto no debería ser sorprendente, ya que ambos tipos de proteínas se transportan igualmente en vesículas lipídicas desde el ER a través de Golgi hasta la membrana plasmática, y por tanto utilizan las mismas rutas de salida celular que, como se demuestra en la presente invención por vez primera, están influidas por la CERT.

Los descubrimientos y el nuevo modelo resultante para la regulación del transporte de proteína secretora desde el complejo de Golgi a la membrana plasmática descritos en la presente invención pueden aplicarse a la fabricación de proteína biofarmacéutica. La sobreexpresión de CERT aumenta la producción de proteína biofarmacéutica de diversas proteínas tales como anticuerpos, citocinas, factores de crecimiento tales como eritropoyetina o insulina, receptores de superficie tales como factor de crecimiento epitelial y proteasas unidas a membrana.

Aunque el método descrito en esta invención puede aplicarse en general a todos los procesos de producción de proteína, el grado de éxito de esta estrategia medido por el aumento de la cantidad de proteína producida puede depender ciertamente de la naturaleza particular de la proteína de interés. Se transfectan células CHO u otras células productoras con un constructo de expresión que codifica una proteína con dominio START tal como CERT, StarD4 o StarD5 o un mutante o derivado de la misma.

Destacadamente, se detectan los títulos mayores en células que expresan el mutante de CERT no fosforilable S132A. La expresión heteróloga de CERT, y especialmente de CERT mutante, en células CHO puede potenciar la secreción de proteína, por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal, a nivel de transfección transitoria. Esto puede ser particularmente útil para la producción rápida de cantidades menores de candidatos a fármaco o dianas de fármaco necesarias en la investigación y desarrollo farmacéuticos.

En una realización adicional de esta invención, se transfecta una estirpe celular productora con los mismos constructos de ADN que anteriormente y posteriormente se someten a selección para obtener conjuntos celulares estables. Durante seis pasadas de cultivo celular posteriores al procedimiento de selección, se recoge el sobrenadante de cultivo para analizar el contenido de proteína de interés. En el caso de un anticuerpo monoclonal, se determina la concentración de producto proteico por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. De nuevo, los valores mayores se observan en los conjuntos celulares que albergan el mutante de CERT. En células que contienen un dominio STAR, la expresión del constructo de la proteína de interés está significativamente potenciada comparada con células ficticias o no transfectadas. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de proteínas con dominio START conduce a una expresión

potenciada de anticuerpos, proteínas unicelulares y receptores de superficie en estirpes celulares CHO transfectadas transitoria así como establemente, indicando que las proteínas con dominio START tales como CERT o StarD4 y StarD5 son capaces de potenciar la capacidad de producción específica de las células en condiciones de fermentación.

DEFINICIONES

Las realizaciones generales "comprende" o "comprendido" abarcan la realización más específica "consistente en". Además, las formas singular y plural no se utilizan de modo limitante.

Los términos utilizados en el transcurso de la presente invención tienen el siguiente significado.

El término "dominio START" representa el dominio de transferencia de lípido (START) relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). Este dominio de aproximadamente 200-210 aminoácidos se identificó inicialmente como dominio de unión a lípido (Soccio y Breslow, 2003; Tsujishita y Hurley, 2000). La longitud del dominio START puede variar entre 116 a 250 aminoácidos, o entre 180 a 223 aminoácidos, o más específicamente entre 219 a 223 aminoácidos, dependiendo del miembro de la familia del dominio START. El rasgo más destacable de la estructura del dominio START es un túnel predominantemente hidrofóbico que se extiende casi por toda la longitud de la proteína, que se utiliza para unir una sola molécula de compuestos lipofílicos grandes como colesterol. La resolución estructural del miembro de la familia del dominio START MLN64-START reveló una estructura de tipo α/β consistente en láminas antiparalelas plegadas de nueve cadenas β y cuatro hélices α (Tsujishita y Hurley, 2000). El dominio encontrado en diversas proteínas eucarióticas se designa como "dominio START clásico" (CSD), mientras que un dominio similar específico de plantas es conocido como dominio START de alergeno de abedul (BA-START).

El término "CERT" comprende ambas formas cortadas y empalmadas de CERT: CERT (SEC ID N° 11) y CERT_L (SEC ID N° 13). El término "CERT" comprende adicionalmente cualquier otra forma cortada y empalmada posible de CERT derivada de la secuencia nucleotídica SEC ID N° 12.

El término "CERT" comprende adicionalmente la proteína hCERT y sus recombinantes, hCERT, hCERTA, proteína PH, proteína hCERT A MR, y proteína hCERTA ST, y adicionalmente proteína PHhCERT, proteína MRhCERT y proteína SThCERT (véase también el documento EP1652530, (Hanada, 2006), (Hanada et al., 2003)).

El término "derivado" incluye en general secuencias adecuadas para realizar el uso pretendido de la presente invención, lo que significa que las secuencias median el aumento del transporte secretor en una célula.

El término "derivado" como se utiliza en la presente invención significa una molécula polipeptídica o una molécula de ácido nucleico que es al menos un 70% idéntica en secuencia a la secuencia original o su secuencia complementaria. Preferiblemente, la molécula polipeptídica o molécula de ácido nucleico es al menos un 80% idéntica en secuencia a la secuencia original o su secuencia complementaria. Más preferiblemente, la molécula polipeptídica o molécula de ácido nucleico es al menos un 90% idéntica en secuencia a la secuencia original o su secuencia complementaria. Lo más preferido es una molécula polipeptídica o una molécula de ácido nucleico que sea al menos un 95% idéntica en secuencia a la secuencia original o su secuencia complementaria y exhiba el mismo efecto sobre la secreción o similar que la secuencia original.

Las diferencias de secuencia pueden basarse en diferencias en secuencias homólogas de diferentes organismos. Podrían basarse también en la modificación orientada de secuencias mediante sustitución, inserción o delección de uno o más nucleótidos o aminoácidos, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 ó 10. Los mutantes de delección, inserción o sustitución pueden generarse utilizando mutagénesis específica de sitio y/o técnicas de mutagénesis basadas en PCR. Se describen los métodos correspondientes por (Lottspeich y Zorbas, 1998) en el capítulo 36.1 con referencias adicionales.

La identidad de secuencia de una secuencia de referencia (siendo en la presente invención, por ejemplo, el dominio START de SEC ID N° 16, 17 ó 18, 19) puede determinarse utilizando, por ejemplo, algoritmos de "alineamiento" estándar, por ejemplo, "BLAST" ((Altschul et al., 1990); (Madden et al., 1996); (Zhang y Madden, 1997)). Se alinean las secuencias cuando coinciden en su secuencia y son identificables con la ayuda de los algoritmos de "alineamiento" estándar.

Además, en la presente invención el término "derivado" significa una molécula de ácido nucleico (mono- o bicatenaria) que hibrida con las (SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26) o con fragmentos o derivados de las mismas o con secuencias que son complementarias de las SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26. Preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones estrictas de hibridación y lavado (por ejemplo, hibridación a 65°C en un tampón que contiene 5x SSC; lavado a 42°C utilizando 0,2x SSC/0,1% de SDS). Se describen ejemplarmente las correspondientes técnicas en (Ausubel et al., 2002).

El término "derivados" significa adicionalmente mutantes de delección de proteína, mutantes de fosforilación, especialmente en una posición de serina, treonina o tirosina, la delección de un sitio de unión de PKD o la mutación Ser132A de CERT.

El término "actividad" describe y cuantifica las funciones biológicas de la proteína dentro de la célula o en ensayos *in vitro*.

Se describe un ejemplo de cómo medir la "actividad" en la solicitud de patente EP1652530 (Hanada et al.), que detecta la actividad de promoción de la liberación de ceramida de membranas. La membrana lipídica que contiene ceramida tiene que prepararse de modo que contenga 12,5 nCi (225 pmol) por muestra de [palmitoil-1-[4C]-N-palmitoil-D-etioesfingosina (de aquí en adelante puede designarse como ceramida I4C) basándose en un lípido mixto consistente en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a una relación de 4:1 derivado de yema de huevo. Por tanto, su concentración de ceramida es de 2,5 mg/ml. Para una muestra de la medida de actividad, se requiere esta membrana lipídica a una cantidad de 20 pl. Después de dispensar la cantidad de lípido necesaria para la medida de la actividad en un tubo Eppendorf, ha de secarse pulverizando gas nitrógeno. Después de esto, ha de añadirse el tampón 1 [Hepes-NaOH 20 mM (pH 7,4) al que se han añadido NaCl 50 mM y EDTA 1 mM] a la membrana lipídica secada, de modo que la concentración se vuelve de 2,5 mg/ml. Ha de realizarse un tratamiento supersónico suave utilizando un generador supersónico de tipo baño [modelo 221 0 fabricado por Branson, Co., Ltd.]. El tratamiento supersónico ha de realizarse a 25°C durante 3 minutos. La muestra ha de mezclarse después (en vórtex) durante 30 segundos y después se repite el tratamiento supersónico durante 3 minutos. Se utiliza la membrana lipídica preparada de este modo en un ensayo de liberación de ceramida. Se realiza la reacción de liberación de ceramida de la membrana lipídica y su detección del modo siguiente: Se mezcla proteína CERT o una proteína recombinante de la misma (en condiciones estándar, la cantidad de proteína correspondiente a 450 picomoles, que es 2 veces la cantidad equivalente molar de la ceramida contenida en la membrana donante que se utilizó) hasta 30 pl utilizando tampón 2 [tampón Hepes-NaOH 50 mM (pH 7,4) al que se han añadido NaCl 100 mM y EDTA 0,5 mM]. Entonces, se inicia la reacción añadiendo 20 pl de membrana lipídica que contiene ceramida. La concentración final de fosfolípidos es de 1 mg/ml. La ceramida está contenida a una relación de aproximadamente 0,3% comparada con la cantidad de fosfolípido total. Después de haber incubado la mezcla de estos a 37°C durante 30 minutos, se centrifuga a 50.000 xg durante 30 minutos y se precipita la membrana lipídica. En el caso de utilizar la proteína CERT de *E. coli*, la mayoría de la proteína permanece en el sobrenadante en estas condiciones de centrifugación. Por lo tanto, cuando la ceramida I4C se une a la proteína CERT, se libera de la membrana lipídica y se transfiere a la fracción sobrenadante. Se calcula la actividad de promoción de la liberación de ceramida con CERT midiendo la actividad radiactiva al 1% en la fracción sobrenadante utilizando un contador de centelleo líquido.

Es una posibilidad adicional de medir la "actividad" un ensayo de transferencia de ceramida *in vitro* que utiliza material recombinante o lisado celular que contiene CERT. De este modo, la transferencia mediada por proteína de ceramida entre SUV se mide como se ha descrito anteriormente (Olayioye et al., 2005). La mezcla de ensayo de transferencia contenía vesículas donantes (2 nmol de lípido/ml) compuestas por lípidos cerebrales porcinos (Avanti Polar Lipids), ceramida C₁₆-marcada con pireno y 2,4,6-trinitrofenilfosfatidiletanolamina (TNP-PE) (88,6:0,4:11% en moles), proporcionada por P. Somerharju, y un exceso de 10 veces de vesículas aceptoras compuestas por lípidos cerebrales porcinos. Se registra la intensidad de fluorescencia a 395 nm (excitación 345 nm; anchuras de rendija, 4 nm) antes y después de la adición de 75 µg de citosol de células HEK293T que expresan transitoriamente proteínas CERT de tipo silvestre y S132A con etiqueta GFP (véase anteriormente). Se normalizan las intensidades de fluorescencia a (i) la intensidad máxima obtenida después de la adición de Triton X-100 (0,5% de concentración final) y (ii) la fluorescencia máxima de GFP, para dar cuenta de los diferentes niveles de expresión de proteína.

Es otra posibilidad de medir la "actividad" un análisis del estado de fosforilación de CERT S132A, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-fosfoespecífico en una transferencia Western. Se obtienen extractos de células enteras solubilizando células en tampón de extracción NP40 (NEB) [Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 1% de NP40, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM y glicerofosfatoβ 20 mM más inhibidores de proteasa Complete]. Se clarifican los lisados mediante centrifugación a 16.000 x g durante 10 min. Se hierven extractos de célula entera o proteínas inmunoprecipitadas en tampón de muestra y se someten a PAGE-SDS. Se transfieren las proteínas a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Roth). Después de bloquear con reactivo de bloqueo al 0,5% (Roche) en PBS que contiene 0,1% de Tween 20, se sondan los filtros con un anticuerpo fosfoespecífico tal como un anticuerpo de sustrato fosfoespecífico, denominado pMOTIF, creado contra restos de consenso fosforilados por PKD (Doppler et al., 2005). Se visualizan las proteínas con anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia potenciada (Pierce).

Es aún otro ensayo para medir la "actividad" un ensayo de secreción, por ejemplo, para una proteína modelo, un anticuerpo o una proteína de interés. Se cotransfectan células con plásmido ss-HRP-Flag y vector vacío, pEGFP-N1-PKD1KD y un plásmido que codifica CERT, una variante CERT o cualquier proteína de la familia de START a una relación de 1: 6,5, respectivamente. Se lavan las células 24 h después de la transfección con medio exento de suero y se cuantifica la secreción de HRP después de 0, 1, 3 y 6 h mediante incubación del sobrenadante celular clarificado con reactivo ECL. Se hacen las medidas con un luminómetro (Lucy2, Anthos) a 450 nm.

Otro modo de medir la "actividad" es utilizando un análogo de ceramida fluorescente, por ejemplo, una ceramida C5 marcada con Bodipy, realizando experimentos de búsqueda en células intactas y midiendo la acumulación de proteína en el complejo de Golgi.

Cuantificación de la distribución de ceramida C5 BODIPY® FL entre Golgi y el ER:

Se cuantificó el transporte de la ceramida fluorescente después de la adquisición utilizando la función linescan del software Metamorph. Se trazó una línea a través de las células en las fotos confocales tomadas en diferentes puntos temporales y se midió la intensidad fluorescente en el citoplasma y por el complejo de Golgi de las células. Se calculó la "relación de captación" a partir de la intensidad de luz fluorescente en Golgi dividida entre la intensidad medida en el citoplasma. Se midió la máxima relación de captación en células de control después de 25 minutos de incubación a 37°C, y se tomó este valor como 100%. Se realizó la cuantificación a partir de los datos de tres

experimentos independientes en los que se tomaron fotos confocales en doce diferentes puntos temporales y en cada punto se analizaron 7 células.

El término "productividad" o "productividad específica" describe la cantidad de una proteína específica que se produce por un número definido de células durante un tiempo definido. La productividad específica es por lo tanto una medida cuantitativa de la capacidad de las células de expresar/sintetizar/producir una proteína de interés. En el contexto de la fabricación industrial, la productividad específica se expresa habitualmente como la cantidad de proteína en picogramos producida por célula y por día ('pg/célula*día' o 'pcd').

Es un método para determinar la "productividad específica" de una proteína secretada medir cuantitativamente la cantidad de proteína de interés secretada en el medio de cultivo mediante ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA). Con este fin, se siembran células en medio de cultivo reciente a densidades definidas. Después de un tiempo definido, por ejemplo, después de 24, 48 ó 72 horas, se toma una muestra de fluido de cultivo celular y se somete a medida de ELISA para determinar el título de la proteína de interés. La productividad específica puede determinarse dividiendo el título entre el número medio de células y el tiempo.

Se proporciona otro ejemplo de cómo medir la "productividad específica" de células mediante el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF®).

La "productividad" de células para una proteína intracelular asociada a membrana o transmembrana puede detectarse y cuantificarse también mediante transferencia Western. Se lavan en primer lugar las células y se lisan posteriormente en un tampón que contiene detergentes tales como Triton-X, NP-40 o SDS o altas concentraciones de sal. Se separan después las proteínas del lisado celular por tamaño en PAGE-SDS y se transfieren a una membrana de nailon, donde se detecta posteriormente la proteína de interés y se visualiza utilizando anticuerpos específicos.

Es otro método para determinar la "productividad específica" de una célula detectar inmunológicamente la proteína de interés mediante anticuerpos marcados fluorescentes creados contra la proteína de interés y cuantificar la señal fluorescente en un citómetro de flujo. En el caso de una proteína intracelular, se fijan en primer lugar las células, por ejemplo, en tampón de paraformaldehído, y después se permeabilizan para permitir la penetración del anticuerpo de detección en la célula. Las proteínas de superficie celular pueden cuantificarse en la célula viva sin necesidad de fijación o permeabilización previas.

La "productividad" de una célula puede determinarse además indirectamente midiendo la expresión de un gen indicador tal como la proteína fluorescente verde (GFP), que se expresa en forma de una proteína de fusión con la proteína de interés o a partir del mismo ARNm en forma de la proteína de interés como parte de una unidad de expresión doble, triple o múltiple.

El término "potenciamiento/aumento de la productividad" comprende métodos para aumentar/potenciar la productividad específica de células. Se aumenta o potencia la productividad específica si la productividad es mayor en las células bajo investigación en comparación con las células de control respectivas, y si esta diferencia es estadísticamente significativa. Las células bajo investigación pueden ser poblaciones heterogéneas o estirpes celulares clonales de células tratadas, transfectadas o modificadas genéticamente; células no tratadas, no transfectadas o no modificadas pueden servir como células de control.

Los términos "inhibidor" o "supresor" como se utilizan en la presente invención significan cualquier molécula que actúa inhibiendo o suprimiendo la expresión o actividad de una proteína con dominio START como CERT. El término incluye compuestos químicos pequeños, ácidos nucleicos tales como ADN antisentido, ARN antisentido o ARNpi, anticuerpos monocatenarios y proteínas que bloquean la transcripción y traducción de CERT, así como péptidos o proteínas que interfieren con la unión a lípido de proteínas con dominio START tales como CERT.

"Células anfitrionas" en el sentido de la presente invención son células tales como células de hámster, preferiblemente células BHK21, BHK TK, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 y CHO-DG44 o los derivados/progenie de cualquiera de dichas estirpes celulares. Se prefieren particularmente células CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-K1 y BHK21, y aún más preferiblemente CHO-DG44 y CHO-DUKX. En una realización adicional de la presente invención, células anfitrionas significa también células de mieloma de múrido, preferiblemente células NS0 y Sp2/0 o los derivados/progenie de cualquiera de dichas estirpes celulares. Se resumen también los ejemplos de células de múrido y hámster que pueden utilizarse en el sentido de esta invención en la Tabla 1. Sin embargo, los derivados/progenie de esas células, otras células de mamífero incluyendo, pero sin limitación, estirpes celulares de seres humanos, ratones, ratas, monos y roedores, o células eucarióticas incluyendo, pero sin limitación, células de levadura, insecto y planta, pueden utilizarse también en el sentido de esta invención, particularmente para la producción de proteínas biofarmacéuticas.

TABLA 1: Estirpes celulares de producción eucariótica

ESTIRPE CELULAR	NÚMERO DE ORDEN
NS0	ECACC N° 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK	ECACC N° 85011423
HaK	ATCC CCL-15

2254-62.2 (derivado BHK-21)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC N° 8505302
CHO de tipo silvestre	ECACC 00102307
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk ⁻ , CHO/dhfr ⁻)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B11	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	(Urlaub et al., 1983)
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
HEK 293	ATCC CRL-1573
COS-7	ATCC CRL-1651
U266	ATCC TIB-196
HuNS1	ATCC CRL-8644
CHL	ECACC N° 87111906

Las células anfitrionas más preferidas son cuando se establecen, se adaptan y se cultivan completamente en condiciones exentas de suero, y opcionalmente en medios que están exentos de cualquier proteína/péptido de origen animal. Son disoluciones nutrientes apropiadas ejemplares medios comercialmente disponibles tales como F12 de Ham (Sigma, Deisenhofen, Alemania), RPMI-1640 (Sigma), medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), CHO-S-Invitrogen), medio CHO exento de suero (Sigma) y medio CHO exento de proteína (Sigma). Cualquiera de los medios puede suplementarse según sea necesario con una variedad de ejemplos de compuestos, los cuales son hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a insulina), sales (tales como cloruro de sodio, fosfato de calcio, magnesio), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina, timidina), glutamina, glucosa u otras fuentes de energía equivalentes, antibióticos u oligoelementos. Puede incluirse también cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que sea conocido por los expertos en la técnica. En la presente invención, se prefiere el uso de medio exento de suero, pero los medios suplementados con una cantidad adecuada de suero pueden utilizarse también para el cultivo de células anfitrionas. Para el crecimiento y la selección de células modificadas genéticamente que expresan el gen seleccionable, se añade un agente de selección adecuado al medio de cultivo.

El término "proteína" se utiliza intercambiamente con secuencias de restos aminoacídicos o polipéptido, y designa polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Estos términos incluyen también proteínas que se modifican post-traduccionalmente mediante reacciones que incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación o procesamiento de proteína. Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de un polipéptido, por ejemplo, fusiones con otras proteínas, sustituciones, deleciones o inserciones de la secuencia aminoacídica, mientras que la molécula mantenga su actividad funcional biológica. Por ejemplo, pueden hacerse ciertas sustituciones de secuencia aminoacídica en un polipéptido o su secuencia de codificación de ácido nucleico subyacente y puede obtenerse una proteína con propiedades similares.

El término "polipéptido" significa una secuencia con más de 10 aminoácidos y el término "péptido" significa secuencias de hasta 10 aminoácidos de longitud.

La presente invención es adecuada para generar células anfitrionas para la producción de polipéptidos/proteínas biofarmacéuticos. La invención es particularmente adecuada para la expresión de alto rendimiento de un gran número de genes de interés diferentes por células que muestran una productividad celular potenciada.

"Gen de interés" (GOI), "secuencia seleccionada" o "gen producto" tienen el mismo significado en la presente memoria y designan una secuencia polinucleotídica de cualquier longitud que codifica un producto de interés o "proteína de interés", también mencionado por el término "producto deseado". La secuencia seleccionada puede ser completa o un gen truncado, un gen de fusión o con etiqueta, y puede ser un ADNc, un ADN genómico o un fragmento de ADN, preferiblemente un ADNc. Puede ser la secuencia nativa, concretamente, forma(s) de origen natural, o puede estar mutada o modificada de otro modo según se desee. Estas modificaciones incluyen optimizaciones de codon para optimizar el uso de codon en la célula anfitriona seleccionada, humanización o etiquetado. La secuencia seleccionada puede codificar un polipéptido secretado, citoplásmico, nuclear, unido a membrana o de superficie celular.

La "proteína de interés" incluye proteínas, polipéptidos, fragmentos de los mismos o péptidos, todos los cuales pueden expresarse en la célula anfitriona seleccionada. Las proteínas deseadas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, enzimas, citocinas, linfoquinas, moléculas de adhesión, receptores y derivados o fragmentos de los mismos, y cualquier otro polipéptido que pueda servir como agonista o antagonista y/o que tenga uso terapéutico o de diagnóstico. Se dan también a continuación ejemplos de una proteína/polipéptido deseado.

En el caso de moléculas más complejas tales como anticuerpos monoclonales, el GOI codifica una o ambas de las dos cadenas de anticuerpo.

El "producto de interés" puede ser también un ARN antisentido.

"Proteínas de interés" o "proteínas deseadas" son aquellas mencionadas anteriormente. Especialmente, las proteínas/polipéptido deseados o proteínas de interés son, por ejemplo pero sin limitación, insulina, factor de crecimiento similar a insulina, hGH, tPA, citocinas tales como interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, factores de necrosis tumoral (TNF) tales como TNF alfa y TNF beta, TNF gamma, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 y VEGF. Se incluye también la producción de eritropoyetina o cualquier otro factor de crecimiento hormonal. El método según la invención puede utilizarse también ventajosamente para la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos. Dichos fragmentos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (fragmento de unión a antígeno = Fab). Los fragmentos Fab consisten en las regiones variables de ambas cadenas que se mantienen juntas por la región constante adyacente. Estos pueden estar formados mediante digestión por proteasa, por ejemplo, con papaína, a partir de anticuerpos convencionales, pero pueden producirse fragmentos Fab similares mientras tanto mediante ingeniería genética. Los fragmentos de anticuerpo adicionales incluyen fragmentos F(ab')₂, que pueden prepararse mediante escisión proteolítica con pepsina.

La proteína de interés se recupera preferiblemente del medio de cultivo en forma de un polipéptido secretado, o puede recuperarse a partir de lisados de la célula anfitriona si se expresa sin una señal secretora. Es necesario purificar la proteína de interés de otras proteínas recombinantes y proteínas de célula anfitriona de modo que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas de la proteína de interés. Como primera etapa, se retiran las células y/o desechos celulares particulados del medio de cultivo o lisado. Se purifica después de ello el producto de interés de las proteínas solubles, polipéptidos y ácidos nucleicos contaminantes, por ejemplo, mediante fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía Sephadex, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE. En general, los métodos que enseñan a un experto a purificar una proteína heteróloga expresada por células anfitrionas son bien conocidos en la técnica. Dichos métodos se describen, por ejemplo, por (Harris y Angal, 1995) o (Robert Scopes, 1988).

Utilizando métodos de ingeniería genética es posible producir fragmentos de anticuerpo acortados que consisten sólo en las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL). Estos se designan como fragmentos Fv (fragmento variable= fragmento de la parte variable). Puesto que estos fragmentos Fv carecen del enlace covalente de las dos cadenas por las cisteínas de las cadenas constantes, a menudo los fragmentos Fv están estabilizados. Resulta ventajoso ligar las regiones variables de la cadena pesada y ligera mediante un fragmento peptídico corto, por ejemplo de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 aminoácidos. De este modo, se obtiene una sola cadena peptídica consistente en VH y VL, ligadas por un engarce peptídico. Una proteína de anticuerpo de este tipo es conocida como un Fv monocatenario (scFv). Los ejemplos de proteínas de anticuerpo scFv de este tipo conocidas en la técnica anterior se describen en (Huston et al., 1988).

En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias para preparar scFv como derivado multimérico. Se pretende que esto conduzca, en particular, a anticuerpos recombinantes con propiedades farmacocinéticas y de biodistribución mejoradas, así como a una avidéz de unión aumentada. Para conseguir la multimerización de scFv, se prepararon scFv en forma de proteínas de fusión con dominios de multimerización. Los dominios de multimerización pueden ser, por ejemplo, la región CH3 de una IgG o estructura helicoidal (estructuras de hélice) tal como dominios de cremallera de leucina. Sin embargo, hay también estrategias en las que se utiliza la interacción entre las regiones VH/VL del scFv para la multimerización (por ejemplo, dia-, tri- y pentacuerpos). Por diacuerpo, el experto en la técnica quiere indicar un derivado de scFv homodimérico divalente. El acortamiento del engarce en una molécula de scFv a 5-10 aminoácidos conduce a la formación de homodímeros en los que tiene lugar una superposición intercatenaria VH/VL. Los diacuerpos pueden estabilizarse adicionalmente mediante la incorporación de puentes disulfuro. Pueden encontrarse ejemplos de proteínas diacuerpo-anticuerpo de la técnica anterior en (Perisic et al., 1994).

Por minicuerpo, el experto en la técnica quiere indicar un derivado de scFv homodimérico divalente. Consiste en una proteína de fusión que contiene la región CH3 de una inmunoglobulina, preferiblemente IgG, lo más preferiblemente IgG1, como región de dimerización que está conectada con el scFv mediante una región de bisagra (por ejemplo, de IgG1) y una región de engarce. Pueden encontrarse ejemplos de proteínas minicuerpo-anticuerpo de la técnica anterior en (Hu et al., 1996).

Por triacuerpo, el experto en la técnica quiere indicar: un derivado de scFv homotrimérico trivalente (Kortt et al., 1997). Los derivados de scFv en los que VH-VL están condensadas directamente sin una secuencia de engarce conducen a la formación de trímeros.

Por "proteínas estructurales", un experto en la técnica quiere indicar cualquier dominio funcional de una proteína que esté acoplado por clonación genética o mediante procesos cotraduccionales con otra proteína o parte de una proteína que tiene otra función.

El experto en la técnica estará también familiarizado con los denominados minianticuerpos, que tienen una estructura bi-, tri- o tetravalente y derivan de scFv. Se lleva a cabo la multimerización mediante estructuras helicoidales di-, tri- o tetraméricas (Lovejoy et al., 1993; Pack et al., 1993; Pack et al., 1995).

5 Por definición, cualquier secuencia o gen introducido en una célula anfitriona se denomina "secuencia heteróloga" o "gen heterólogo" o "transgén" con respecto a la célula anfitriona, incluso si la secuencia o gen introducido es idéntico a una secuencia o gen endógeno en la célula anfitriona.

Una proteína "heteróloga" es por tanto una proteína expresada a partir de una secuencia heteróloga.

10 Las secuencias de gen heterólogo pueden introducirse en una célula diana utilizando un "vector de expresión", preferiblemente un vector de expresión eucariótico y aún más preferiblemente de mamífero. Los métodos utilizados para construir vectores son bien conocidos por el experto en la técnica y se describen en diversas publicaciones. En particular, se revisan con considerables detalles técnicas particulares para construir vectores adecuados, incluyendo una descripción de componentes funcionales tales como promotores, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación, marcadores de selección, orígenes de replicación y señales de corte y empalme en (Sambrook et al., 1989) y las referencias citadas en el mismo. Los vectores pueden incluir, pero sin limitación, vectores plasmídicos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales/minicromosomas (por ejemplo ACE) o vectores víricos tales como baculovirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus simple, retrovirus, bacteriófagos. Los vectores de expresión eucarióticos contendrán típicamente también secuencias procarióticas que faciliten la propagación del vector en bacterias tales como un origen de replicación y genes de resistencia a antibióticos para selección en bacterias. Son bien conocidos en la técnica una variedad de vectores de expresión eucarióticos que contienen un sitio de clonación en el que puede ligarse operativamente un polinucleótido, y algunos están comercialmente disponibles en compañías tales como Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI o BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA.

En una realización preferida, el vector de expresión comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que es una secuencia reguladora necesaria para la transcripción y traducción de secuencias nucleotídicas que codifican un péptido/polipéptido/proteína de interés.

30 El término "expresión" como se utiliza en la presente memoria designa la transcripción y/o traducción de una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula anfitriona. El nivel de expresión de un producto/proteína de interés deseado en una célula anfitriona puede determinarse basándose en la cantidad del ARNm correspondiente que está presente en la célula, o la cantidad de polipéptido/proteína de interés codificado por la secuencia seleccionada como en los presentes ejemplos. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse mediante hibridación de transferencia Northern, protección de ARN ribonucleasa, hibridación *in situ* a ARN celular o mediante PCR (véanse (Sambrook et al., 1989); (Ausubel et al., 2002) actualizado). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada pueden cuantificarse mediante diversos métodos, por ejemplo, por ELISA, transferencia Western, radioinmunoensayos, inmunoprecipitación, ensayo de la actividad biológica de la proteína, inmunotinción de la proteína seguido de análisis FACS (véanse (Sambrook et al., 1989); (Ausubel et al., 2002) actualizado) o mediante ensayos de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF).

45 La "transfección" de células anfitrionas eucarióticas con un polinucleótido o vector de expresión, dando como resultado células modificadas genéticamente o células transgénicas, puede realizarse mediante cualquier método bien conocido en la técnica y descrito, por ejemplo, en (Sambrook et al., 1989) o (Ausubel et al., 2002) actualizado. Los métodos de transfección incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por liposoma, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por polimerización (tal como DEAE-dextrano), fusión de protoplastos, infecciones víricas y microinyección. Preferiblemente, la transfección es una transfección estable. Está favorecido el método de transfección que proporcione una frecuencia de transfección y expresión óptimas de los genes heterólogos en la estirpe celular anfitriona particular. Los métodos adecuados pueden determinarse mediante procedimientos rutinarios. Para transfectantes estables, los constructos se integran en el genoma de la célula hospedadora o en un cromosoma artificial/minicromosoma o se localizan episómicamente de modo que se mantengan establemente en la célula anfitriona.

55 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo celular, inmunología y similares que están dentro de las habilidades de un experto en la técnica. Estas técnicas se dan a conocer completamente en la bibliografía actual. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (1987, actualizado); Brown ed., Essential Molecular Biology, IRL Press (1991); Goeddel ed., "Gene Expression Technology", Academic Press (1991); Bothwell et al. eds., "Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes", Bartlett Publ. (1990); Wu et al., eds., "Recombinant DNA Methodology", Academic Press (1989); Kriegler, "Gene Transfer and Expression", Stockton Press (1990); McPherson et al., "PCR: A Practical Approach", IRL Press en la Oxford University Press (1991); Gait ed., "Oligonucleotide Synthesis" (1984); Miller & Calos eds., "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (1987); Butler ed., "Mammalian Cell Biotechnology" (1991); Pollard et al., eds., "Animal Cell Culture", Humana Press (1990);

5 Freshney et al., eds., "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss (1987); Studzinski, ed., "Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach", IRL Press en la Oxford University Presss (1995); Melamed et al., eds., "Flow Cytometry and Sorting", Wiley-Liss (1990); "Current Protocols in Cytometry", John Wiley & Sons, Inc. (actualizado); Wirth & Hauser, "Genetic Engineering of Animals Cells", en: "Biotechnology Vol. 2", Pühler ed., VCH, Weinheim 663-744; la serie "Methods of Enzymology" (Academic Press, Inc.) y Harlow et al., eds., "Antibodies: A Laboratory Manual" (1987).

REALIZACIONES

10 La invención se refiere a un método de producción de una proteína heteróloga de interés en una célula que comprende aumentar la expresión o actividad de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende el dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo, y efectuar la expresión de dicha proteína de interés. En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína heteróloga es una proteína de membrana o secretada.

15 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START es un miembro de la familia del dominio START de mamíferos tal como PCTP (SEC ID N° 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEC ID N° 21), StarD6 (SEC ID N° 25), StarD5 (SEC ID N° 23), MLN64, Star, THEA-2, CACH o StarD9 o un derivado o mutante de las mismas.

20 En una realización específica adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START se caracteriza por estar inducida por estrés de ER y/o está caracterizada estructuralmente por consistir únicamente en un dominio START tal como StarD4 (SEC ID N° 21), StarD5 (SEC ID N° 23), StarD6 (SEC ID N° 25) o proteína de transferencia de fosfatidilcolina (PCTP) (SEC ID N° 27).

25 En otra realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START se selecciona del grupo consistente en CERT (SEC ID N° 11 ó 13), StarD4 (SEC ID N° 21) y StarD5 (SEC ID N° 23).

30 En una realización adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START es StarD6 (SEC ID N° 25). En una realización preferida, StarD6 está codificada por un nucleótido con la SEC ID N° 24.

35 En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque el dominio START comprende al menos el dominio START de 219 aminoácidos de CERT_L (SEC ID N° 19), o al menos el dominio START de 223 aminoácidos de CERT y CERT S132A (SEC ID N° 17), o al menos el dominio START de StarD4 (SEC ID N° 21) o al menos el dominio START de StarD5 (SEC ID N° 23) o un derivado o mutante del mismo.

40 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START es la proteína de transferencia de ceramida CERT (CERT=SEC ID N° 11 o CERT_L=SEC ID N° 13) o un derivado o mutante de la misma.

45 En otra realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START es proteína de transferencia de ceramida CERT mutada, y dicha mutación incapacita y/o elimina un sitio de fosforilación en cualquier posición de serina, treonina o tirosina de CERT.

50 En una realización específica adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína con dominio START es proteína de transferencia de ceramida CERT mutada, y dicha mutación incapacita y/o elimina el sitio de fosforilación de proteína cinasa D (PKD) de CERT en la posición 132.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque la CERT mutada es CERT_{S132A} (SEC ID N° 15).

55 En otra realización de la presente invención, el método se caracteriza porque dicho método da como resultado una productividad celular específica aumentada de dicha proteína de interés en dicha célula, en comparación con una célula de control que expresa dicha proteína de interés, pero en la que dicha célula de control no tiene una expresión o actividad aumentada de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo.

60 En otra realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque el aumento de productividad es de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 11% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 21% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 31% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 41% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 51% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 61% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 71% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 81% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 91% a aproximadamente 100%, de

65

aproximadamente 101% a aproximadamente 149%, de aproximadamente 150% a aproximadamente 199%, de aproximadamente 200% a aproximadamente 299%, de aproximadamente 300% a aproximadamente 499%, o de aproximadamente 500% a aproximadamente 1000%.

5 En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula eucariótica tal como una célula de levadura, planta, gusano, insecto, ave, pez, reptil o mamífero. En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula animal. En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula de metazoo tal como *C. elegans*. En otra realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula de *Bilateria* tal como *Drosophila melanogaster*. En una realización adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula de vertebrado tal como una célula de ave, pez, reptil o mamífero. En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula humana tal como las estirpes celulares de mieloma humano U266, HEK293, HeLa, HepG2 o HT1080. En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula es una célula de roedor tal como una célula NSO, Sp2/0 o Ag8653, YO o YB2.0 de murido.

En una realización adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula eucariótica es una célula de mamífero.

20 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO), riñón de mono CV1, riñón de mono COS, epitelio lenticular humano PER.C6TM, riñón embrionario humano HEK293, riñón de hámster recién nacido, riñón de mono verde africano, carcinoma cervical humano, riñón canino, hígado de rata común, pulmón humano, hígado humano, tumor mamario de ratón o mieloma, una célula de perro, cerdo o macaco, rata, conejo, gato o cabra, preferiblemente una célula CHO.

En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque dicha célula CHO es CHO de tipo silvestre, CHO K1, CHO DG44, CHO DUKX-B11, CHO Pro-5, preferiblemente CHO DG44.

30 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína de interés es una proteína de membrana o secretada. En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína de interés es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

35 En una realización preferida adicional de la presente invención, el método se caracteriza porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, de mamífero, de murido, quimérico, humanizado, primatizado, de primate, humano o un fragmento de anticuerpo o derivado del mismo tal como anticuerpo, cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada de inmunoglobulina, cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina, Fab, F(ab')₂, Fc, proteínas de fusión Fc-Fc, Fv, Fv monocatenario, Fv con dominio único, Fv monocatenario tetravalente, Fv ligado por disulfuro, con dominio suprimido, minicuerpo, diacuerpo o un polipéptido de fusión de uno de los fragmentos anteriores con otro péptido o polipéptido, fusión Fc-péptido, fusión Fc-toxina o proteínas estructurales.

45 La invención se refiere adicionalmente a un método para aumentar la secreción de una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende expresar dicha proteína de interés y expresar una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo.

50 La invención se refiere adicionalmente a un método de producción de una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende aumentar la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo, y efectuar la expresión de dicha proteína de interés, en el que el orden de las etapas a y b puede invertirse.

55 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza adicionalmente porque la etapa a) se lleva a cabo antes de la etapa b). En una realización específica adicional de la presente invención, el método se caracteriza adicionalmente porque las etapas a) y b) se llevan a cabo simultáneamente. En otra realización de la presente invención, el método se caracteriza adicionalmente porque la etapa b) se lleva a cabo antes de la etapa a). En una realización preferida de la presente invención, el método comprende adicionalmente una etapa adicional de recuperación de la proteína de interés.

60 En una realización especialmente preferida de la presente invención, el método comprende adicionalmente una etapa adicional de aislamiento y purificación de la proteína de interés.

65 En una realización específica de la presente invención, el método comprende aumentar la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START), o un derivado o mutante del mismo, transfectando una célula con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un

dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo.

5 En una realización específica de la presente invención, el método comprende transfectar dicha célula con un primer polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START), o un derivado o mutante del mismo, y transfectar dicha célula con un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés.

10 En una realización específica de la presente invención, la proteína con dominio START del método se caracteriza por estar inducida por estrés del ER y/o se caracteriza estructuralmente por no tener restos estructurales adicionales además del dominio START, tales como StarD4 (SEC ID N° 21), StarD5 (SEC ID N° 23), StarD6 (SEC ID N° 25) o PCTP (SEC ID N° 27).

15 En una realización preferida de la presente invención, el método comprende aumentar la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START), o un derivado o mutante del mismo, preferiblemente transfectando dicha célula con un primer polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START), o un derivado o mutante del mismo, en el que el aumento se mide en comparación con una célula no transfectada, y transfectando dicha célula con un segundo polinucleótido que codifica la proteína de interés

20 En una realización preferida de la presente invención, el método se caracteriza porque las proteínas expresadas en las etapas a) y b) no son idénticas.

25 La invención se refiere adicionalmente a un método de producción de una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende aumentar la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo en dicha célula y efectuar la expresión de dicha proteína de interés en dicha célula.

30 La invención se refiere además a un método de producción de una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende aumentar la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo en dicha célula y expresar dicha proteína de interés en dicha célula.

35 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque en dicho método da como resultado una productividad celular específica aumentada de dicha proteína de interés en dicha célula en comparación con una célula de control transfectada anteriormente con un polinucleótido que codifica la proteína de interés, pero en la que dicha célula de control no tiene una expresión aumentada de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo.

40 En una realización específica de la presente invención, el método se caracteriza porque la proteína de interés es una proteína que pasa a través del complejo de Golgi.

45 La invención se refiere adicionalmente a un método para aumentar la productividad celular específica de una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende introducir en una célula uno o más sistemas de vector que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican al menos dos polipéptidos, en los que un primer polinucleótido codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo, y un segundo polinucleótido codifica una proteína de interés, y en el que la proteína de interés y la proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo están expresadas por dicha célula.

50 La invención se refiere además a un método para aumentar la eficacia de transfección de una célula que expresa una proteína de membrana o secretada de interés en una célula, que comprende transfectar dicha célula con un primer polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo y transfectar posteriormente dicha célula con un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés, en el que dichos primer y segundo polinucleótidos están localizados en sistemas de vector diferentes.

65

En una realización adicional, la invención se refiere a un método para aumentar la eficacia de transfección de una célula, que comprende la etapa adicional de transfectar un gen indicador tal como GFP, YFP, HRP, SEAP o LacZ, que podría fusionarse con la proteína de interés, localizado en el mismo constructo de expresión o en un plásmido separado.

5 En una realización preferida, la invención se refiere a un método para aumentar la eficacia de transfección de una célula, que comprende la etapa adicional de detectar y/o medir la eficacia de transfección mediante la detección de la proteína de interés o la expresión del gen indicador.

10 La invención se refiere adicionalmente a un vector de expresión que comprende dos polinucleótidos, un primer polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo y un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés.

15 En una realización específica de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque la proteína con dominio START es un miembro de la familia del dominio START de mamíferos tal como PCTP (SEC ID N° 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEC ID N° 21), StarD6 (SEC ID N° 25), StarD5 (SEC ID N° 23), MLN64, STAR, THEA-2, CACH o StarD9 o un derivado o mutante de los mismos.

20 En otra realización de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque la proteína con dominio START es proteína de transferencia de ceramida CERT (CERT=SEC ID N° 11 o CERT_L=SEC ID N° 13) o un derivado o mutante de las mismas.

25 En una realización específica de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque la CERT mutada es CERT_{S132A} (SEC ID N° 15).

En una realización específica de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque dicho primer polinucleótido aumenta el transporte de proteína en una célula por la ruta secretora.

30 En una realización específica de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque la proteína con dominio START es proteína de transferencia de ceramida CERT mutada, y dicha mutación incapacita y/o suprime un sitio de fosforilación en cualquier posición de serina, treonina o tirosina en la proteína CERT.

35 En otra realización de la presente invención, el vector de expresión se caracteriza porque la proteína con dominio START es proteína de transferencia de ceramida mutada CERT, y dicha mutación incapacita y/o suprime el sitio de fosforilación de proteína cinasa D (PKD) de CERT en la posición 132.

40 La presente invención se refiere adicionalmente a una célula que comprende el vector de expresión de la invención. En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula es una célula eucariótica tal como una célula de levadura, planta, gusano, insecto, ave, pez, reptil o mamífero. En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula eucariótica es una célula de mamífero.

45 En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO), riñón de mono CV1, riñón de mono COS, epitelio lenticular humano PER.C6TM, riñón embrionario humano HEK 293, riñón de hámster recién nacido, riñón de mono verde africano, carcinoma cervical humano, riñón canino, hígado de rata común, pulmón humano, hígado humano, tumor mamario de ratón o mieloma, una célula de perro, cerdo o macaco, de rata, conejo, gato o cabra, preferiblemente una célula CHO. En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula CHO es

50 CHO de tipo silvestre, CHO K1, CHO DG44, CHO DUKX-B11, CHO Pro-5, preferiblemente CHO DG44.

En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula es una célula animal, preferiblemente una célula de metazoo tal como *C. elegans*. En una realización adicional de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula es una célula de *Bilateria* tal como *Drosophila melanogaster*, preferiblemente una célula de vertebrado tal como una célula de ave, pez, reptil o mamífero. En una realización específica de la presente invención, la célula se caracteriza porque dicha célula eucariótica es una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana tal como una estirpe celular de mieloma humano U266, HEK293, HeLa, HepG2 o HT1080, más preferiblemente una célula de roedor tal como una célula NSO, Sp2/0 o Ag8653, YO o YB2.0 de múrido.

60 La invención se refiere adicionalmente a una proteína de interés, preferiblemente un anticuerpo producido mediante cualquiera de los métodos descritos.

65 La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende una secuencia polinucleotídica útil para bloquear o reducir la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis

aguda (START) o un derivado o mutante del mismo. La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una secuencia polinucleotídica que bloquea o reduce la expresión de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio START o un derivado o mutante del mismo.

5 En una realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque la secuencia con dominio START es proteína de transferencia de ceramida CERT (CERT=SEC ID N° 11 o CERT_L=SEC ID N° 13) o un derivado o mutante de las mismas.

En otra realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque el dominio START es (SEC ID N° 17 ó 19) o un derivado o mutante del mismo.

10 En una realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque la secuencia polinucleotídica es ARNi, ARNpi o ARN antisentido.

15 En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque la proteína con dominio START es un miembro de la familia del dominio START de mamíferos tal como PCTP (SEC ID N° 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEC ID N° 21), StarD6 (SEC ID N° 25), StarD5 (SEC ID N° 23), MLN64, StAR, THEA-2, CACH o StarD9 o un derivado o mutante de los mismos.

20 En una realización particularmente preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque dicho polinucleótido es complementario de la secuencia nucleotídica de CERT o partes de la misma, especialmente del dominio START.

En la realización más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque dicho polinucleótido se une al gen CERT o al promotor de CERT.

En una realización adicional de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque dicho polinucleótido es un oligonucleótido antisentido del gen CERT o partes del mismo.

25 La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor o supresor de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START), preferiblemente CERT (SEC ID N° 11 o SEC ID N° 13) o un derivado o mutante de la misma.

30 En una realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque dicho inhibidor o supresor es una sustancia química o un inhibidor peptídico o una proteína inhibidora tal como (i) proteína de unión al promotor CERT, inhibiendo así la expresión de CERT, (ii) proteína de unión a CERT o PKD, evitando así la unión de PKD y CERT y obstaculizando la fosforilación de CERT por PKD, (iii) una proteína similar a CERT, que sin embargo no satisface las funciones de CERT, lo que significa una variante CERT "dominante negativa", o (iv) una proteína que actúa como estructura tanto para CERT como para PKD, dando como resultado una unión irreversible de CERT a PKD (= un complejo PKD/CERT estable) que no es funcional debido a la fosforilación inhibidora de CERT por PKD y la obstaculización de la disociación de CERT de dicho complejo.

40 En una realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica se caracteriza porque dicho inhibidor o supresor es un inhibidor o supresor de la actividad CERT.

45 La invención se refiere adicionalmente a un método para identificar un modulador de la función proteica del dominio START, preferiblemente la función CERT, que comprende proporcionar una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante de la misma, preferiblemente CERT, y poner en contacto dicha proteína de la etapa a) con un agente de ensayo, determinando el efecto relacionado con la secreción o expresión aumentada o reducida de proteínas de superficie celular.

50 La invención se refiere adicionalmente a un método que comprende la aplicación de una composición farmacéutica como se ha descrito para el tratamiento del cáncer.

La invención se refiere además al uso de una proteína con dominio START o un polinucleótido que codifica una proteína con dominio START para aumentar la secreción y/o producción de una proteína de interés.

55 La invención se refiere adicionalmente a un uso para diagnóstico de cualquiera de los métodos, vectores de expresión, células o composiciones farmacéuticas como se han descrito.

60 En una realización específica, la invención se refiere adicionalmente a un método para producir una proteína heteróloga de interés en una célula, que comprende aumentar la expresión o actividad de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende una secuencia consenso del dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) o un derivado o mutante del mismo como se enumera a continuación,

65

CONSENSO/80% (SEC ID N° 28)

nhnntnntnhtnhntnnnWnnnnnnnnnnnnnnnnhhthnnnnnnnnnnnnnnnnnn+hnthhnnnnnnnnhnnhntnnnnntWppnhnn
nnnnnnnnnnhthlpnhtnsnnnnnnnslnhnnntnlnhnnhnsnRhhnlRnhpnnnnnnnnnnntnhhlhnnohpntnnnnnnnnthhRsph
hnsHHHPnnttsnnnnnnnnnnnsphhhlnhhtsnnnnnnnpnhhphhthntnnhnpnnnnhthtptntp

5 en la que las claves de clase de restos son (representados en el código de aminoácidos de una letra):

	alcohol o	S,T
	alifático l	I,L,V
	cualquiera n	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	aromático a	F,H,W,Y
10	cargado c	D,E,H,K,R
	hidrofóbico h	A,C,F,G,H,I,K,L,M,R,T,V,W,Y
	negativo -	D,E
	polar p	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T
	positivo +	H,K,R
15	pequeño s	A,C,D,G,N,P,S,T,V
	diminuto u	A,G,S
	giro t	A,C,D,E,G,H,K,N,Q,R,S,T

y efectuar la expresión de dicha proteína de interés.

20 En realizaciones preferidas adicionales de la invención, la proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido relacionado con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (START) en cualquiera de las realizaciones anteriores (por ejemplo, vectores de expresión, células, proteínas, composiciones farmacéuticas, métodos y usos) se define por comprender una secuencia consenso del dominio
25 START o un derivado o mutante del mismo como se enumera anteriormente (SEC ID N° 28; véase también la FIGURA 9).

La invención descrita en general anteriormente se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen por la presente simplemente con fines de ilustración de ciertas realizaciones de la
30 presente invención. Los siguientes ejemplos son no limitantes. Simplemente muestran realizaciones posibles de la invención. Un experto en la técnica podría ajustar fácilmente las condiciones para aplicarlas a otras realizaciones.

PARTE EXPERIMENTAL
MATERIALES Y MÉTODOS:

35 Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos son: anticuerpo policlonal anti-sustrato de PKD de conejo (Cell Signaling), anticuerpo monoclonal anti-Flag de ratón (Sigma-Aldrich), anticuerpo monoclonal anti-GFP de ratón (Roche), anticuerpo policlonal anti-PKD de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpos anti-GS28 de ratón (BD Biosciences) y anti-tubulina de ratón (Neomarkers). El anticuerpo anti-pS916 fosfoespecífico de PKD que monitoriza la autofosforilación de PKD se describe en otro lugar (Hausser et al., 2002). Los anticuerpos secundarios de IgG anti-ratón y anti-conejo marcados con peroxidasa son de Amersham; El anticuerpo secundario de IgG anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina es de Sigma; Los anticuerpos secundarios de IgG anti-ratón y anti-rata marcados con Alexa Fluor 488 y 546 son de Molecular Probes.

Constructos de ADN

Se amplifica ADNc de CERT completa mediante PCR utilizando pcDNA3-Flag-CERT como molde, con cebadores que contienen sitios de restricción EcoRI y clonados en el vector pEGFPC1. Se generan los mutantes puntuales de CERT mediante mutagénesis por PCR dirigida a sitio Quikchange siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene). Las variantes truncadas de CERT se generan mediante la inserción de codones STOP. Se utilizan los siguientes oligonucleótidos: CERT-S132A (SEC ID N° 1: 5'-cgctgacatggcgcaatgggtccctgg-3'), CERT-S132A rev (SEC ID N° 2: 5'-ccaggacaccattgcgccatgtcgacg-3'), CERT-S272A (SEC ID N° 3: 5'-ggttaaactgtgaggacgctggcagaagactgg-3'); CERT-S272Arev (SEC ID N° 4: 5'-ccagtctctctgccaggcgctcaccgtttaacc-3'), truncamientos de CERT en el aminoácido 138 (SEC ID N° 5: 5'-ggtgtccctgggtcttgagcaagtggctactc-3'); truncamiento CERT-138 rev (SEC ID N° 6: 5'-gagttagcactgtgcaagaccaggacacc-3'). Se subclona el ADNc de Flag-CERT en pGEX6P1 utilizando sitios de restricción EcoRI. pEGFP-N1-PKD y pEGFP-N1-PKD_{K612W} se han descrito anteriormente (Hausser et al., 2005). El plásmido que codifica ss-HRP-Flag se proporciona amablemente por Vivek Malhotra (UCSD).

ADNcs y proteínas:

humano: ADNc de CERT (SEC ID N° 10):
atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct 60
gggccgctg tggagcctg cggggctctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg 120
caggatcgtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaatc tgaagatgaa 180

ES 2 397 274 T3

acagagatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat 240
 ttgatgaat gtcgattga tattagtga aatgatagtg ttggatctct tcgtgctcag 300
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360
 5 tatggatctg aatccagctt gcctcgacat ggctcaatgg tgcctctggt gtctggagca 420
 agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540
 tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta 600
 gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc 660
 aacggcaata aagaaaagt tttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatagac 720
 10 tttaaagggg aagcgataac ttttaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780
 cattgtattg aactaatgtt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840
 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900
 aaatcccatc ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960
 gagttctttg atgtgttga agctgtctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020
 15 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct 1080
 tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tggtcgagaa ccacatgact 1140
 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200
 atgaaggtat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260
 acccatgcag ttaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgc 1320
 20 gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat 1380
 aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440
 ttatatcttt ctgctattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgaccc tgaacttgg 1500
 atagtttga attttctgt ggatcatgac agtgctcctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560
 gccaaaataa atgttctat gatttgtcaa accttggtaa gccaccaga gggaaaccag 1620
 25 gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattg gaacctgga 1680
 ggatggcac cagctcagt gtaagggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740
 aaacgttita ctcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatctt gtctag 1797

humano: proteina CERT (SEC ID N° 11)

30 Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 35 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 40 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 45 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 50 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 55 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 60 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 65 Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala

ES 2 397 274 T3

Gly Lys Pro Ile Leu Phe

humano: ADNc de CERT L (SEC ID N° 12)

5 gcaggaagat ggcggcggtg gcggaagtgt gagtggacgc gggactcagc ggccggatt 60
 tctcttccct tcttttccct ttccttccc tatttgaat tggcatcgag ggggctaagt 120
 tcgggtggca ggcggggcg caacgcaggg gtcacggcga cggcgccggc ggctgacggc 180
 tggaaggga ggctcattc accgctcgc ctcttctc gctccgctcg gtgtcaggcg 240
 cggcgccggc cggcgggcg gactctgccc ctcttctcgc tccccccac accggagcgg 300
 gcactctcg cttgccatc ccccgacct tcaccccgag gactggcgcg ctctccggc 360
 10 gcagctgagg gagcgggggc cggctcctg ctcggttgc gagcctccat gtcggataat 420
 cagagctgga actcgtcggg ctccgaggag gatccagaga cggagtctgg gccgcctgtg 480
 gagcgtcgc ggtcctcag taagtggaca aactacattc atgggtggca ggtatggtg 540
 gtatgttga aaaataatgc tctgattac tacaatctg aagatgaaac agagtatggc 600
 tgcagaggat ccatctgtct tagcaaggct gtcacacac ctcacgattt tgatgaatgt 660
 15 cgattgata ttgctgtaa tgatagtgt tggtatctc gtgctcagga tccagatcat 720
 agacagcaat ggatagatgc cattgaacag cacaagactg aatctggata tggatctgaa 780
 tccagctgc gtcgacatgg ctcaatggtg tccttgggtg ctggagcaag tggctactct 840
 gcaacatcca cctctcatt caagaaggc cacagtttac gtgagaagt ggctgaaatg 900
 gaaacatta gagacatct atgtagacaa gttgacacgc tacagaagta cttgatgccc 960
 20 tgtgctgatg ctgtcttaa ggatgaact caaagggata aagtggtaga agatgatgaa 1020
 gatgacttc ctacaacgc ttctgatgt gactcttgc atagtacaa cggcaataaa 1080
 gaaaagtat tccacatgt gacacaaaa ggaattaatg gtatagactt taaaggggaa 1140
 gcgataact ttaaagcaac tactgctgga atcctgcaa cactttctca ttgtattgaa 1200
 ctaatggta aacgtgagga cagctggcag aagagactgg ataaggaaac tgagaagaaa 1260
 25 agaagaacag aggaagcata taaaaatgca atgacagaac ttaagaaaa atcccactt 1320
 ggaggaccag attatgaaga aggcctaac agtctgatta atgaagaaga gttcttgat 1380
 gctgtgag ctgctctga cagacaagat aaaatagaag aacagtcaca gagtgaaaag 1440
 gtgagattac atggcctac atcctgccc tctggagatg cctttctc tgtggggaca 1500
 catagattg tccaaaagcc ctatagtcgc tcttctcca tgtctccat tgatctagtc 1560
 30 agtgcctctg atgatgtca cagattcagc tcccaggtg aagagatggt gcagaaccac 1620
 atgacttact cattacagga ttagggcga gatgccaatt ggcagtgtgt ttagaagaa 1680
 ggagaaatga aggtatacag aagagaagta gaagaaaatg ggattgtct ggatcctta 1740
 aaagctaccc atgcagttaa aggcgtcaca ggacatgaag tctgcaatta ttctggaat 1800
 gttgacgttc gcaatgactg ggaacaact atagaaaact tcatgtggt ggaacatta 1860
 35 gctgataatg caatcatcat ttatcaaaaca cacaagaggg tgtggcctgc ttctcagcga 1920
 gacgtattat atcttctgt cattcgaag ataccagcct tgactgaaa tgaccctgaa 1980
 acttgatag ttgtaattt ttctgtggat catgacagt ctcctctaaa caaccgatgt 2040
 gtccgtgcca aaataaatgt tgctatgatt tgcacaaact tgtaagccc accagagggg 2100
 aaccagggaa ttgacagga caacattcta tgcaagatta catatgtagc taatgtgaac 2160
 40 cctggaggat ggcaccagc ctacgtgta agggcagtg caaagcgaga gtatctaaa 2220
 ttctaaaac gtttacttc ttacgtcaa gaaaaactg caggaaagcc tattttgtc 2280
 tagtattaac aggtactaga agatattt tatctttt taactttat tgactaata 2340
 gactgcaat actaaaatt agttgtgaa agtatttact atgttttt 2389

45 humano: proteína CERT L (SEC ID N° 13)

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 55 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 60 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 65 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val
 Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met
 5 Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala
 Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg
 Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His
 Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn
 Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val
 10 Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys
 Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile
 Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val
 Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys
 Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser
 15 Pro Pro Glu Lys Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys
 Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser
 Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg
 Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe

humano: ADNc de CERT S132A (SEC ID N° 14)
 atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct 60
 gggccgcctg tggagcgcctg cggggctcctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg 120
 caggatcgtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa 180
 acagagtatg gctgcagagg atccatctgt ctagcaagg ctgtcatcac acctcagat 240
 25 tttgatgaat gtcgatttga tattagtga aatgatagt tttggtatct tcgtgctcag 300
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360
 tatggatctg aatccagctt gctcgcacat ggcgcaatgg tgtccctggt gctcggagca 420
 agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttagtagac aagttgacac gctacagaag 540
 30 tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaagga taaagtgta 600
 gaagatgatg aagatgactt tctacaacg cgttctgatg gtgacttct gcatagtacc 660
 aacggcaata aagaaaagt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggtagagac 720
 ttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatcctgc aacactttct 780
 cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840
 35 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga actaagaaa 900
 aatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960
 gagtctttg atgctgttga agctgtctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020
 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct 1080
 tctgtgggga cacatagatt tgcctaaaag gttgaagaga tggtcagaa ccacatgact 1140
 40 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200
 atgaaggtat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260
 acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac 1320
 gttcgcaatg actgggaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat 1380
 aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtggc ctgcttca cgcagacgta 1440
 45 ttatatctt ctgctattc aaagatacca gcctgactg aaaatgacct tgaacttgg 1500
 atagtttga attttctgt ggatcatgac agtgcctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560
 gccaaaataa atgttgctat gatttgcac accttgtaa gccaccaga gggaaaccag 1620
 gaaatagca gggacaacat tctatgcaag attacatag tagctaagt gaaccctgga 1680
 ggatgggac cagcctcagt gtaagggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740
 50 aaactttta ctctactg ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatctt gtctag 1797

humano: proteína CERT S132A (SEC ID N° 15)
 Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 55 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 60 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 Arg His Gly Ala Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 65 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys

5 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 10 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 15 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 20 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 25 Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
 Gly Lys Pro Ile Leu Phe

25 humano: ADNc con dominio START de CERT (SEC ID N° 16)
 agattgtcc aaaaggttga agagatgggt cagaaccaca tgacttactc attacaggat 60
 gtaggcggag atgccaattg cgacttgggt gtagaagaag gagaatgaa ggtatacaga 120
 agagaagtag aagaaaatgg gattgttctg gatccttaa aagctacca tcaggttaa 180
 30 ggcgtcacag gacatgaagt ctgcaattat tcttgaatg ttgacgttcg caatgactgg 240
 gaaacaacta tagaaaactt tcatgtgggt gaaacattag ctgataatgc aatcatcatt 300
 tatcaaacac acaagagggt gtggcctgct tctcagcgag acgtattata tcttctgtc 360
 atcgaaaga taccagcctt gactgaaaat gaccctgaaa ctggatagt ttgtaatttt 420
 tctgtggatc atgacagtgc tcctctaaac aaccgatgtg tccgtgcca aataaatgtt 480
 35 gctatgattt gtcaaacctt ggtaagccca ccagagggaa accaggaaat tagcagggac 540
 aacattctat gcaagattac atatgtagct aatgtgaacc ctggaggatg ggcaccagcc 600
 tcaggttaa gggcagtgcc aaagcgagag tatcctaaat ttctaaacg ttttacttct 660
 tacgtcaa 669

40 humano: proteína con dominio START de CERT (SEC ID N° 17)
 Arg Phe Val Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr
 Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu
 Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile
 45 Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly
 His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp
 Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn
 Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln
 Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr
 Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His
 50 Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val
 Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu
 Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val
 Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys
 Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln

55 humano: proteína con dominio START de CERT L (SEC ID N° 18)
 caggttgaag agatgtgca gaaccacatg acttactcat tacaggatgt aggcggagat 60
 gccaaattgc agttgggtgt agaagaagga gaaatgaagg tatacagaag agaagtagaa 120
 gaaaatggga ttgttctgga tccttataaa gctacccatg cagttaaagg cgtcacagga 180
 60 catgaagtct gcaattattt ctggaatgtt gacgttcgca atgactggga aacaactata 240
 gaaaactttc atgtgtgga aacattagct gataatgcaa tcatcatta tcaaacacac 300
 aagaggggtg gcctgcttc tcagcgagac gtattatc tttctgcat tcgaaagata 360
 ccagcctga ctgaaaatga ccctgaaact tggatagttt gtaattttc tgtggatcat 420
 gacagtgtc ctctaaacaa ccgatgtgtc cgtgcaaaa taaatgttc tatgattgt 480
 65 caaacctgg taagccacc agagggaaac caggaaata gcagggacaa cattctatgc 540
 aagattacat atgtagctaa tgtgaaccct ggaggatggg caccagcctc agtittaagg 600

ES 2 397 274 T3

gcagtggaag agcgagagta tctaaattt ctaaaccgtt ttacttcta cgtccaag 658

humano: proteína con dominio START de CERT L (SEC ID N° 19)
 Gln Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp
 5 Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met
 Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro
 Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys
 Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile
 10 Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile
 Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu
 Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro
 Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro
 Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys
 15 Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp
 Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly
 Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro
 Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln

humano: ADNc de StarD4 (SEC ID N° 20)

20 actgttgaga gcggtgtgag gtgcttgga ggcgcccga gctgctcca cgtccttgc 60
 tcacctcagg taaagagaga agtaatgaa gcctgtctg atgtgcttc tttgcaact 120
 aaacttaaaa acacttcat ccagaccat agcattgaag aagataagt gcgagtgc 180
 aagaaaacga aagatgtaac tgttggaga aaaccctcag aagaattaa tggatatctc 240
 taciaagccc aagggttat agatgacct gtctatagta taatagacca tatacgccc 300
 25 gggccttgc gttggattg ggacagctg atgactctt tggatattc ggagaacttt 360
 gaagagaatt gctgtgat gcgttacct actgctggtc agcttggaa tataattcc 420
 ccaagagaat ttgtgattt ctctatact gtgggctata aagaagggt tttatctgt 480
 ggaataagt ttgactgga tgaagaga ccagaattg ttcaggata taacctccc 540
 tgtggttgg tttgttcc actaaagac aaccxaaacc agagtcttt gacaggat 600
 30 atcagacag atctgctgg gatgattct cagtctgcg tagatacagc catggcaagc 660
 acttaacca acttctatg tgattacga aaagcttat gagaggcaaa atacattcaa 720
 actttagta ctacagatca actctctcag ctacatggcc tgaaaaaatc attgattcca 780
 ctttctgca tagccgtag aaaaattga aatgttttg gttcactagt acaatgttg 840
 gttttatcc taaagtaaat agctatctaa gagagggcat tttcacttt ttttttaa 900
 35 atttgagac aggtctcac tctgttccc atgctggagg gcagtggtat gatcacagct 960
 cactgagct ttgatctgac gcctcaagg gttattctac ctgagcctcc tgaatagctg 1020
 ggaatacagg tgcacggcc tatgcatggc taattttgt taaattttt gtatagatg 1080
 ggtcacactg tttgcccag gctggtctg aactcctggc ctcaagtcac tccccactt 1140
 agcctccaa agtgttggga ttataagcgt gagccaccat gctggcccc aatttaaaat 1200
 40 gtggaattca gttggttcc aagactatc ttgagactc taaaagcacc agtctgtaac 1260
 tagaacaat acagtcttag attacccaa gtccttagat atcatttat aatgattaga 1320
 attgagtatt gtgggtccc taattctgt ggtgcctaa gtgagaattt ctaaatgatt 1380
 ttcactctt aatgacttt gggttttaa ctctcatct agtttactc taaaatggga 1440
 acttgagca atcaggtat ccaggcaaa tttgtatat attttttgt gtacatgcac 1500
 45 acatctgaa atccattcc gtgttaatg ttagtgttt atgtgttagt atctctgtgt 1560
 ctactgtttt gttgttga atatgggtaa agtgagccct gaaatacatg ctaacaaga 1620
 catgaaattc agaaaggtac atagtgttc aagtgcattg tagttgatc tgtgtttac 1680
 tttattgtt tttctgagt gtaaagaaag aataaatcaa agttctcat acccatttg 1740
 acaaagtga acagtggagc tgtttttgc tttttttt attttttt tgccactggt 1800
 50 gatgatagat tcaaaaaac aaaagggtgc agcagcaca ttttcatggt gaattatctc 1860
 atagtatcta gattgatcaa gatctgacag aaggaatgca caaaggattc tatattcta 1920
 atgatttatt aattaccagg atcctttct aattgaatg tactttttaa ttactaggtt 1980
 tcttctttt tttgttctg caatagtga agaaaactca gtatttagt ttcagtttct 2040
 catggaattt gtaaatggt agtttgact tcatctatt tttattgtt ttattagcg 2100
 55 tagagttaga agtctcat tctactgtc tatctaggat ggtgaaattc caaagggtcc 2160
 taactgagt aagggtattg tgacaagata gtacacatta ctataaggc tattattcc 2220
 tgaactggat gtcctaaaa gcaataaac tgcccactat ctct 2264

humano: proteína StarD4 (SEC ID N° 21)

60 Met Glu Gly Leu Ser Asp Val Ala Ser Phe Ala Thr Lys Leu Lys Asn
 Thr Leu Ile Gln Tyr His Ser Ile Glu Glu Asp Lys Trp Arg Val Ala
 Lys Lys Thr Lys Asp Val Thr Val Trp Arg Lys Pro Ser Glu Glu Phe
 Asn Gly Tyr Leu Tyr Lys Ala Gln Gly Val Ile Asp Asp Leu Val Tyr
 Ser Ile Ile Asp His Ile Arg Pro Gly Pro Cys Arg Leu Asp Trp Asp
 65 Ser Leu Met Thr Ser Leu Asp Ile Leu Glu Asn Phe Glu Glu Asn Cys
 Cys Val Met Arg Tyr Thr Thr Ala Gly Gln Leu Trp Asn Ile Ile Ser

Pro Arg Glu Phe Val Asp Phe Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Lys Glu Gly
 Leu Leu Ser Cys Gly Ile Ser Leu Asp Trp Asp Glu Lys Arg Pro Glu
 Phe Val Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Trp Phe Cys Val Pro Leu
 Lys Asp Asn Pro Asn Gln Ser Leu Leu Thr Gly Tyr Ile Gln Thr Asp
 5 Leu Arg Gly Met Ile Pro Gln Ser Ala Val Asp Thr Ala Met Ala Ser
 Thr Leu Thr Asn Phe Tyr Gly Asp Leu Arg Lys Ala Leu

humano: ADNc de StarD5 (SEC ID N° 22)

gagctccagc ctccaggcac ccgggatcca gcgccgccgc tcataacacc cgcgaccccg 60
 10 cagctaagcg cagctcccga cgcaatggac ccggcgctgg cagcccagat gagcgaggct 120
 gtggccgaga agatgctcca gtaccggcg gacacagcag gctggaagat ttgccgggaa 180
 ggcaatggag ttccagttc ctggaggcca tctgtggagt ttccagggaa cctgtaccga 240
 ggagaaggca ttgtatagg gacactagag gaggtgtggg actgtgtgaa gccagctgtt 300
 ggaggcctac gagtgaagtg gtagagaat gtgaccggtt ttgaaattat ccaagcatc 360
 15 actgacacc ttgtgtgaag cagaacctcc actccctccg ctgcatgaa gctcattct 420
 ccagagatt ttgtgactt ggtgctagtc aagagatag aggatgggac catcagttcc 480
 aacgccacc atgtggagca tccgttatgt cccccgaagc caggttttgt gagaggattt 540
 aaccatcctt gtggtgctt ctggaacct ctccagggg aaccaccaa gaccaacctg 600
 gtcacattct tccataccga cctcagcggg tacctcccac agaactggtt ggactcctc 660
 20 ttccccgca gcatgacccg gtttatgcc aacctcaga aagcagtga gcaattccat 720
 gagtaatgct atcgtactt ctggcaaaag aactcccgtg actcatcgag gagctccagc 780
 tgttgggaca ccaaggagcc tgggagcacg cagaggcctg tttcactct ttgaaacaag 840
 ctgatggact gcgcatctt gagaatgcca accagaggcg gcagcccacc ctctctgctt 900
 cctgcccac tcagggttgg cgtgtgatga gccattcatg tttccaac tccatctgcc 960
 25 tttaccaca acacgcctt cctggcagg tagaccagg ccttaacca tctgacagag 1020
 actcgccctg gacaccatgc gatgactct ggaccaagg ctttatgtc ccatcactct 1080
 cagagaccac gttccccta ctgcataga gaatcatcat cgcactgaa aaccaggccc 1140
 tttgtcctt taagcatga ccgctccctc agtctgtgc tcagccccc caaatatatt 1200
 tttctgatat agacctgta tatggcttta atgccgcaa atattattt ttcctaaaa 1260
 30 aagggtgcaa cttggaaata atggttaaa aacaggataa gcattaagga aaaacaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1344

humano: proteina StarD5 (SEC ID N° 23)

Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Met Ser Glu Ala Val Ala Glu Lys
 35 Met Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Thr Ala Gly Trp Lys Ile Cys Arg Glu
 Gly Asn Gly Val Ser Val Ser Trp Arg Pro Ser Val Glu Phe Pro Gly
 Asn Leu Tyr Arg Gly Glu Gly Ile Val Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Val
 Trp Asp Cys Val Lys Pro Ala Val Gly Gly Leu Arg Val Lys Trp Asp
 Glu Asn Val Thr Gly Phe Glu Ile Ile Gln Ser Ile Thr Asp Thr Leu
 40 Cys Val Ser Arg Thr Ser Thr Pro Ser Ala Ala Met Lys Leu Ile Ser
 Pro Arg Asp Phe Val Asp Leu Val Leu Val Lys Arg Tyr Glu Asp Gly
 Thr Ile Ser Ser Asn Ala Thr His Val Glu His Pro Leu Cys Pro Pro
 Lys Pro Gly Phe Val Arg Gly Phe Asn His Pro Cys Gly Cys Phe Cys
 Glu Pro Leu Pro Gly Glu Pro Thr Lys Thr Asn Leu Val Thr Phe Phe
 45 His Thr Asp Leu Ser Gly Tyr Leu Pro Gln Asn Val Val Asp Ser Phe
 Phe Pro Arg Ser Met Thr Arg Phe Tyr Ala Asn Leu Gln Lys Ala Val
 Lys Gln Phe His Glu

humano: ADNc de StarD6 (SEC ID N° 24)

atggacttca aggcaattgc ccaacaaact gcccaagaag ttttaggtta taatcgagat 60
 50 acatcaggct ggaaagtgt taaaacttca aaaaagataa ctggttccag taaggcttct 120
 agaaaattcc atggaatct atatcgtgtt gaagggataa ttccagaatc accagctaaa 180
 ctatctgatt tctctacca aactggagac agaattacat gggataaatc attgcaagtg 240
 tataatatgg tacacaggat tgattcggac acattcatat gtcataccat tacacaaagt 300
 55 ttgccgtgg gctccattc cctcggagac ttatcgact tagtgtacat caagcgtctac 360
 gaaggaaata tgaacattat cagttctaaa agtgtggatt ttccagaata tctccatct 420
 tcaaattata tccgcggtta taaccatcct tgtggctttg tatgtcacc aatggaagaa 480
 aaccagcat attcaaaact agtgatggtt gtccagacag aatgagagg aaaattgtcc 540
 ccatcaataa ttgaaaaaac catgcctcc aactagtaa acttcatct caatgcaaaa 600
 60 gatggaataa aggcacacag aactccatca agacgtggat ttcatcataa tagtcattca 660
 tga 663

humano: proteina StarD6 (SEC ID N° 25)

Met Asp Phe Lys Ala Ile Ala Gln Gln Thr Ala Gln Glu Val Leu Gly
 65 Tyr Asn Arg Asp Thr Ser Gly Trp Lys Val Val Lys Thr Ser Lys Lys
 Ile Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Arg Lys Phe His Gly Asn Leu Tyr

Arg Val Glu Gly Ile Ile Pro Glu Ser Pro Ala Lys Leu Ser Asp Phe
 Leu Tyr Gln Thr Gly Asp Arg Ile Thr Trp Asp Lys Ser Leu Gln Val
 Tyr Asn Met Val His Arg Ile Asp Ser Asp Thr Phe Ile Cys His Thr
 Ile Thr Gln Ser Phe Ala Val Gly Ser Ile Ser Pro Arg Asp Phe Ile
 5 Asp Leu Val Tyr Ile Lys Arg Tyr Glu Gly Asn Met Asn Ile Ile Ser
 Ser Lys Ser Val Asp Phe Pro Glu Tyr Pro Pro Ser Ser Asn Tyr Ile
 Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Phe Val Cys Ser Pro Met Glu Glu
 Asn Pro Ala Tyr Ser Lys Leu Val Met Phe Val Gln Thr Glu Met Arg
 Gly Lys Leu Ser Pro Ser Ile Ile Glu Lys Thr Met Pro Ser Asn Leu
 10 Val Asn Phe Ile Leu Asn Ala Lys Asp Gly Ile Lys Ala His Arg Thr
 Pro Ser Arg Arg Gly Phe His His Asn Ser His Ser

humano: ADNc de PCTP (SEC ID N° 26)

ccggactgcg gaagatgga gctggccgcc ggaagctct cggaggagca gttctgggag 60
 15 ccctgcgccg agctccagca gcccgctctg gccggggccg actggcagct cctagtggag 120
 acctcgggca tcagcatcta ccggctgctg gacaagaaga ctggactca tgagtataaa 180
 gtccttggg tcttgaggga ctgctacca actctactgg cagacatcta tatggactca 240
 gattacagaa aacaatggga ccagtatgtt aaagaactct atgaacaaga atgcaacgga 300
 gagactgtgg tctactggga agtgaagtac cctttccca tgtccaacag agactatgct 360
 20 taccttggcg agcggcgaga cctggacatg gaaggggagga agatccatgt gatcctggcc 420
 cggagcacct ccatgcctca gcttggcgag aggtctgggg tgatccgggt gaagcaatac 480
 aagcagagcc tggcgattga gagtgacggc aagaagggga gcaaagttt catgtattac 540
 ttgataacc cgggtggcca aattccgtcc tggctcatta actgggcccgc caagaatgga 600
 gttcctaact tctgaaaga catggcaaga gcctgtcaga actacctca gaaaacctaa 660
 25 gaaagagaac tgggaacatt gcatccatgg gttgatgtct ctggaagtgc aaccaccaa 720
 tgtctctgga agtgccacct ggaagtgcca cctggaagtg tctctggaag agcaccacc 780
 actgttcagc ctccctgc tgttctgtc ttcagaggcc tacacactac cacatcctt 840
 ctaagcatgt ttgcctgaca tccagtcac tcgtctgctt ccttctcgc tcccccatc 900
 ctgggctggg ctgcctctt ctacagtca atatggggca gactagggaa accittgctt 960
 30 gcttactatt aggaggggaa gtcttcagta gggaacacga tcattccatt gtgcaattt 1020
 acggggatgg gtggcgagg ggacacaaca aaatthaaga atgactattt gggcgggctg 1080
 gctctttgc agcttgtgat tcttccagc tggggagggg ctgctggaag tggcatttcg 1140
 ttacagagctg acttccatg cacccaaact ggatgacgtg ccaatgtcca ttgccttat 1200
 gctttgtgga gctgattagg ctgggattg aggtgataat ccagtaagtc ttcctcgtt 1260
 35 cctactgtg gaggatcagt agctgttatg atccagacc atttgagaa gtatcagagg 1320
 cctgaccgga cacataatac gacaaccaca ttttctca tcatcatga ggaaatggat 1380
 gatttctct tccatattg cactggggga aaggctgctt gtacctca agctttgat 1440
 ttactggaa actgaggcgt caagatggct gtggcagcta gcaaaagcaa agatgctttg 1500
 tgcatagcct tgtgaaaag tatcttcta tgcaataaga tgaatttcc tcccagaata 1560
 40 tttagaaatg tagaaggat aacagttcac agccaggtaa aatthaactg gtggcttaat 1620
 gactctgac ctttttca ggaattctgc ctaagtgtc tgcctttctt accaccaaaa 1680
 agactttag ttttctatg tttctcga atttgtag gtaagtatt tctatgcaa 1740
 aggcacagcc ttgatgatc cagggaaaaa tttaatcac tgtgataat gataatgaac 1800
 ctgattaat aacagaaatt caggatgaa agccacagaa tgggatttat taatgtggga 1860
 45 tacctcagac tgtttgttt cttctggga agaaaagtgt gttctataat gaataaatat 1920
 agagtgttt tt 1932

humano: proteína PCTP (SEC ID N° 27)

Met Glu Leu Ala Ala Gly Ser Phe Ser Glu Glu Gln Phe Trp Glu Ala
 50 Cys Ala Glu Leu Gln Gln Pro Ala Leu Ala Gly Ala Asp Trp Gln Leu
 Leu Val Glu Thr Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Arg Leu Leu Asp Lys Lys
 Thr Gly Leu His Glu Tyr Lys Val Phe Gly Val Leu Glu Asp Cys Ser
 Pro Thr Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Met Asp Ser Asp Tyr Arg Lys Gln
 Trp Asp Gln Tyr Val Lys Glu Leu Tyr Glu Gln Glu Cys Asn Gly Glu
 55 Thr Val Val Tyr Trp Glu Val Lys Tyr Pro Phe Pro Met Ser Asn Arg
 Asp Tyr Val Tyr Leu Arg Gln Arg Arg Asp Leu Asp Met Glu Gly Arg
 Lys Ile His Val Ile Leu Ala Arg Ser Thr Ser Met Pro Gln Leu Gly
 Glu Arg Ser Gly Val Ile Arg Val Lys Gln Tyr Lys Gln Ser Leu Ala
 Ile Glu Ser Asp Gly Lys Lys Gly Ser Lys Val Phe Met Tyr Tyr Phe
 60 Asp Asn Pro Gly Gly Gln Ile Pro Ser Trp Leu Ile Asn Trp Ala Ala
 Lys Asn Gly Val Pro Asn Phe Leu Lys Asp Met Ala Arg Ala Cys Gln
 Asn Tyr Leu Lys Lys Thr

Cultivo y transfección celular

65

Se cultivan células HEK293T y COS7 en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Se transfectan las células HEK293T utilizando el reactivo TransIT293 (Mirus) según las instrucciones del fabricante. Para inmunofluorescencia, se cultivan células COS7 sobre cubreobjetos de vidrio durante 24 horas y se transfectan con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

5 Se cultivan células CHO así como estirpes celulares derivadas de CHO productoras de seroalbúmina bovina (HSA) o un anticuerpo monoclonal humano de IgG en suspensión en medio exento de suero en matraces en T de superficie aireada (Nunc, Dinamarca), en incubadores (Thermo, Alemania) o matraces agitados (Nunc, Dinamarca) a una temperatura de 37°C y en una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

10 Se subcultivan disoluciones madre de siembra cada 2-3 días con densidades de siembra de 2-3E5 células/ml. Se determina la concentración celular en todos los cultivos utilizando un hemocitómetro. Se evalúa la viabilidad mediante el método de exclusión por azul de tripano. Se cultivan todas las células de producción CHO en medios registrados por BI cuya composición no puede revelarse.

Se transfectan células derivadas de CHO utilizando los reactivos Lipofectamine™ y PLUS™ (ambos de Invitrogen, Alemania) según las directrices proporcionadas por el fabricante.

15 Cultivo semicontinuo

20 Se siembran células a 3E05 células/ml en matraces agitados de 125 ml en 30 ml de medio de producción sin antibióticos registrado por BI o MTX (Sigma-Aldrich, Alemania). Se agitan los cultivos a 120 rpm a 37°C y 5% de CO₂, que se reduce después al 2% a medida que aumenta el número de células. Se determinan diariamente los parámetros de cultivo, incluyendo pH, concentraciones de glucosa y lactato, y se ajusta el pH a 7,0 utilizando NaCO₃ según sea necesario. Se añade una disolución de alimentación registrada por BI cada 24 horas. Se determinan las densidades y viabilidad celulares mediante exclusión con azul de tripano utilizando un sistema de cuantificación celular automatizado CEDEX (Innovatis). Se recogen muestras del fluido de cultivo celular los días 3, 5 y 7 y se someten a medida del título por ELISA.

ELISA

30 Se realiza la cuantificación de las moléculas de IgG en el sobrenadante de clones celulares mediante tecnología de ELISA de tipo sándwich. Se recubren las placas de ELISA utilizando un anticuerpo de fragmento Fc de IgG de cabra anti-humano (Dianova, Alemania) a 4°C durante una noche. Después de lavar y bloquear las placas con disolución de 1% de BSA, se añaden las muestras y se incuban durante 1,5 horas. Después de lavar, se añade anticuerpo de detección (anticuerpo de cadena ligera kappa de cabra anti-humano conjugado con fosfatasa alcalina) y se realiza la detección colorimétrica mediante incubación con sal 4-nitrofenilfosfato de disodio hexahidratada (Sigma, Alemania) como sustrato. Después de 20 min de incubación en la oscuridad, se detiene la reacción y se mide inmediatamente la absorbancia utilizando un lector de absorbancia (Tecan, Alemania) con 405/492 nm. Se calcula la concentración según la curva patrón que está presente en cada placa.

40 Se realiza de forma similar la determinación cuantitativa de HSA secretada en muestras de cultivo, utilizando los anticuerpos contenidos en el kit de cuantificación ELISA de albúmina humana (Bethyl Labs, Tejas, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Microscopía de inmunofluorescencia

45 Se lavan células con PBS que contiene magnesio y calcio, se fijan con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 min, se lavan y se incuban con PBS que contiene glicina 0,1 M durante 15 min. Se permeabilizan después las células con PBS que contiene 0,1% de Triton durante 5 min y después se bloquean con 5% de suero de cabra en PBS que contiene 0,1% de Tween-20 durante 30 min. Se incuban las células con anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo durante 2 horas, seguido de incubación con anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo durante 1 hora. Se montan los cubreobjetos en Fluoromount G (Southern Biotechnology) y se analizan las células en un microscopio de barrido láser confocal (TCS SL, Leica) utilizando como excitación 488 y 543 nm y una lente de objetivo 40,0/1,25 HCX PL APO. Las imágenes se procesan con Adobe Photoshop.

55 Extracción, inmunoprecipitación y transferencia Western de proteína

60 Se obtienen extractos de células enteras solubilizando células en tampón de extracción NP40 (NEB) [Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 1% de NP40, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM y glicerofosfato* 20 mM más inhibidores de proteasa Complete]. Se clarifican los lisados mediante centrifugación a 16.000 x g durante 10 min. Para inmunoprecipitaciones, se incuban cantidades iguales de proteína con anticuerpos específicos durante 2 h sobre hielo. Se recogen los complejos inmunes con proteína G-Sepharose (GE Healthcare) y se lavan tres veces con NEB (véase anteriormente). Se hierven los extractos de célula entera o proteínas inmunoprecipitadas en tampón de muestra y se someten a PAGE-SDS. Se transfieren las proteínas a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Roth). Después de bloquear con 0,5% de reactivo de bloqueo (Roche) en PBS que contiene 0,1% de Tween 20, se sondean los filtros con anticuerpos específicos. Se visualizan las proteínas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia potenciada (Pierce). Se realiza la eliminación

de reactivos de las membranas en tampón SDS [Tris 62,5 mM (pH 6,8), 2% de SDS y mercaptoetanol* 100 mM] durante 30 min a 60°C. Se resondean después las membranas con los anticuerpos indicados.

Purificación de proteína recombinante y ensayos de cinasa *in vitro*

5 Se transforman bacterias BL21 con vectores pGEX6P-Flag-CERT(1-138) y CERT-S132A(1-138). Se induce la expresión con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido 0,5 mM durante 4 horas a 30°C. Se recogen las bacterias y se resuspenden en PBS que contiene lisozima 50 µg/ml, inhibidores de proteasa Complete (Roche), fluoruro de sodio 10 mM y b-glicerofosfato de sodio 20 mM. Se añade Triton X-100 a una concentración final del 1% antes de la sonificación. Se purifican las fusiones GST-CERT a partir de lisado clarificado con resina de glutation (GE Healthcare). Se verifica la pureza de las preparaciones de proteína mediante PAGE-SDS y tinción de Coomassie. Se incuban las proteínas recombinantes con PKD1 purificada en tampón cinasa [Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM] en presencia de 2 µCi de [γ-³²P]-ATP o ATP 75 µM frío durante 30 min. Se resuelven las muestras por PAGE-SDS, se transfieren a membrana y se analizan en un Phosphorimager (Molecular Dynamics) o mediante transferencia Western con un anticuerpo anti-sustrato de PKD.

Matrices de PIP

20 Se recogen células HEK293T que expresan transitoriamente variantes CERT con etiqueta GFP en tampón hipotónico [Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasa Complete (Roche), PMSF 1 mM, glicerofosfato* 5 mM y fluoruro de sodio 5 mM] y se cizallan mediante pasada a través de una aguja de calibre 25G/16 mm. Se obtiene la fracción citosólica después de centrifugación a 100.000xg durante 1 h y se cuantifica la cantidad de proteína expresada midiendo la emisión máxima de GFP a 480 - 550 nm (excitación 466 nm). Se bloquean matrices de PIP (Echelon) con TBS-T [Tris 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween-20] que contiene 3% de BSA exento de ácido graso (Roth), seguido de incubación con 500 µg de citosol que contiene cantidades iguales de proteínas GFP (ajustado con citosol de células no transfectadas) en 5 ml de tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se detectan las proteínas unidas mediante incubación con anticuerpo anti-GFP, seguido de anticuerpo secundario conjugado con HRP.

30 Ensayo de transferencia de ceramida *in vitro*

Se mide la transferencia mediada por proteína de ceramida entre SUV como se ha descrito anteriormente (Olayioye et al., 2005). La mezcla de ensayo de transferencia contenía vesículas donantes (2 nmol de lípido/ml) compuestas por lípidos cerebrales porcinos (Avanti Polar Lipids), ceramida C₁₆ marcada con pireno y 2,4,6-trinitrofenilfosfatidiletanolamina (TNP-PE) (88,6:0,4:11% en moles), proporcionada por P. Somerharju, y un exceso de 10 veces de vesículas aceptoras compuestas por lípidos cerebrales porcinos. Se registra la intensidad de fluorescencia a 395 nm (excitación 345 nm; anchuras de rendija, 4 nm) antes y después de la adición de 75 µg de citosol de células HEK293T que expresan transitoriamente proteínas CERT de tipo silvestre y S132A con etiqueta GFP (véase anteriormente). Se normalizan las intensidades de fluorescencia a (i) la intensidad máxima obtenida después de la adición de Triton X-100 (0,5% de concentración final) y (ii) la fluorescencia máxima de GFP, para dar cuenta de los diferentes niveles de expresión.

Ensayo de transporte de HRP

45 Se cotransfectan células HEK293T con plásmido ss-HRP-Flag y vector vacío, pEGFP-N1-PKD1KD, pcDNA3-Flag-CERT wt y pcDNA3-Flag-CERT-S132A a una relación de 1: 6,5, respectivamente. 24 h después de la transfección, se lavan las células con medio exento de suero y se cuantifica la secreción de HRP después de 0, 1, 3 y 6 h mediante la incubación de sobrenadante celular clarificado con reactivo ECL. Se hacen las medidas con un luminómetro (Lucy2, Anthos) a 450 nm.

50 Ensayo de ARNpi

Se transfectan células COS7 con un vector que codifica ssHRP-Flag, se recogen después de 8 horas, se resiembran en pocillos por triplicado y después se transfectan con oligonucleótidos de ARNpi específicos de CERT (CERTpi nº 1, SEC ID Nº 7: 5'-ccacaugacuacuuatt-3'; CERTpi nº 2, SEC ID Nº 8: 5'-gaacagaggaagcauuatt-3') utilizando reactivo Oligofectamine™ (Invitrogen) según las instrucciones de los fabricantes. Se transfectan las células de control ficticiamente o se transfectan con un ARNpi específico de lacZ (SEC ID Nº 9: 5'-gcggcgccggauuuacctt-3'). 48 horas después, se lavan las células y se añade medio reciente. Se mide la cantidad de HRP secretada en el sobrenadante mediante un ensayo quimioluminiscente como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se lisan las células, se agrupan los lisados por triplicado y se analizan mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos de tubulina y receptor de transferrina.

EJEMPLOS

65 EJEMPLO 1: LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE PRODUCTO INDICA UN CUELLO DE BOTELLA SECRETOR.

Se realiza un proceso semicontinuo utilizando tres clones celulares productores CHO diferentes que expresan anticuerpo de IgG humano (proceso A, B y M, respectivamente, véase la FIGURA 1). Se toman muestras celulares cada dos días y se determina la cantidad de anticuerpo intracelular por análisis de FACS. Brevemente, se fijan células utilizando PBS / 4% de PFA, se permeabilizan y se tiñen con anticuerpo de cadena ligera kappa anti-humano conjugado con FITC. Dentro de los cuatro primeros días, el contenido de IgG intracelular continúa a un nivel constante. Sin embargo, del día 5 al 9, el nivel de producto intracelular se eleva constantemente, indicando una acumulación de cadena ligera mal plegada o incluso del producto anticuerpo completo en la célula. Estos datos representan los resultados de tres procesos de producción independientes con diferentes clones celulares productores y sugieren firmemente que la célula transcribe más ARN de anticuerpo que proteínas secretadas al medio, y por tanto apunta a un cuello de botella post-traducciona que obstaculiza la secreción completa del anticuerpo producido (FIGURA 1).

EJEMPLO 2: LA CERT SE DETECTA POR UN ANTICUERPO DE SUSTRATO DE PKD.

La PKD es un regulador clave en el complejo de Golgi, siendo PI4KIII β el único sustrato local identificado hasta ahora. Para ensayar si la proteína CERT localizada en el complejo de Golgi (SEC ID N^o 11 y 13) puede servir como sustrato para la PKD, se hizo uso de un anticuerpo fosfoespecífico de sustrato, denominado pMOTIF, creado contra restos de consenso fosforilados por PKD (Doppler et al., 2005). Se transfectan células HEK293T con vectores de expresión que codifican CERT (SEC ID N^o 10) y CERT_L (SEC ID N^o 12) con etiqueta Flag. Se inmunoprecipitan las isoformas de CERT con anticuerpos específicos de Flag y se analizan mediante transferencia Western con el anticuerpo pMOTIF (FIGURA 4A). Se detecta una señal pMOTIF correspondiente al peso molecular de CERT (SEC ID N^o 11) y, más débilmente, al de CERT_L (SEC ID N^o 13). La detección más débil de la isoforma CERT_L fosforilada puede estar relacionada con su conocido comportamiento de formar agregados, que puede tener repercusión sobre la accesibilidad a fosfotios de las cinasas (Raya et al., 2000).

Para investigar si el reconocimiento de CERT por el anticuerpo pMOTIF depende de PKD, se expresa CERT junto con una variante cinasa inactivada de PKD1 (K621W) en células HEK293T. Se ha mostrado que este mutante se localiza en el complejo de Golgi y suprime la fosforilación de PI4KIII β de manera dominante negativa (Hausser et al., 2005). La coexpresión de PKD anula la detección de CERT con el anticuerpo pMOTIF, sugiriendo que la señal pMOTIF es debida realmente a la fosforilación de CERT mediada por PKD (FIGURA 4B).

Se cree que las proteínas de transferencia de lípido actúan en sitios de contacto de membrana, que se forman entre el ER y la TGN (Levine y Loewen, 2006), donde se localiza la PKD. La tinción por inmunofluorescencia de CERT con etiqueta Flag en células COS7 coexpresadas con PKD1 con etiqueta GFP verifica que las dos proteínas se colocalizan en el complejo de Golgi (FIGURA 4C). Conjuntamente, estos datos confirman que la CERT es un sustrato de la PKD en el aparato de Golgi.

EJEMPLO 3: LA PKD FOSFORILA LA CERT EN LA SERINA 132.

Para identificar los sitios de reconocimiento de pMOTIF en CERT, se buscan restos de consenso de PKD potenciales caracterizados por un resto de leucina, isoleucina o valina en posición -5 y de arginina en posición -3 respecto a una serina o treonina. Se intercambian por alaninas dos serinas en las posiciones 132 y 272, coincidentes con el resto de consenso de PKD y conservadas entre especies (FIGURA 5A), mediante mutagénesis dirigida a sitio. Se expresan estos mutantes en células HEK293T y se ensaya el reconocimiento por el anticuerpo pMOTIF. De forma interesante, la mutación de la serina 132 a alanina anula la detección de CERT con el anticuerpo pMOTIF y causa un aumento de la movilidad electroforética indicativo de una pérdida de fosforilación, mientras que la mutación S272A no afecta a la señal pMOTIF (FIGURA 5B). Esto sugiere que la serina 132 es un sitio de fosforilación de PKD reconocido específicamente por el anticuerpo de sustrato de PKD. Para confirmar que la PKD es capaz de fosforilar directamente este resto de serina en CERT, se realizan ensayos de cinasa *in vitro* con PKD1 purificada y proteínas de fusión CERT GST recombinantes producidas en *E. coli* que comprenden los primeros 138 aminoácidos de la proteína. Cuando se incuba la proteína de fusión de CERT de tipo silvestre truncada con PKD1 en presencia de [γ -³²P]-ATP, se detecta la incorporación de radiactividad (FIGURA 5C). Esto se altera significativamente en el caso de la proteína de fusión CERT-S132A. Se muestra adicionalmente que la fosforilación *in vitro* por PKD de CERT de tipo silvestre pero no de CERT-S132A (SEC ID N^o 15) genera un sitio de reconocimiento para el anticuerpo pMOTIF (FIGURA 5D). Tomados en conjunto, estos resultados prueban que la CERT es un sustrato genuino de PKD *in vitro* e *in vivo* e identifica a la serina 132 como un sitio de fosforilación específico de PKD en CERT.

EJEMPLO 4: LA FOSFORILACIÓN DE CERT EN LA SERINA 132 MODULA LA UNIÓN A PI(4)P Y LA ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA DE CERAMIDA.

La serina 132 está en muy estrecha proximidad con el dominio PH de CERT (aminoácidos 23 - 117), haciendo posible que la fosforilación en este sitio afecte a la unión a PI(4)P aumentando la carga negativa local. Por lo tanto, se cuantifica la unión a PI(4)P de CERT de tipo silvestre y mutante CERT-S132A (SEC ID N^o15) realizando ensayos de superposición de proteína-lípido. En estos, se incuban citosol de células HEK293T que expresan transitoriamente las variantes de CERT con membranas puntuadas con un gradiente de concentración de las diferentes fosoinositidas y se detectan las proteínas CERT unidas mediante su etiqueta GFP. Como se reseñó anteriormente, la proteína de tipo silvestre completa demuestra una unión débil a varias especies de fosfolípido, pero exhibe una

interacción fuerte con PI(4)P (Hanada et al., 2003; Levine y Munro, 2002). La unión de CERT-S132A a PI(4)P es detectable a concentraciones de dos a cuatro veces menores en comparación con la de proteína de tipo silvestre, sugiriendo una afinidad aumentada del mutante CERT-S132A por este fosfolípido (FIGURA 6A).

Conjuntamente, estos datos implican que la CERT, una vez unida al complejo de Golgi, se fosforila por la PKD. Esto reduce entonces la afinidad de CERT por PI(4)P y regula así la interacción de CERT con las membranas de Golgi.

Ya que se ha mostrado que la CERT funciona como una proteína de transferencia de lípido (Hanada et al., 2003), se investiga si la fosforilación de CERT en la serina 132 inflúa en su capacidad de unirse a y transferir ceramida entre membranas. Con este fin, se expresan transitoriamente versiones con etiqueta GFP de CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10) y CERT-S132A (SEC ID N° 14) en células HEK239T, y se analiza en la fracción citosólica la actividad de transferencia de lípido específica de ceramida utilizando un ensayo basado en FRET (FIGURA 6B). En este ensayo, se emplean vesículas unilamelares pequeñas que contienen ceramida marcada con pireno como donante fluorescente y cantidades inactivantes de TNP-PE marcada en el grupo de cabeza (Olayioye et al., 2005; Somerharju, 2002). Cuando se mezclan estos liposomas donantes con un exceso de liposomas aceptores, el aumento en la fluorescencia del pireno es despreciable, indicando una transferencia de ceramida espontánea mínima a membranasceptoras (datos no mostrados).

Tras la adición de citosol que contiene CERT de tipo silvestre, se observa un aumento constante de fluorescencia, que no se observa cuando se utiliza citosol de control de células transfectadas con vector (FIGURA 6B). Comparada con la proteína de tipo silvestre, la CERT-S132A (SEC ID N° 15) exhibe una mayor velocidad de transferencia de lípido, evidente por un aumento más rápido en la fluorescencia del pireno. Esto sugiere que la fosforilación de CERT en la serina 132 regula negativamente la actividad de transferencia de ceramida reduciendo la asociación de la proteína con membranas.

Los datos anteriores han mostrado ya que la PKD regula el nivel de PI(4)P en el complejo de Golgi mediante activación mediada por fosforilación de PI4KIII β (Hausser et al., 2005). De forma interesante, la PI4KIII β es crítica para el transporte de ceramida entre el ER y el complejo de Golgi (Toth et al., 2006). En consecuencia, junto con los datos presentados aquí, resulta evidente un papel dual de la PKD en el mantenimiento de la homeostasis lipídica de membranas de Golgi mediante el control de la asociación (mediante los niveles de PI(4)P) y la disociación (mediante la fosforilación directa) de CERT.

EJEMPLO 5: LA CERT REGULA LA ACTIVACIÓN Y TRANSPORTE SECRETOR DE LA PKD.

Se teoriza que la sobreexpresión de CERT por transferencia de ceramida debería dar como resultado niveles elevados de DAG y podría estimular en consecuencia la actividad PKD. Para ensayar esto, se expresan transitoriamente CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10) y CERT-S132A (SEC ID N° 14) con etiqueta Flag en células HEK293T. Se preparan lisados de células enteras 24 h después de la transfección y se someten a PAGE-SDS. Se analiza la activación de PKD mediante inmunotransferencia con anticuerpo pS916 fosfoespecífico de PKD (FIGURA 7A, panel superior). Se verifica una carga igual mediante resonado con anticuerpo específico de PKD (FIGURA 7A panel medio). Se verifica la expresión de proteínas CERT mediante inmunotransferencia con anticuerpo específico de Flag (FIGURA 7A, panel inferior). Comparado con el control, la expresión de CERT de tipo silvestre así como de CERT-S132A aumentó la actividad PKD, como se revela mediante análisis con un anticuerpo fosfoespecífico de PKD. Esto muestra que la activación de PKD está regulada por proteínas CERT, probablemente debido a un suministro de ceramida aumentado y síntesis de SM/DAG reforzada.

Para enfrentarse a la pregunta de si la activación de PKD mediada por CERT se traduce realmente en un transporte secretor potenciado, se hace uso de un plásmido que codifica peroxidasa de rábano picante secretada (HRP-ss), que puede utilizarse como indicador para la secreción constitutiva de proteína. Se cotransfectan células HEK293T con un plásmido de expresión que codifica Flag-ss-HRP o vector vacío, y cinasa PKD1-GFP inactivada (KD), Flag-CERT de tipo silvestre (WT) y Flag-CERT-S132A, respectivamente. 24 horas después de la transfección, se lavan las células y se añade medio reciente. Se analiza en el sobrenadante la actividad peroxidasa después de 0, 1, 3 y 6 h por quimioluminiscencia. En las células de control, podía detectarse la secreción de ss-HRP al cabo de 1 hora, y aumentaba con el tiempo (FIGURA 7B). La coexpresión de cinasa PKD1 inactivada, que inhibe el transporte secretor de proteína de carga casi enteramente, anula la secreción de ss-HRP en el sobrenadante. Esto confirma que la HRP se secreta de manera dependiente de PKD en este ensayo. En contraposición, la coexpresión de CERT de tipo silvestre y CERT-S132A aumentó firmemente la cantidad de HRP secretada (FIGURA 7B), mostrando el mutante valores incluso ligeramente mayores que la CERT de tipo silvestre. Este experimento demuestra que la sobreexpresión de CERT estimula la fosforilación de PKD y, en un ensayo funcional, potencia la secreción de una proteína extracelular al medio de cultivo en aproximadamente 2 veces.

Se investiga además si la sobreexpresión del mutante CERT-S132A afectó a su localización y/o causó cambios morfológicos en el aparato de Golgi. Se ha demostrado que la CERT se colocaliza con el marcador cis/medial de Golgi GS28 (Hanada et al., 2003).

El análisis de inmunofluorescencia de CERT con etiqueta GFP expresada en células COS7 muestra que la proteína se localiza en las regiones de Golgi positivas de GS28 (FIGURA 7C). En contraposición, además de la colocalización parcial con GS28 en el complejo de Golgi, la proteína mutante CERT-S132A exhibía una tinción dispersa puntual. Ha de observarse que se ha encontrado que algunas de estas estructuras vesiculares contienen la proteína de carga ss-HRP, proporcionando pruebas de que estas estructuras representan realmente vehículos de transporte derivados

de Golgi (FIGURA 7D). Este descubrimiento está de acuerdo con los cambios observados en la estructura de la membrana de Golgi debido a aumentos locales de los niveles de ceramida (Fukunaga et al., 2000; Weigert et al., 1999).

5 EJEMPLO 6: LA REGULACIÓN NEGATIVA DE CERT POR ARN INTERFERENTES INHIBE EL TRANSPORTE SECRETOR.

Los datos presentados hasta ahora en la presente invención demostraban claramente que la sobreexpresión de CERT potencia la secreción de proteína. Para investigar si también es cierto lo contrario, lo que significa que una expresión reducida de CERT daría como resultado una secreción reducida, se realizan experimentos con ARNpi. Se transfectan células COS7 con un vector que codifica ssHRP-Flag, se recogen después de 8 horas, se resiembran en pocillos por triplicado y después se transfectan con oligonucleótidos de ARNpi específicos de CERT (SEC ID N° 7 y 8) o ARNpi ficticios o específicos de lacZ (SEC ID N° 9) como controles. 48 h después, se lavan las células, se cubren con medio reciente y se mide la cantidad de HRP secretada en el sobrenadante después de los tiempos indicados.

Como se muestra en la FIGURA 8A, se detecta la actividad HRP después de 3 horas y muestra niveles comparativamente iguales en ambas células de control. En contraposición, se mide una reducción drástica de la actividad HRP en células que se habían tratado con cualquiera de los oligonucleótidos de ARNpi específicos de CERT. Esto indica que niveles reducidos de CERT conducen a una secreción reducida de HRP de las células y además subraya el importante papel de la CERT en el transporte secretor.

De forma interesante, no sólo la secreción de proteína, sino también la abundancia de la proteína transmembrana receptor de transferrina se afecta por la reducción de CERT (FIGURA 8B). Cuando se agrupan las células de la FIGURA 8A y se sondan los lisados con anticuerpos específicos de receptor de transferrina en experimentos de transferencia Western, resulta evidente una gran reducción de la cantidad de receptor de transferrina, mientras que se detectan niveles de receptor de transferrina similares en ambas células de control.

Este descubrimiento sugiere que la proteína de transferencia de lípido CERT no sólo está implicada en el transporte de proteínas secretadas, sino también en el de proteínas de superficie celular presentes en la membrana. Esto no debería ser sorprendente, ya que ambos tipos de proteína se transportan igualmente en vesículas lipídicas desde el RE a través de Golgi a la membrana plasmática, y por tanto utilizan las mismas rutas de salida celular que, como se demuestra en la presente invención por vez primera, están influidas por la CERT.

EJEMPLO 7: LA SOBREEXPRESIÓN DE CERT AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA BIOFARMACÉUTICA DE UN ANTICUERPO.

(a) Se transfecta una estirpe celular CHO productora de anticuerpo (CHO DG44) que secreta anticuerpo de IgG BIWA 4 humanizado anti-CD44v6 con un vector vacío (control ficticio) o constructos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 y 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14), y se somete posteriormente a selección para obtener agrupamientos celulares estables. Durante las 6 pasadas posteriores, se toma sobrenadante de los cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables, se determina el título de IgG por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica (FIGURA 10A). Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT (SEC ID N° 14), seguido de CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12). En ambos, la expresión de IgG está notablemente potenciada en comparación con células ficticias o no transfectadas. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua (FIGURA 10B). En cada uno de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de anticuerpo, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o en cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

(b) Se transfectan en primer lugar células CHO (CHO DG44) con vectores que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14). Se someten las células a presión de selección y se recogen las estirpes celulares que demuestran expresión heteróloga de CERT o el mutante de CERT. Posteriormente, se transfectan estas estirpes celulares y en paralelo células de tipo silvestre CHO DG 44 con vectores que codifican el anticuerpo de IgG BIWA 4 humanizado anti-CD44v6 como gen de interés. Después de una segunda serie de selección, se toma el sobrenadante de cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables durante el periodo de las 6 pasadas posteriores, se determina el título de IgG por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT (SEC ID N° 14), seguido de CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12). En ambos, la expresión de IgG está notablemente potenciada en comparación con células que no tienen expresión heteróloga de CERT o mutante de CERT. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de anticuerpo, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de células crecidas en cultivos en serie o en cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

Esto indica que la expresión heteróloga de CERT, y especialmente de CERT mutante, puede potenciar la secreción de anticuerpo en estirpes celulares CHO transfectadas transitoria así como establemente.

EJEMPLO 8: LA SOBREEXPRESIÓN DE CERT AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA BIOFARMACÉUTICA PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS 1 (MCP-1).

5 (a) Se transfecta una estirpe de células CHO (CHO DG44) que secreta proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) con un vector vacío (control ficticio) o constructos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 y 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N°14) y se somete posteriormente a selección, obteniéndose agrupamientos celulares estables. Durante las 6 pasadas posteriores, se toma sobrenadante de los cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables, se determina el título de MCP-1 por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, seguido de CERT de tipo silvestre. En ambos, la expresión de IgG está notablemente potenciada en comparación con células ficticias o no transfectadas. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de MCP-1, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

10 (b) Se transfectan en primer lugar células anfitrionas CHO (CHO DG44) con vectores que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14). Se someten las células a presión de selección y se recogen las estirpes celulares que demuestran expresión heteróloga de CERT o de mutante de CERT. Posteriormente, se transfectan estas estirpes celulares y en paralelo células de tipo silvestre CHO DG 44 con un vector que codifica la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) como gen de interés. Después de una segunda serie de selección, se toma el sobrenadante de cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables durante el periodo de las 6 pasadas posteriores, se determina el título de MCP-1 por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, seguido de CERT de tipo silvestre. En ambos, la expresión de MCP-1 está notablemente potenciada en comparación con células que no tienen la expresión heteróloga de CERT o mutante de CERT. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de anticuerpo, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

15 Esto indica que la expresión heteróloga de CERT, y especialmente de CERT mutante, puede potenciar la secreción de proteínas unicelulares en estirpes celulares CHO transfectadas transitoria así como establemente.

EJEMPLO 9: LA SOBREEXPRESIÓN DE CERT AUMENTA LA PRODUCCIÓN BIOFARMACÉUTICA DE LA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPITELIAL (EGFR).

20 (a) Se transfecta una estirpe celular CHO (CHO DG44 que expresa la proteína transmembrana receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR)) con un vector vacío (control ficticio) o constructos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID n° 10 y 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N°14) y se somete posteriormente a selección para obtener agrupamientos celulares estables. Durante las 6 pasadas posteriores, se toman células de cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables y se determina el nivel de expresión de EGFR por FACS o transferencia Western. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, seguido de CERT de tipo silvestre. En ambos, la expresión de EGFR está notablemente potenciada en comparación con células ficticias o no transfectadas. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una expresión aumentada de EGFR, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

25 (b) Se transfectan en primer lugar células anfitrionas CHO (CHO DG44) con vectores que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14). Se someten las células a presión de selección y se recogen las estirpes celulares que demuestran expresión heteróloga de CERT o de mutante de CERT. Posteriormente, se transfectan estas estirpes celulares y en paralelo células de tipo silvestre CHO DG 44 con un vector que codifica EGFR como gen de interés. Después de una segunda serie de selección, se toman células de los cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables durante 6 pasadas consecutivas y se determina el nivel de expresión de EGFR por FACS o transferencia Western. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, seguido de CERT de tipo silvestre. En ambos, la expresión de EGFR está notablemente potenciada en comparación con células que no tienen la expresión heteróloga de CERT o de mutante de CERT. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una expresión aumentada de EGFR, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

30 Esto indica que la expresión heteróloga de CERT, y especialmente de CERT mutante, puede potenciar la expresión de receptores de superficie en estirpes celulares CHO transfectados transitoria así como establemente.

EJEMPLO 10: LA SOBREEXPRESIÓN DE STARD4 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA BIOFARMACÉUTICA DE UN ANTICUERPO.

5 (a) Se transfecta una estirpe celular CHO productora de anticuerpo (CHO DG44) que secreta anticuerpo de IgG BIWA 4 humanizado anti-CD44v6 con un vector vacío (control ficticio) o constructos de expresión que codifican StarD4 (SEC ID N° 20) y se somete posteriormente a selección para obtener agrupamientos celulares estables. Durante las 6 pasadas posteriores, se toma sobrenadante de los cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables, se determina el título de IgG por ELISA y se divide entre el número medio de
10 células para calcular la productividad específica. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan StarD4. La expresión de IgG está notablemente potenciada en comparación con células ficticias o no transfectadas. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de StarD4 es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

15 b) Se transfectan en primer lugar células anfitrionas CHO (CHO DG44) con vectores que codifican StarD4. Se someten las células a presión de selección y se recogen las estirpes celulares que demuestran expresión heteróloga de StarD4. Posteriormente, se transfectan estas estirpes celulares y en paralelo células de tipo silvestre CHO DG 44 con vectores que codifican anticuerpo de IgG BIWA 4 humanizado anti-CD44v6 como gen de interés. Después de
20 una segunda serie de selección, se toma sobrenadante de cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables durante el periodo de las 6 pasadas posteriores, se determina el título de IgG por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan StarD4. La expresión de IgG está notablemente potenciada en comparación con las células que no tienen expresión heteróloga de StarD4. Pueden obtenerse resultados muy
25 similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de StarD4 es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor. Esto indica que la expresión heteróloga de StarD4 puede potenciar la secreción de anticuerpo en estirpes celulares CHO transfectadas transitoria así como establemente.

30 **EJEMPLO 11: LA SOBREEXPRESIÓN DE CERT AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA BIOFARMACÉUTICA SEROALBÚMINA HUMANA (HSA).**

35 (a) Se transfecta una estirpe celular CHO (CHO DG44) que secreta la proteína monocatenaria HSA con un vector vacío (control ficticio) o constructos de expresión que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 y 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14) y se somete posteriormente a selección, obteniéndose agrupamientos celulares estables. Durante las 4 pasadas posteriores, se toma sobrenadante de los cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables, se determina el título de HSA por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica (FIGURA 11A).

40 Tanto los títulos de HSA como la productividad específica de las células productoras de HSA están significativamente potenciadas por la expresión heteróloga de ambas variantes de CERT en comparación con el control transfectado ficticiamente. Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, que conduce a un aumento de la productividad específica de un 51% y a un aumento del título de HSA de un 46% por encima del control, seguido de CERT de tipo silvestre que aumenta la productividad específica un 49%.

45 Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua (FIGURA 11B). En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión de CERT tanto de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de HSA, indicando que la CERT es capaz de potenciar la capacidad de producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o en condiciones de producción industrial tales como en cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

50 (b) y (c) Se transfectan en primer lugar células anfitrionas CHO (CHO DG44) con vectores que codifican CERT de tipo silvestre (SEC ID N° 10 o 12) o un mutante de CERT que porta la mutación puntual Ser132A (SEC ID N° 14). Se someten las células a presión de selección y se recogen las estirpes celulares que demuestran la expresión heteróloga de CERT o el mutante de CERT. Posteriormente, se transfectan estas estirpes celulares y en paralelo células de tipo silvestre CHO DG 44 con un vector que codifica seroalbúmina humana como gen de interés. Después
55 de una segunda serie de selección, se toma sobrenadante de cultivos madre de siembra de todos los agrupamientos celulares estables durante el periodo de las 6 pasadas posteriores, se determina el título de HSA por ELISA (FIGURA 11 C) y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica (FIGURA 11B). Se observan los valores más altos en los agrupamientos celulares que albergan el mutante de CERT, seguido de CERT de tipo silvestre. En ambos, la expresión de HSA está notablemente potenciada en comparación con
60 células que no tienen la expresión heteróloga de CERT o mutante de CERT. Pueden obtenerse resultados muy similares si se someten los transfectantes estables a fermentaciones por lotes o semicontinua. En cada una de estas disposiciones, la sobreexpresión tanto de de CERT de tipo silvestre como mutante conduce a una secreción aumentada de anticuerpo, indicando que la CERT es capaz de potenciar la producción específica de las células crecidas en cultivos en serie o en cultivos por lotes o semicontinuo en biorreactor.

65 Esto indica que la expresión heteróloga de CERT, y especialmente de CERT mutante, puede potenciar la secreción de proteínas monocatenarias en estirpes celulares CHO transfectadas transitoria así como establemente.

Referencias

1. al-Rubeai, M. y Singh, R.P. (1998). "Apoptosis in cell culture". *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 152-156.
- 5 2. Alpy, F. y Tomasetto, C. (2005), "Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals". *J. Cell Sci.* 118, 2791-2801.
3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
4. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (2002). "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons, Inc.).
- 10 5. az Anel, A.M. y Malhotra, V. (2005). "PKC ϵ is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus". *J. Cell Biol.* 169, 83-91.
6. Bard, F., Casano, L., Mallabiabarrena, A., Wallace, E., Saito, K., Kitayama, H., Guizzunti, G., Hu, Y., Wendler, F., Dasgupta, R., Perrimon, N. y Malhotra, V. (2006). "Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization". *Nature* 439, 604-607.
- 15 7. Barnes, L.M., Bentley, C.M., Moy, N. y Dickson, A.J. (2007). "Molecular analysis of successful cell line selection in transfected GS-NS0 myeloma cells". *Biotechnol. Bioeng.* 96, 337-348.
8. Barnes, L.M. y Dickson, A.J. (2006). "Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression". *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 381-386.
- 20 9. Baron, C.L. y Malhotra, V. (2002). "Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane". *Science* 295, 325-328.
10. Blobel, C.P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development". *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.
11. Borth, N., Mattanovich, D., Kunert, R. y Katinger, H. (2005). "Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line". *Biotechnol. Prog.* 21, 106-111.
- 25 12. Brewer, J.W. y Hendershot, L.M. (2005). "Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response". *Nat Immunol* 6, 23-29.
13. Chen-Kiang, S. (2003). "Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis". *Immunol. Rev.* 194, 39-47.
- 30 14. Chiang, G.G. y Sisk, W.P. (2005). "Bcl-x(L) mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells". *Biotechnol. Bioeng.* 91, 779-792.
15. Davis, R., Schooley, K., Rasmussen, B., Thomas, J. y Reddy, P. (2000). "Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells". *Biotechnol. Prog.* 16, 736-743.
- 35 16. Doppler, H., Storz, P., Li, J., Comb, M.J. y Toker, A. (2005). "A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D". *J. Biol. Chem.* 280, 15013-15019.
17. Dörner, A.J. y Kaufman, R.J. (1994). "The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins". *Biologicals* 22, 103-112.
18. Egeblad, M. y Werb, Z. (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression". *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- 40 19. Fukunaga, T., Nagahama, M., Hatsuzawa, K., Tani, K., Yamamoto, A. y Tagaya, M. (2000). "Implication of sphingolipid metabolism in the stability of the Golgi apparatus". *J. Cell Sci.* 113 (*Pt 18*), 3299-3307.
20. Hanada, K. (2006). "Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide". *Mol. Cell Biochem.* 286, 23-31.
- 45 21. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. y Nishijima, M. (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide". *Nature* 426, 803-809.
22. Hanahan, D. y Weinberg, R.A. (2000). "The hallmarks of cancer". *Cell* 100, 57-70.
23. Harris y Angal (1995). "Protein Purification Methods". IRL Press).
24. Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K. y Johannes, F.J. (2002). "Structural requirements for localization and activation of protein kinase C μ (PKC μ) at the Golgi compartment". *J. Cell Biol* 156, 65-74.
- 50 25. Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A. y Pfizenmaier, K. (2005). "Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex". *Nat. Cell Biol.* 7, 880-886.
- 55 26. Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G. y James, D.C. (1999). "Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN- γ in Chinese hamster ovary and insect cells". *Biotechnol. Bioeng.* 63, 559-572.
27. Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L.E., Wong, J.Y., Shively, J.E. y Wu, A.M. (1996). "Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts". *Cancer Res.* 56, 3055-3061.
- 60 28. Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. y (1988), "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 5879-5883.

29. Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M.P., Naven, T.J., Rozengurt, E. y Schiavo, G. (2000). "Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D". *J. Biol. Chem.* 275, 40048-40056.
30. Iwakoshi, N.N., Lee, A.H. y Glimcher, L.H. (2003). "The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response". *Immunol Rev* 194, 29-38.
- 5 31. Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P. y Balaji, K.C. (2005). "E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C μ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer". *Cancer Res.* 65, 483-492.
32. Kaufmann y Fussenegger (2003). "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells".
- 10 33. Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M. y Hanada, K. (2006). "Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT". *J. Biol Chem.* 281, 30279-30288.
34. Kortt, A.A., Lah, M., Oddie, G.W., Gruen, C.L., Burns, J.E., Pearce, L.A., Atwell, J.L., McCoy, A.J., Howlett, G.J., Metzger, D.W., Webster, R.G. y Hudson, P.J. (1997). "Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer". *Protein Eng* 10, 423-433.
- 15 35. Levine, T. y Loewen, C. (2006), "Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly". *Curr. Opin. Cell Biol* 18, 371-378.
36. Levine, T.P. y Munro, S. (2002). "Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components". *Curr. Biol.* 12, 695-704.
- 20 37. Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van, L.J. y Malhotra, V. (2001). "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network". *Cell* 104, 409-420.
38. Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H. y Lev, S. (2005). "Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function". *Nat. Cell Biol.* 7, 225-234.
- 25 39. Loewen, C.J., Roy, A. y Levine, T.P. (2003). "A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP". *EMBO J.* 22, 2025-2035.
40. Lottspeich y Zorbas (1998). libro ?
41. Lovejoy, B., Choe, S., Cascio, D., McRorie, D.K., DeGrado, W.F. y Eisenberg, D. (1993). "Crystal structure of a synthetic triple-stranded alpha-helical bundle". *Science* 259, 1288-1293.
- 30 42. Madden, T.L., Tatusov, R.L. y Zhang, J. (1996). "Applications of network BLAST server". *Methods Enzymol.* 266, 131-141.
43. Maeda, Y., Beznoussenko, G.V., Van, L.J., Mironov, A.A. y Malhotra, V. (2001). "Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain". *EMBO J.* 20, 5982-5990.
44. Olayioye, M.A., Vehring, S., Muller, P., Herrmann, A., Schiller, J., Thiele, C., Lindeman, G.J., Visvader, J.E. y Pomorski, T. (2005). "StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein". *J. Biol. Chem.* 280, 27436-27442.
- 35 45. Overall, C.M. y Kleifeld, O. (2006). "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy". *Nat Rev Cancer* 6, 227-239.
46. Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knupfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D. y Pluckthun, A. (1993). "Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*". *Biotechnology (N. Y.)* 11, 1271-1277.
- 40 47. Pack, P., Muller, K., Zahn, R. y Pluckthun, A. (1995). "Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 246, 28-34.
48. Pak, C.O., Hunt, M.N., Bridges, M.W., Sleigh, M.J. y Gray, P.P. (1996). "Super-CHO-A cell line capable of autocrine growth under fully defined protein-free conditions". *Cytotechnology* V22, 139-146.
- 45 49. Perisic, O., Webb, P.A., Holliger, P., Winter, G. y Williams, R.L. (1994). "Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment". *Structure.* 2, 1217-1226.
50. Perry, R.J. y Ridgway, N.D. (2005). "Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport". *Biochim. Biophys. Acta* 1734, 220-234.
- 50 51. Raya, A., Revert-Ros, F., Martínez-Martínez, P., Navarro, S., Rosello, E., Vieites, B., Granero, F., Forteza, J. y Saus, J. (2000). "Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis". *J. Biol. Chem.* 275, 40392-40399.
52. Robert Scopes (1988). "Protein Purification". (Springer-Verlag).
53. Rykx, A., De, K.L., Mikhailap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R. y Van, L.J. (2003). "Protein kinase D: a family affair". *FEBS Lett.* 546, 81-86.
- 55 54. Sambrook, J., Fritsch, d.F., y Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
55. Schroder, M. (2006). "The unfolded protein response". *Mol Biotechnol.* 34, 279-290.
56. Seth, G., Hossler, P., Yee, J.C. y Hu, W.S. (2006). "Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals". *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 101, 119-164.
- 60 57. Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H. y Staudt, L.M. (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation". *Immunity.* 21, 81-93.
- 65 58. Soccio, R.E. y Breslow, J.L. (2003). "StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism". *J. Biol Chem.* 278, 22183-22186.

59. Somerharju, P. (2002). "Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology". *Chem. Phys. Lipids* 116, 57-74.
60. Tigges, M. y Fussenegger, M. (2006). "Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells". *Metab Eng.*
- 5 61. Toth, B., Balla, A., Ma, H., Knight, Z.A., Shokat, K.M. y Balla, T. (2006). "Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi". *J. Biol. Chem.* 281, 36369-36377.
62. Tsujishita, Y. y Hurley, J.H. (2000). "Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain". *Nat. Struct. Biol.* 7, 408-414.
- 10 63. Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M. y Chasin, L.A. (1983). "Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells". *Cell* 33, 405-412.
64. Vega, R.B., Harrison, B.C., Meadows, E., Roberts, C.R., Papst, P.J., Olson, E.N. y McKinsey, T.A. (2004). "Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5". *Mol. Cell Biol.* 24, 8374-8385.
- 15 65. Wang, Q.J. (2006). "PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling". *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 317-323.
66. Wang, Y., Waldron, R.T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M.M., Rozengurt, E. y Colicelli, J. (2002). "The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins". *Mol. Cell Biol.* 22, 916-926.
- 20 67. Weigert, R., Silletta, M.G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K.N., Mironov, A., Luini, A. y Corda, D. (1999). "CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid". *Nature* 402, 429-433.
68. Werner, R.G. (2004). "Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals". *J. Biotechnol.* 113, 171-182.
69. Wirtz, K.W. (2006). "Phospholipid transfer proteins in perspective". *FEBS Lett.* 580, 5436-5441.
- 25 70. Wurm, F.M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells". *Nat. Biotechnol.* 22, 1393-1398.
71. Yeaman, C., Ayala, M.I., Wright, J.R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W.J. y Malhotra, V. (2004). "Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network". *Nat. Cell Biol.* 6, 106-112.
- 30 72. Zhang, J. y Madden, T.L. (1997). "PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation". *Genome Res.* 7, 649-656.

REIVINDICACIONES

- 1.- Método de producción de una proteína de interés heteróloga en una célula, que comprende
 5 aumentar la expresión o actividad de una proteína que tiene una secuencia
 aminoacídica que comprende la proteína de transferencia de ceramida CERT o un derivado o mutante de la misma,
 y
 b. efectuar la expresión de dicha proteína de interés,
 en donde dicho derivado es una molécula de polipéptido que es al menos un 70% idéntica en la secuencia con la
 10 secuencia CERT original o su secuencia complementaria, o dicho derivado es una secuencia CERT homóloga de un
 organismo diferente, y en donde dicho mutante se basa en una modificación orientada de secuencias CERT
 mediante sustitución, inserción o delección de uno a diez aminoácidos.
- 2.- Método según la reivindicación 1, en el que la proteína CERT es la proteína de transferencia de ceramida CERT
 15 (SEC ID N° 11 o SEC ID N° 13 o un derivado o mutante de la misma, en donde dicho derivado es una molécula de
 polipéptido que es al menos un 70% idéntica en la secuencia con la secuencia CERT original o su secuencia
 complementaria, o dicho derivado es una secuencia CERT homóloga de un organismo diferente, y en donde dicho
 mutante se basa en una modificación orientada de secuencias CERT mediante sustitución, inserción o delección de
 uno a diez aminoácidos.
- 20 3.- Método según la reivindicación 2, en el que la proteína CERT es proteína de transferencia de ceramida CERT
 mutada y dicha mutación incapacita y/o suprime un sitio de fosforilación en cualquier posición de serina, treonina o
 tirosina de CERT.
- 4.- Método según la reivindicación 3, en el que la proteína CERT es proteína de transferencia de ceramida CERT
 25 mutada y dicha mutación incapacita y/o suprime el sitio de fosforilación de proteína cinasa D (PKD) de CERT en la
 posición 132.
- 5.- Método según la reivindicación 4, en el que la CERT mutada es CERT_{S132A} (SEC ID N° 15).
- 30 6.- Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método da como resultado una productividad celular
 específica aumentada de dicha proteína de interés en dicha célula en comparación con una célula de control que
 expresa dicha proteína de interés, pero en la que dicha célula de control no tiene la expresión o actividad aumentada
 de una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende un dominio de transferencia de lípido
 35 relacionado con la proteína de transferencia de ceramida CERT o un derivado o mutante del mismo.
- 7.- Método para aumentar la productividad celular específica de una proteína de interés de membrana o secretada
 en una célula, que comprende introducir en una célula uno o más sistemas de vector que comprenden secuencias
 de ácidos nucleicos que codifican al menos dos polipéptidos, en los que
 40 un primer polinucleótido codifica una proteína que tiene una secuencia
 aminoacídica que comprende una proteína de transferencia de ceramida CERT o un derivado o mutante del mismo,
 y
 b. un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés
 c. y en el que la proteína de interés y la proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende una
 45 proteína de transferencia de ceramida CERT, o un derivado o mutante del mismo, se expresan por dicha célula,
 en donde dicho derivado es una molécula de polipéptido que es al menos un 70% idéntica en la secuencia con la
 secuencia CERT original o su secuencia complementaria, o dicho derivado es una secuencia CERT homóloga de un
 organismo diferente, y
 en donde dicho mutante se basa en una modificación orientada de secuencias CERT mediante sustitución, inserción
 50 o delección de uno a diez aminoácidos.
- 8.- Método para aumentar la eficacia de transfección de una célula que expresa una proteína de interés de
 membrana o secretada en una célula, que comprende
 transfectar dicha célula con un primer polinucleótido que codifica una
 55 proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende una proteína de transferencia de ceramida CERT o
 un derivado o mutante del mismo,
 b. transfectar posteriormente dicha célula con un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés,
 en el que dichos primer y segundo polinucleótidos están localizados en sistemas de vector diferentes,
 en donde dicho derivado es una molécula de polipéptido que es al menos un 70% idéntica en la secuencia con la
 60 secuencia CERT original o su secuencia complementaria, o dicho derivado es una secuencia CERT homóloga de un
 organismo diferente, y
 en donde dicho mutante se basa en una modificación orientada de secuencias CERT mediante sustitución, inserción
 o delección de uno a diez aminoácidos.
- 9.- Vector de expresión que comprende dos polinucleótidos,
 65 a. un primer polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que comprende
 una proteína de transferencia de ceramida CERT o un derivado o mutante del mismo, y

- b. un segundo polinucleótido que codifica una proteína de interés,
en donde dicho derivado es una molécula de polipéptido que es al menos un 70% idéntica en la secuencia con la
secuencia CERT original o su secuencia complementaria, o dicho derivado es una secuencia CERT homóloga de un
organismo diferente, y
- 5 en donde dicho mutante se basa en una modificación orientada de secuencias CERT mediante sustitución, inserción
o delección de uno a diez aminoácidos.
- 10.- Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que la proteína de transferencia de ceramida CERT tiene la
SEC ID N° 11 o SEC ID N° 13.
- 10 11.- Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que la CERT mutada es CERT_{S132A} (SEC ID N° 15).
- 12.- Una célula que comprende el vector de expresión de las reivindicaciones 9 a 11.
- 15 13.- Uso de una proteína de transferencia de ceramida CERT o un polinucleótido que codifica una proteína de
transferencia de ceramida CERT para aumentar la secreción y/o producción de una proteína de interés.

FIGURA 1

Medida basada en FACS del producto intracelular

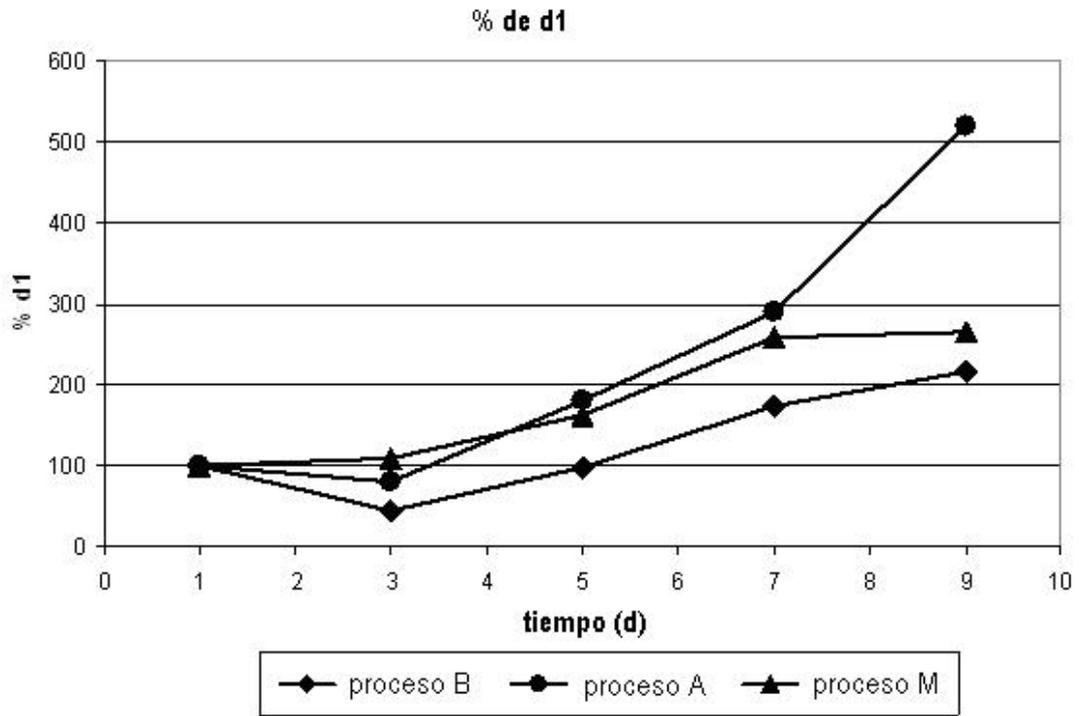


FIGURA 2

Familia proteica del dominio START

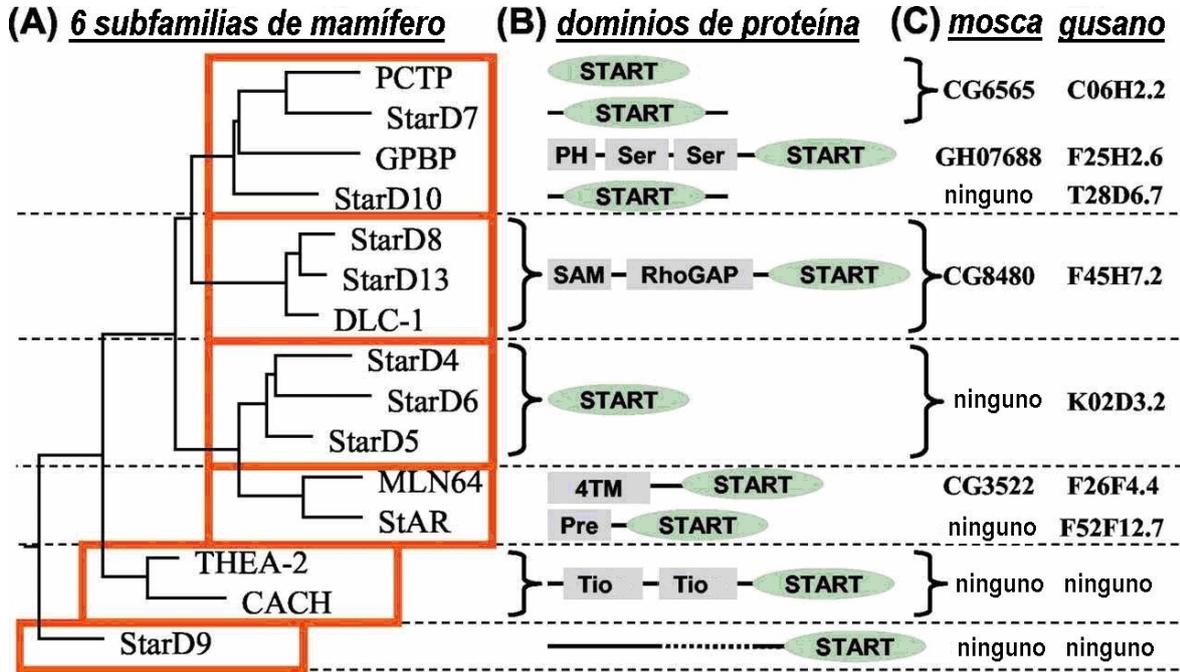
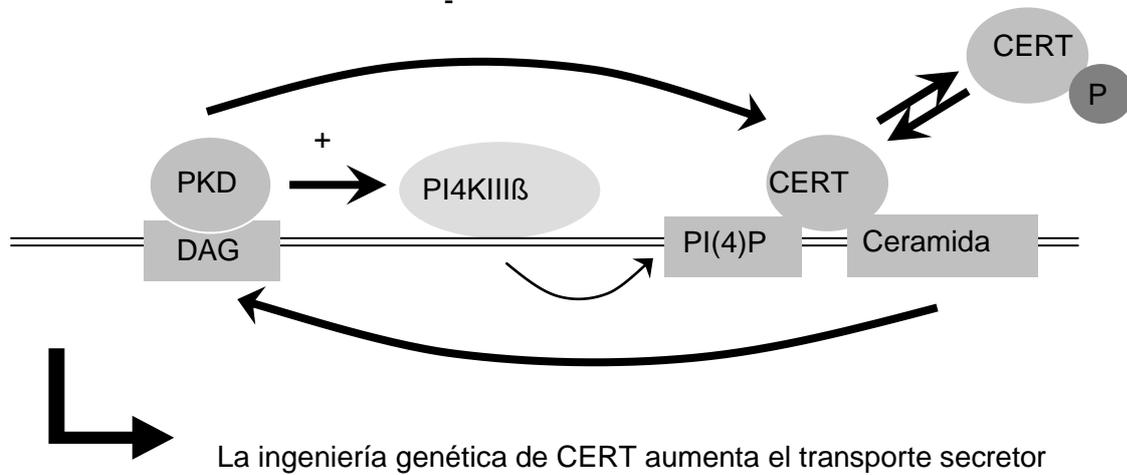


FIGURA 3

A



B

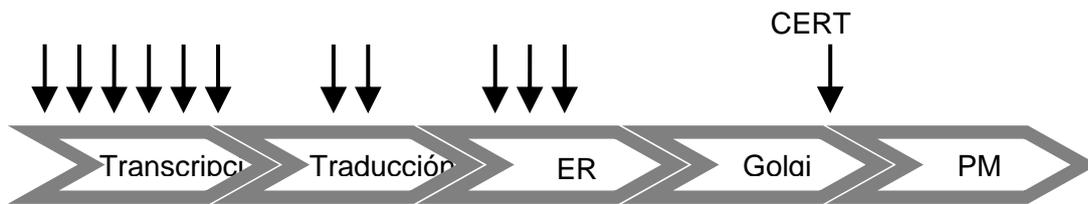


FIGURA 4

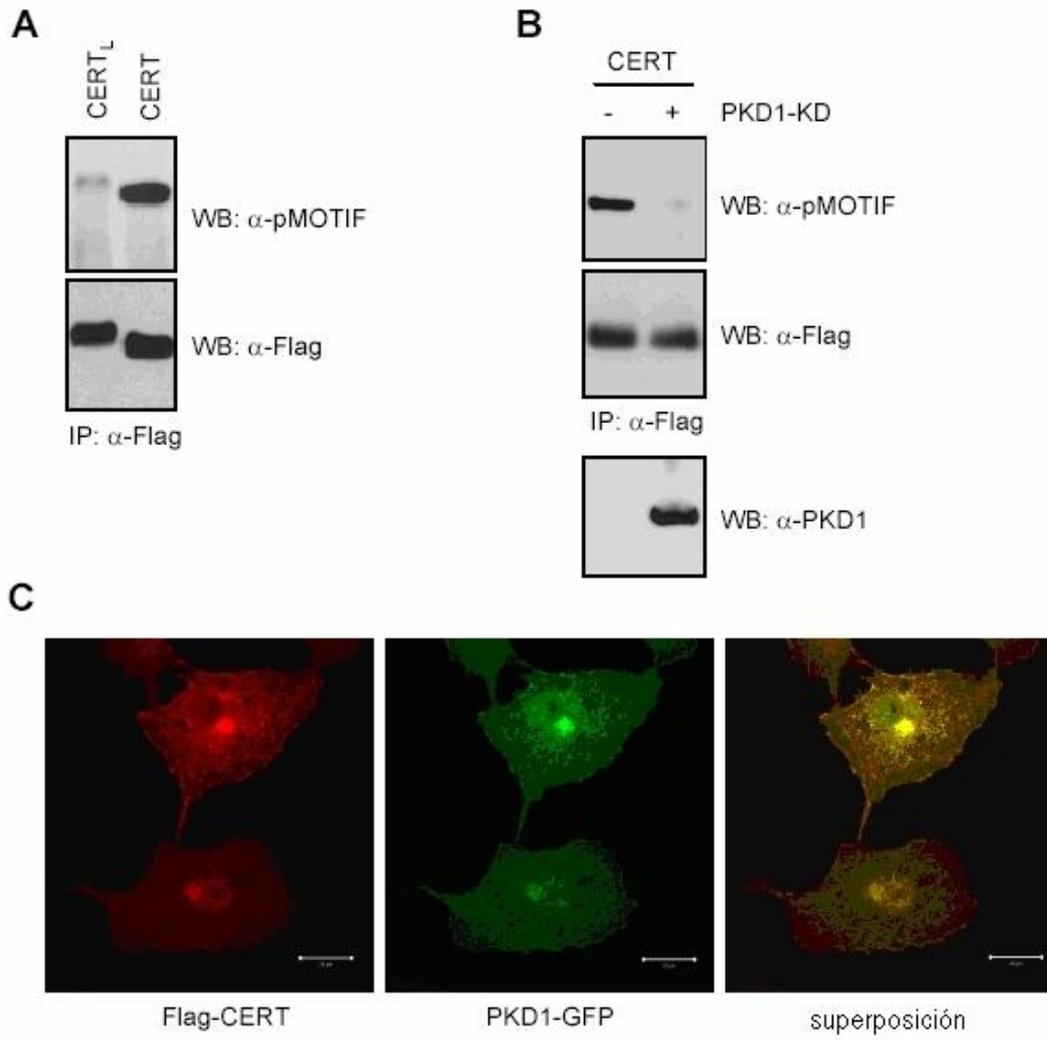


FIGURA 5

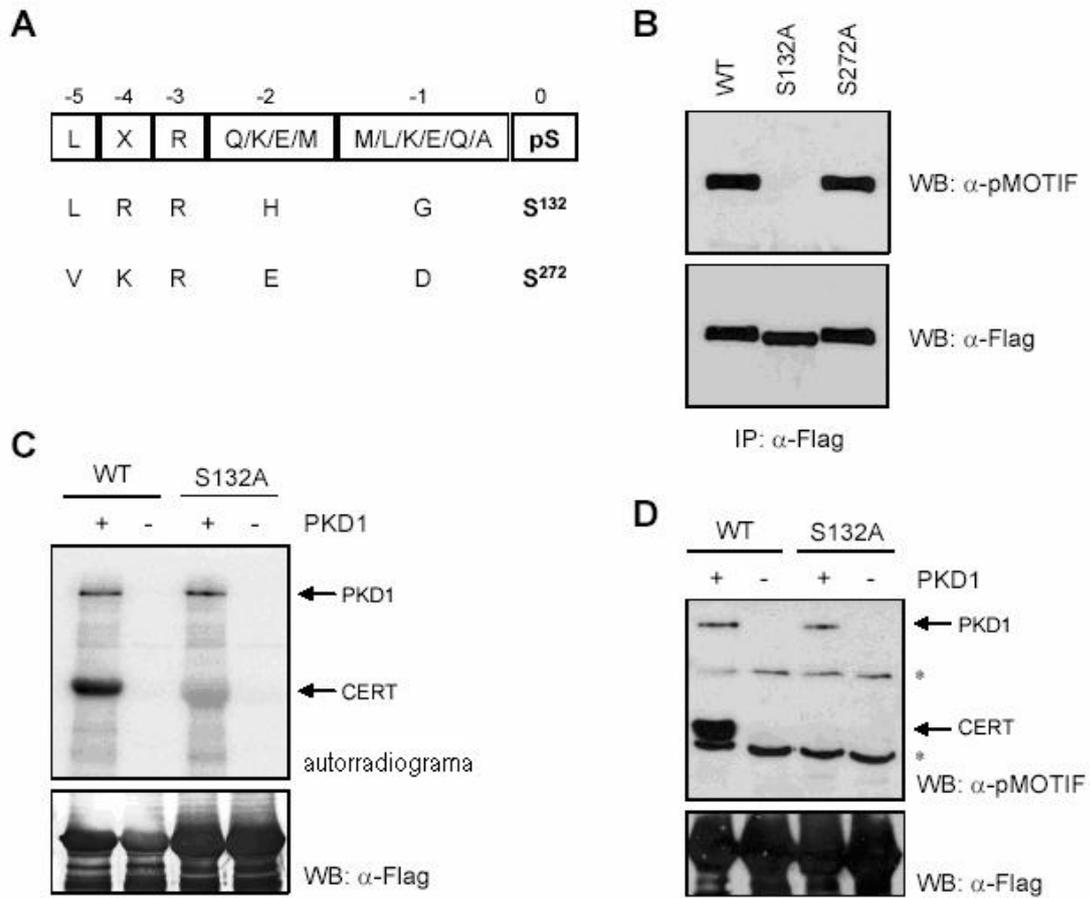
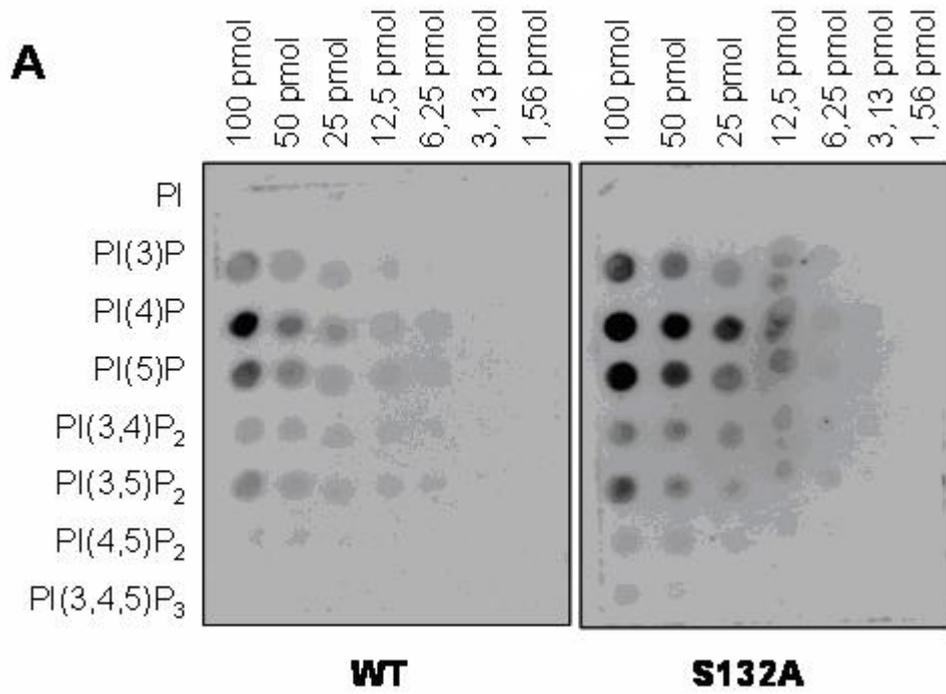


FIGURA 6



B

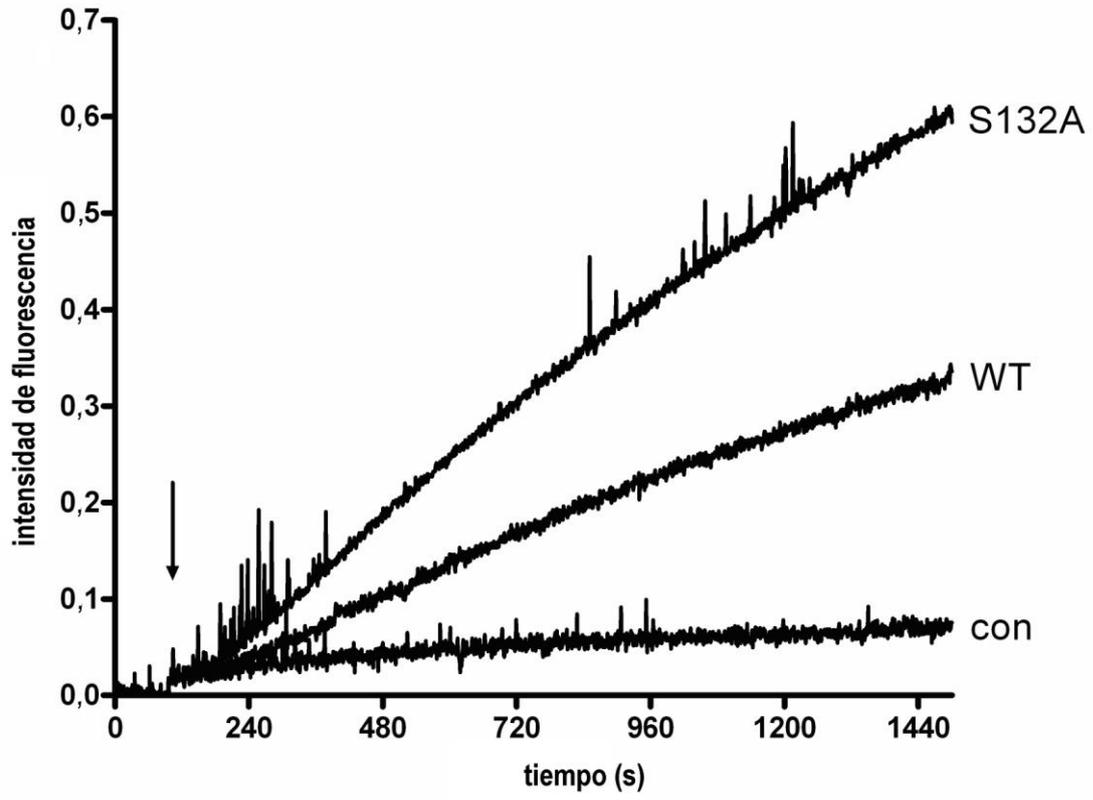
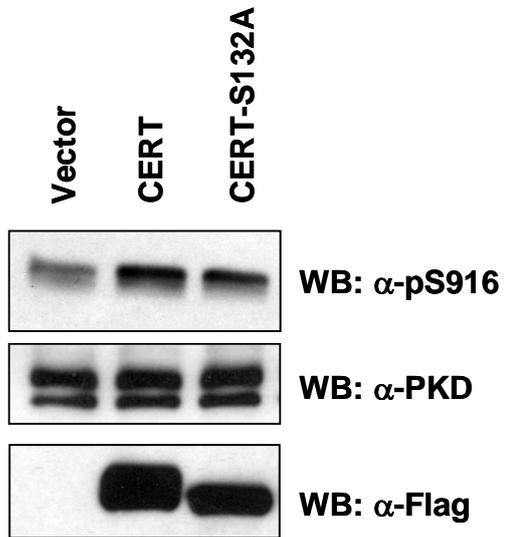
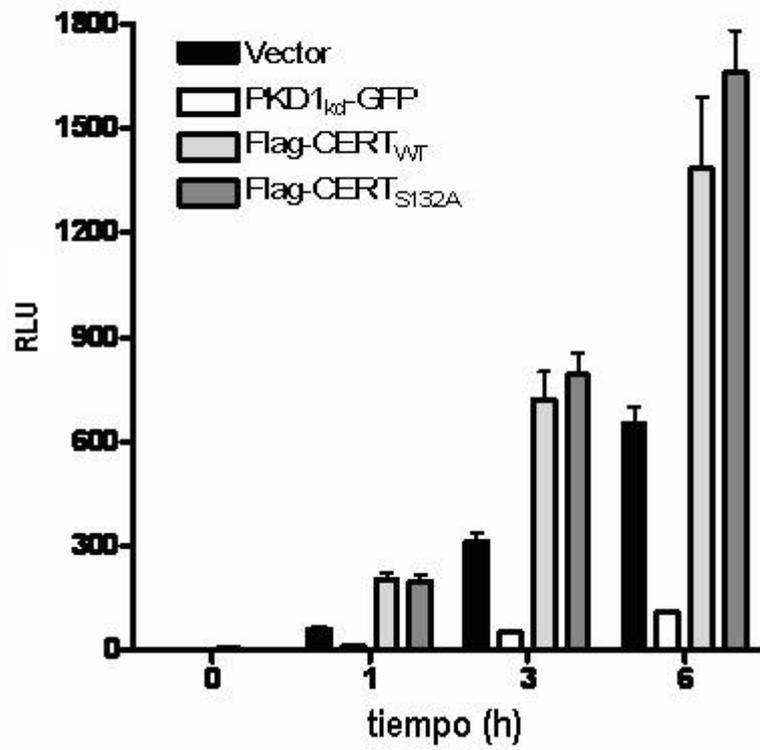


FIGURA 7

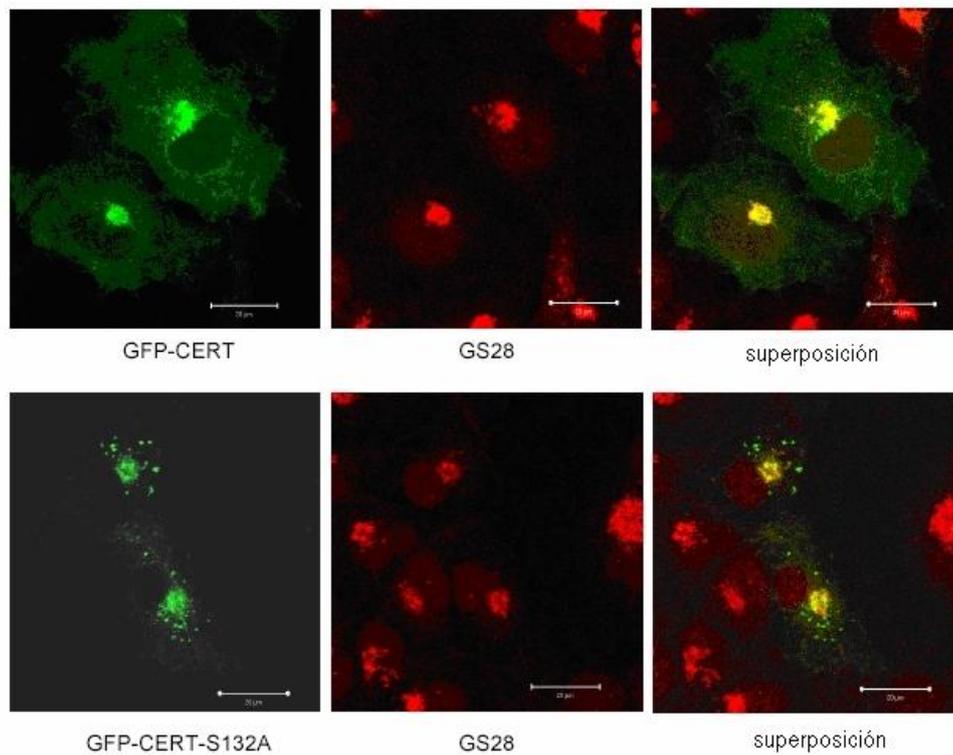
A



B



C



D

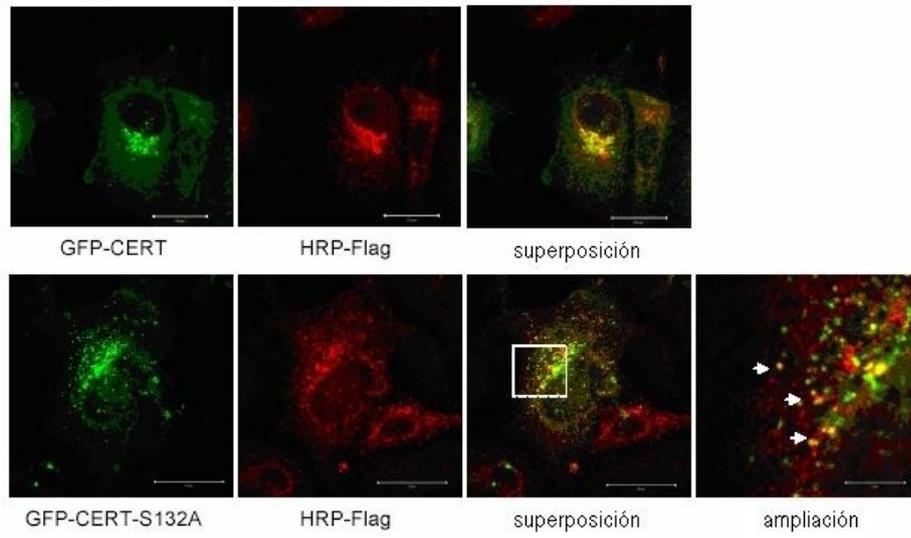


FIGURA 8

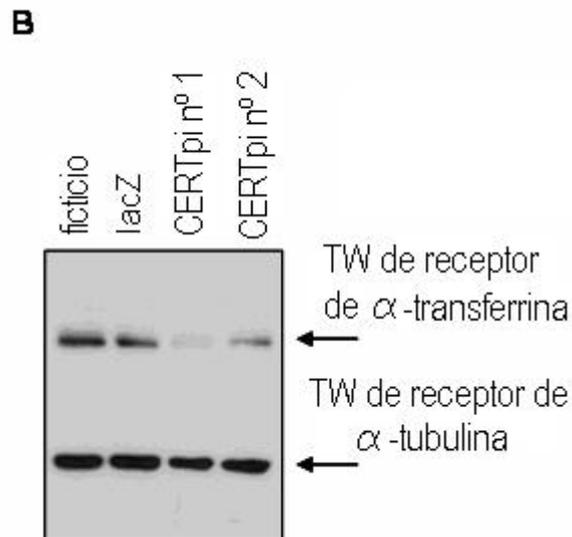
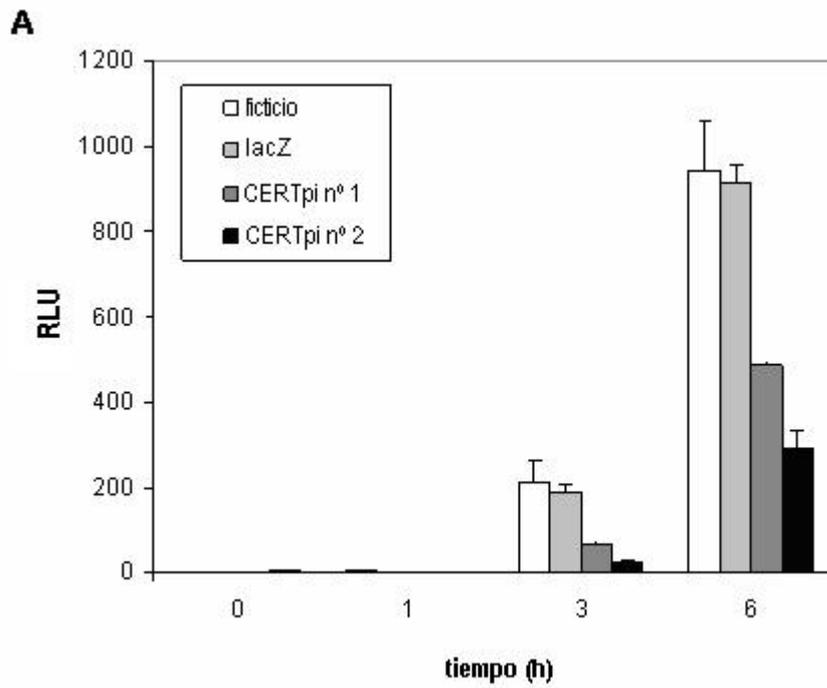


FIGURA 9

A

nhntntntnhtnhtntnnWnnnnnnnnnnnnnnnnhthnnnnnnnnnnnnnnnn+hnthhnnnnnnnnhnnhhtntnnnnntWppnhnn
 nnnnnnnnnhthlpnhtnsnnnnnnnslnhnnntnlnhnnhnsnRhhnlRnhpnnnnnnnnnttnhhlhnnohpntnntnnnnnnnhtRsp
 hshhhpnttsnnnnnnnnnnnsphhhlnhhtsnnnnnnnpnhhphhhtntnnhphnnnnhthptntp

B

rhogap_rat/1-20 HFLQDCVDGLFKEVKEKFKGWVSY-----TSEQAELSYKKVS-----EGPP
 CONSENSO/80% .h.t...t.ht.hh.t...W.....hhth.....
 CONSENSO/65% .htpstthhphhtssttWhh.....ptttshpth.....tsp
 CONSENSO/50% phpscspshlppssspcsWspss.....ptcstpcshpphss.....sucs

rhogap_rat/1-20 LRLWRATIEVPA--APEEILKRLLKEQHLWDVDLL-----DSKVIEILDSQ---
 CONSENSO/80% .+h.thh.....h...hh.t.....tWpp.h.....hthlp.ht.s...
 CONSENSO/65% h+hhshl.tss...hhtplhphsh....pWcpsht.....tspslctlss...
 CONSENSO/50% hRstulVsssss.plsp-lhccsth.hhcWDcshs.....pspll-slsss...

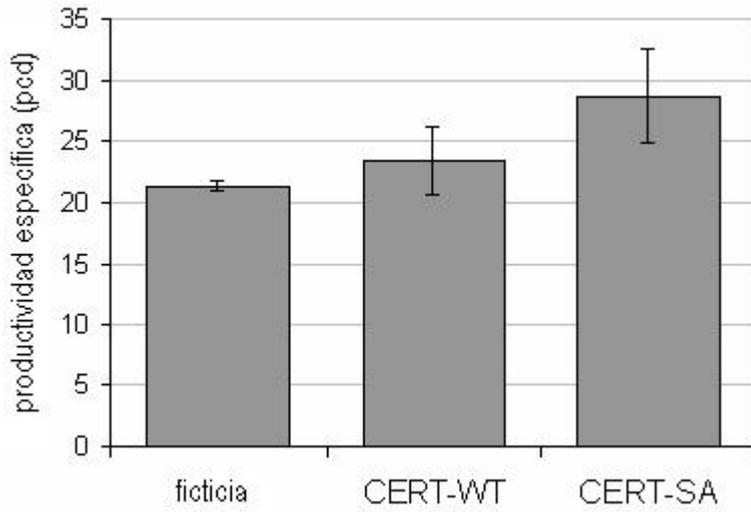
rhogap_rat/1-20 ----TEIQYVQNSMA--PHPA-RDYVVLRTWRTN-----LPRGACALLFTSVDHDRA
 CONSENSO/80%s.l.h...t.h...h.s.R-hh.IR.hp....tt.hhlh..ohp..t.
 CONSENSO/65%sslhhhsphhh..slss.R-hlIRhh+p....spsshslsstSlsp.pt
 CONSENSO/50%uslpahsssss.sPlsP.RDaVhVRpp+p....sccsallssSlspsss

rhogap_rat/1-20 P-----VAGVRVNVLLSRYLIEPCGSGK-----SKLYMCRADLRGHMP----
 CONSENSO/80%thhRspsh.shhhhp..tts.....sphhhl..h-hts.....
 CONSENSO/65% s.....shIRschsothlpsspss.....splsal.ps-lputh.....
 CONSENSO/50% ss....psuhlRucphPSGhllcssusGh.....o+lsalppsDLcGpsP....

rhogap_rat/1-20 EWYTKSFGHLCAAEEVVKIRDSFSNQSTESKD
 CONSENSO/80% p.hhp.hht.th..hhp....hthpt.t.p
 CONSENSO/65% phhhcshhppsphh.hhct..hhstlpptstp
 CONSENSO/50% ctll+slhssuhspss+p..phAsLpcssp+

FIGURA 10

A Productividad específica de mAB en cultivos en serie



B Productividad específica en procesos semicontinuos

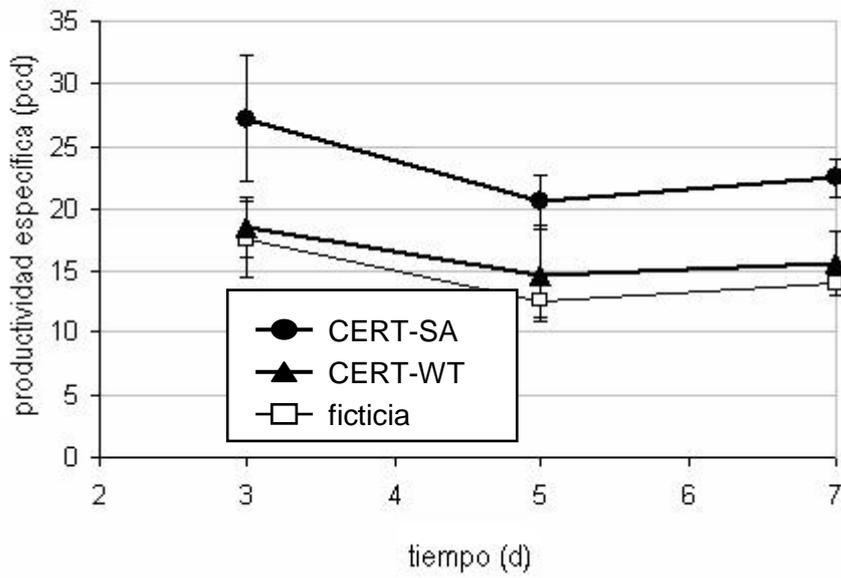
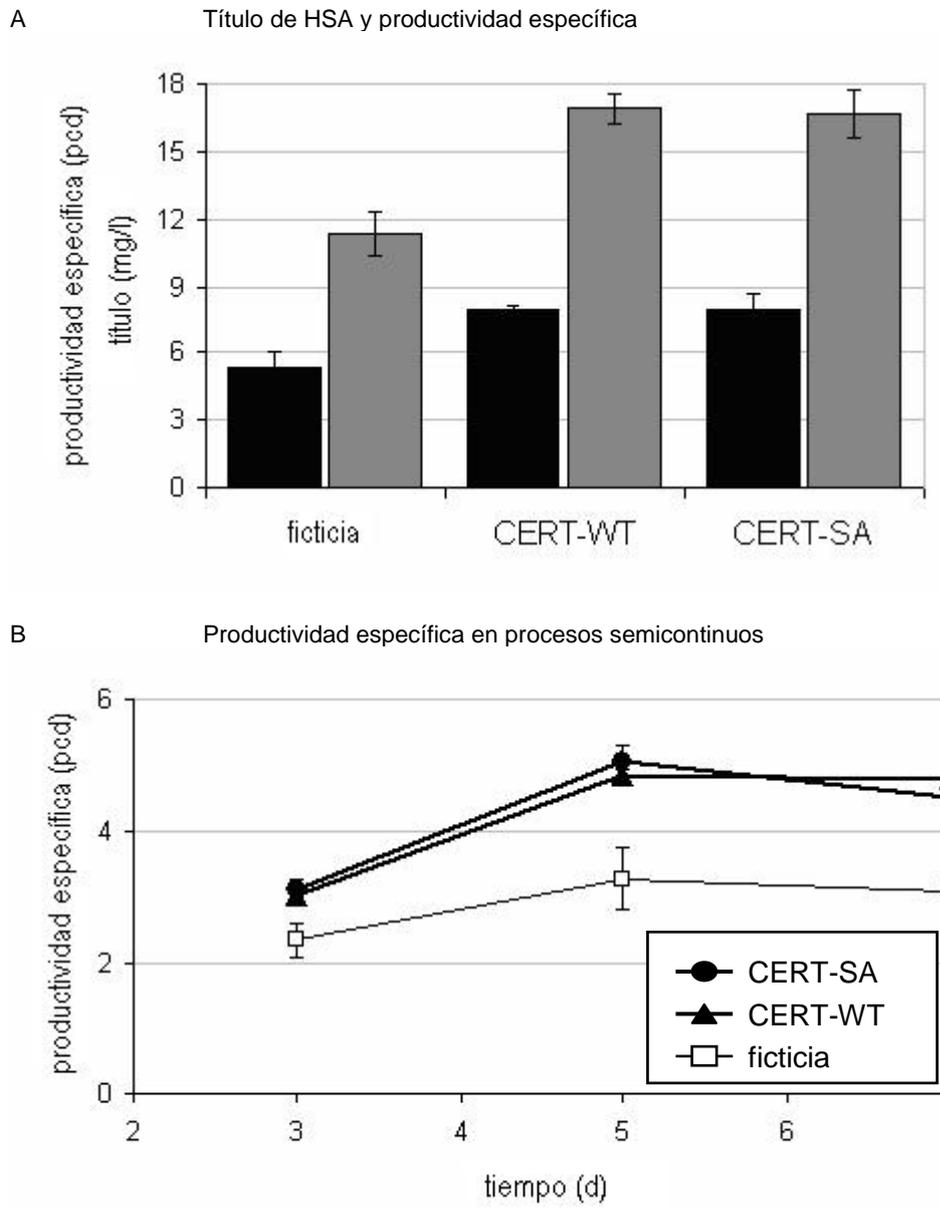


FIGURA 11



C Título en procesos semicontinuos

