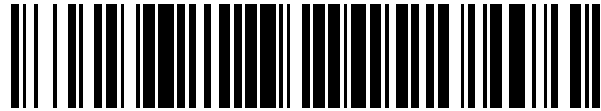


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 530**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2006 E 06706455 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1853700**

54 Título: **Coexpresión recombinante de la subunidad 1 de la epóxido reductasa de la vitamina K para mejorar la expresión de proteína dependiente de la vitamina K**

30 Prioridad:

**28.02.2005 US 657041 P**

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

**07.03.2013**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)  
ONE BAXTER PARKWAY  
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHEIFLINGER, FRIEDRICH y  
BOEHM, ERNST**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 397 530 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

Coexpresión recombinante de la subunidad 1 de la epóxido reductasa de la vitamina K para mejorar la expresión de proteína dependiente de la vitamina K

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un organismo hospedador que contiene ácidos nucleicos recombinantes que codifican la subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) y ácidos nucleicos recombinantes que codifican una proteína dependiente de la vitamina K (VKD), expresándose en dicho organismo hospedador tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD recombinante. Además, la presente invención se refiere a un sistema de cultivo celular que comprende células que contienen dichos ácidos nucleicos recombinantes y a procedimientos para mejorar la productividad de la expresión de la proteína VKD recombinante en un organismo hospedador que se cultiva en sistemas adecuados, es decir para aumentar las tasas de secreción.

**Antecedentes de la invención**

15 El complejo epóxido reductasa de la vitamina K (VKORC) recicla la forma reducida de la vitamina K que es un cofactor esencial para la  $\gamma$ -carboxilación post-traducciona de las proteínas dependientes de la vitamina K (VKD) (Nelsestuen, G.L., Zytkevich, T.H., y Howard, J.B. (1974) The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 249, 6347-6350). El gen VKORC1 se identificó recientemente, y se describe con detalle en Rost y col., 2004 (Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hortnagel, K., Pelz, H.J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G., Muller, C.R., Strom, T.M., y Oldenburg, J. (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427, 537-541).

25 La proteínas VKD contienen restos de glutamato  $\gamma$ -carboxilados (gla) que les proporcionan propiedades fisiológicas y bioquímicas específicas tales como la unión dependiente de Ca a membranas de fosfolípidos cargados negativamente en el caso de los factores de coagulación sanguínea (Mann, K.G., Jenny, R.J., y Krishnaswamy, S. (1988) Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 915-956). Las proteínas VKD incluyen los factores procoagulantes II, VII, IX y X, y las proteínas anticoagulantes C, S y Z. Aunque está restringida a una sola reacción enzimática conocida, la actividad de la  $\gamma$ -carboxilasa se encuentra en todos los tejidos de mamíferos (Vermeer, C. y de Boer-van den Berg MA (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Haematologia (Budap.)*, 18, 71-97). La  $\gamma$ -carboxilasa cataliza una reacción de carboxilación que usa la vitamina K reducida como cofactor.

30 La gamma carboxilación dependiente de la vitamina K (VKD) de los restos de ácido glutámico es una modificación post-traducciona de proteínas requerida para la generación de proteínas VKD biológicamente activas que tienen funciones en la hemostasia, el control del crecimiento, la homeostasia del calcio y la transducción de señales (Furie, B., Bouchard, B.A., y Furie, B. C. (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood*, 93, 1798-1808; Berkner, K. L. (2000) The vitamin K-dependent carboxylase. *J. Nutr.*, 130, 1877-1880). Varios restos de ácido glutámico en el dominio Gla N-terminal de estas proteínas se modifican por carboxilación para permitir las interacciones dependientes de calcio de las membranas de fosfolípidos (Stenflo, J. y Suttie, J.W. (1977) Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 157-172; Suttie, J. W. (1980) Mechanism of action of vitamin K: synthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 8, 191-223). Estos restos múltiples de gamma-glutamato (Gla) permiten que el dominio Gla experimente cambios conformacionales que se requieren para la actividad de las proteínas VKD en combinación con la unión a las superficies de las membranas de fosfolípidos (Nelsestuen, G.L., Broderius, M., y Martin, G. (1976) Role of gamma-carboxyglutamic acid. Cation specificity of prothrombin and factor X-phospholipid binding. *J. Biol. Chem.*, 251, 6886-6893; Zwaal, R.F., Comfurius, P., y Bevers, E.M. (1998) Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1376, 433-453).

45 Las proteínas VKD de la coagulación sanguínea requieren una carboxilación completa o casi completa para unirse a las superficies de las membranas en presencia de iones de calcio (Furie, B. y Furie, B.C. (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53, 505-518). Si los antagonistas de la vitamina K inhiben la gamma carboxilación, las proteínas VKD infracarboxiladas debido a esta inhibición no pueden formar la estructura dependiente del calcio, lo que da como resultado una baja afinidad por las membranas de fosfolípidos y una menor actividad (Esmon, C.T., Sadowski, J.A., y Suttie, J.W. (1975a) A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H-14-CO<sub>3</sub>- into prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 250, 4744-4748; Esmon, C.T., Suttie, J.W., y Jackson, C.M. (1975b) The functional significance of vitamin K action. Difference in phospholipid binding between normal and abnormal prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 250, 4095-4099; Malhotra, O.P., Nesheim, M.E., y Mann, K.G. (1985) The kinetics of activation of normal and gamma-carboxyglutamic acid-deficient prothrombins. *J. Biol. Chem.*, 260, 279-287). Por ejemplo, las contribuciones al total de pérdida de actividad proteínica se pueden asignar a la ausencia de cada uno de los 10 restos Gla de la proteína C humana activada por la proteína VKD (Zhang, L., Jhingan, A., y Castellino, F.J. (1992) Role of individual gamma-carboxyglutamic acid residues of activated human protein C in defining its in vitro anticoagulant activity. *Blood*, 80, 942-952). La pérdida de la actividad procoagulante de los mutantes con el factor IX insuficientemente carboxilado que se encuentra en los pacientes con hemofilia B se puede justificar por cambios

conformacionales anómalos inducidos por el calcio y la pérdida de capacidad para unirse a las vesículas de fosfolípidos (Ware, J., Diuguid, D.L., Liebman, H.A., Rabiet, M.J., Kasper, C.K., Furie, B.C., Furie, B., y Stafford, D.W. (1989) Factor IX San Dimas. Substitution of glutamine for Arg-4 in the propeptide leads to incomplete gamma-carboxylation and altered phospholipid binding properties. *J. Biol. Chem.*, 264, 11401-11406).

- 5 En el caso del factor IX recombinante, se ha demostrado que la expresión del factor IX funcional en las células de ovario de hámster chino está limitada por el hecho de que la capacidad para la carboxilación se satura a mayores niveles de producción (Kaufman, R.J., Wasley, L.C., Furie, B.C., Furie, B., y Shoemaker, C.B. (1986) Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 9622-9628; Derian, C.K., VanDusen, W., Przysiecki, C.T., Walsh, P.N., Berkner, K.L., Kaufman, R.J., y Friedman, P.A. (1989) Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems. *J. Biol. Chem.*, 264, 6615-6618).

15 Se demostró que la sobreexpresión recombinante de proteínas  $\gamma$ -carboxiladas, en el caso del factor IX humano, daba lugar a una limitación de la escisión del propéptido y a una  $\gamma$ -carboxilación a mayores tasas de secreción, produciéndose de esta manera proteínas que solo estaban parcialmente ocupadas con restos gla incluso cuando la vitamina K estaba disponible en exceso en el medio de cultivo. Esto lleva a la secreción de variantes de proteínas recombinantes VKD con actividades reducidas. La adición de vitamina K al medio no mejoraba la actividad del factor IX a niveles altos de expresión. Se demostró que el requisito de vitamina K presente en el medio de cultivo celular para inducir el factor IX activo alcanzaba la saturación a 5  $\mu$ g/ml. Por debajo de este nivel, la cantidad secretada de factor IX activo por las células de ovario de hámster chino (CHO) dependía de la concentración de vitamina K (Kaufman, R.J., Wasley, L.C., Furie, B.C., Furie, B., y Shoemaker, C.B. (1986) Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 9622-9628).

25 Hasta ahora se han elegido líneas celulares con niveles bajos de expresión para la producción con el fin de subsanar estas limitaciones de capacidad celular para modificar las proteínas VKD post-traduccionamente. La coexpresión de Furin, la enzima que escinde el propéptido, da lugar a la escisión completa de este propéptido (Wasley, L.C., Rehemtulla, A., Bristol, J.A., y Kaufman, R.J. (1993) PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, 268, 8458-8465), pero no está implicada en la mejora de la  $\gamma$ -carboxilación. En otra aproximación, la sobreexpresión de  $\gamma$ -carboxilasa no ha llevado a la mejora de secreción de proteínas en el caso del factor IX (Rehemtulla, A., Roth, D.A., Wasley, L.C., Kuliopulos, A., Walsh, C.T., Furie, B., Furie, B.C., & Kaufman, R.J. (1993) In vitro and in vivo functional characterization of bovine vitamin K-dependent gamma-carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 4611-4615). Las moléculas de factor IX, que están ligadas a la carboxilasa durante la reacción de carboxilación, no se liberan eficazmente. Se concluyó que el aporte de la forma reducida de vitamina K en el sitio de la  $\gamma$ -carboxilación es la etapa limitante de esta reacción (Hallgren, K.W., Hommema, E.L., McNally, B.A., y Berkner, K.L. (2002) Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: implications for the release of vitamin K-dependent proteins. *Biochemistry*, 41, 15045-15055).

40 Se conoce un sistema de D1, Wajih y col., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 11, pág. 10540-10547 (2005), que muestra la carboxilación de un péptido FLEEL sintético en el que se añaden cantidades adicionales de epóxido de vitamina K endógena o vitamina K reducida en el sistema; además se usa en el sistema un potente agente reductor, particularmente Ditiotreitól, y la  $\gamma$ -carboxilasa se expresa de manera recombinante; Wajih tampoco determina las tasas de secreción.

45 Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de estabilizar la expresión, particularmente la expresión recombinante de las proteínas VKD en organismos hospedadores, que de lugar a mejoras de las tasas de secreción y/o de las actividades de las proteínas VKD expresadas.

50 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos sistemas y procedimientos para mejorar la productividad de la expresión de la proteína VKD (particularmente recombinante) mediante la coexpresión de VKORC1.

### **Sumario de la invención**

55 La presente invención se refiere a un organismo hospedador que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica la subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) y un ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de la vitamina K (VKD), en el que tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD recombinante se expresan en dicho organismo hospedador, en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína VKD de un organismo hospedador que no coexpresa VKORC1.

60 Además, la presente invención se refiere a un sistema de cultivo celular que comprende células que contienen un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD,

en el que tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD recombinante se expresan en dichas células, a procedimientos para incrementar la tasa de secreción de la expresión de una proteína recombinante VKD en un organismo hospedador por coexpresión recombinante de VKORC1, y al uso de una expresión recombinante de VKORC1 en un organismo hospedador o en un sistema de cultivo celular para incrementar la tasa de secreción de la productividad de la expresión de VKD recombinante, como se define en las reivindicaciones.

### **Descripción detallada de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a un organismo hospedador que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica la subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína dependiente de la vitamina K (VKD) en el que tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD recombinante se expresan en dicho organismo hospedador, como se define en la reivindicación 1.

En lo sucesivo, las expresiones “VKORC1 (recombinante)” y “proteína VKD (recombinante)” se designarán también como “(r)VKORC1” y “proteína (r)VKD”, respectivamente.

Los ácidos nucleicos recombinantes de la presente invención se pueden obtener por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la producción de ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, mediante la tecnología de ADN recombinante, transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, o mediante reproducción bacteriana.

El organismo hospedador de la presente invención puede derivar de cualquier organismo hospedador, incluyendo organismos hospedadores recombinantes, que sea capaz de expresar una rVKORC1 biológicamente activa y una proteína rVKD biológicamente activa. En particular, el organismo hospedador de la presente invención puede ser un organismo hospedador eucariota, incluyendo organismos multicelulares, caracterizado por la producción de una proteína rVKD farmacológicamente activa.

En una realización de la presente invención, el organismo hospedador es una célula de mamífero, por ejemplo una célula derivada de una línea celular de mamífero seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células HEK293, células NS0, células Sp20, células Perc.6, células SkHep, células HepG2, células BHK, células HeLa, células Vero y células COS. En ejemplos específicos de la presente invención, el organismo hospedador es una célula derivada de células CHO o células HEK293.

En una realización de la presente invención, el ácido nucleico que codifica rVKORC1 o el ácido nucleico que codifica la proteína rVKD o ambos contenidos en el organismo hospedador de la presente invención se expresan mediante un modo de expresión seleccionado del grupo que consiste en expresión inducida, transitoria y permanente. Para la expresión de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican VKORC1 y/o la proteína VKD, puede emplearse cualquier sistema de expresión conocido en la técnica o disponible comercialmente, incluyendo el uso de sistemas reguladores cuando sea adecuado, preferentemente promotores controlables, potenciadores, etc.

En una realización preferida del organismo hospedador de la presente invención, el ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 o el ácido nucleico recombinante que codifica la proteína VKD o ambos se integran establemente en el material genético del organismo hospedador de la presente invención.

El organismo hospedador de la presente invención puede utilizarse para aumentar la expresión de proteínas rVKD tales como factores sanguíneos o derivados funcionalmente activos de los mismos, preferentemente factores sanguíneos procoagulantes o anticoagulantes humanos o derivados funcionalmente activos de los mismos. En una realización preferida de la presente invención, la proteína rVKD es un factor sanguíneo procoagulante humano farmacológicamente aceptable que puede usarse en el tratamiento de trastornos hemorrágicos.

Como un ejemplo de la presente invención, la proteína rVKD es un factor sanguíneo procoagulante, incluyendo el factor II, el factor VII, el factor IX, preferiblemente el factor IX humano, y el factor X, o un factor sanguíneo anticoagulante incluyendo la proteína C, la proteína S y la proteína Z.

De acuerdo con la presente invención, el organismo hospedador contiene un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD, en el que la rVKORC1 y la proteína rVKD se expresan en dicho organismo hospedador y en el que la productividad de la expresión de la proteína VKD recombinante está sustancialmente mejorada, como se define más adelante.

La expresión “en el que la productividad de expresión de la proteína VKD recombinante está sustancialmente mejorada”, como se utiliza en el presente documento, significa que la tasa de secreción de una proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente aumentada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.

La mejora de la productividad de la expresión de la proteína VKD recombinante puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo el aislamiento, por ejemplo, a partir de un medio de cultivo o la recolección del organismo hospedador y análisis, por ejemplo por medio de electroforesis, cromatografía o inmunoadsorción, de las proteínas expresadas. En una realización preferida de la presente invención, la expresión

de las proteínas rVKD se detecta por medio de cualquier ensayo inmunoenzimático conocido tal como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Como alternativa, la integridad y actividad de la proteína rVKD puede evaluarse por la medición del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de cultivo celular que comprende células que contienen un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD, en el que tanto la rVKORC1 como la proteína rVKD se expresan en dichas células, como se define en las reivindicaciones.

10 El sistema de cultivo celular de la presente invención puede comprender cualquier sistema de cultivo celular que contenga células capaces de expresar una rVKORC1 biológicamente activa y una proteína rVKD biológicamente activa. Se han enumerado anteriormente ejemplos de las células adecuadas. En una realización preferida, el sistema de cultivo celular de la presente invención es un sistema celular eucariótico caracterizado por la producción de una o más proteínas rVKD farmacológicamente activas.

En una realización de la presente invención, el sistema de cultivo celular de la presente invención comprende un organismo hospedador como se ha definido anteriormente.

15 No hay limitación particular en cuanto al medio, los reactivos y las condiciones utilizadas para el cultivo de las células en el sistema de cultivo celular de la presente invención, incluyendo el cultivo de las células de forma continua o discontinua. En una realización de la presente invención, las células se cultivan en condiciones libres de suero o libres de suero y proteínas. En otra realización de la presente invención se emplean condiciones bajo las que proliferan selectivamente las células que contienen ácidos nucleicos que codifican VKORC1 o una proteína  
20 VKD, por ejemplo, utilizando un medio selectivo.

La proteína rVKD deseada que se ha expresado por las células del organismo hospedador seleccionado y que, dependiendo de sistema de transfección/vector que se use, está contenida en las células o se ha secretado al medio por las células cultivadas, se puede aislar/recuperar del sistema de cultivo celular utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

25 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de la proteína VKD recombinante expresada en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un organismo hospedador;
- (b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD en el organismo hospedador de la etapa (a);
- 30 (c) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 en el organismo hospedador de la etapa (a); y
- (d) expresar los ácidos nucleicos recombinantes de las etapas (b) y (c); como se define en las reivindicaciones.

35 En una realización de la presente invención, los ácidos nucleicos recombinantes que codifican VKORC1 o una proteína VKD se insertan en el organismo hospedador simultáneamente por medio de cotransfección. Como alternativa, dichos ácidos nucleicos recombinantes se insertan en el organismo hospedador secuencialmente por medio de transfecciones sucesivas.

40 Los ácidos nucleicos recombinantes usados de acuerdo con la presente invención pueden estar contenidos en cualquier forma y sistema adecuado para la transfección en un organismo hospedador, incluyendo plásmidos y vectores virales. Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican VKORC1 y una proteína VKD, respectivamente, pueden estar presentes en una sola molécula de vector o cada uno puede estar presente en una molécula de vector, pudiendo ser las dos moléculas de vector iguales o distintas. La transfección de los ácidos nucleicos recombinantes depende del sistema de transfección que se utilice y puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica o disponible comercialmente para transfectar un organismo hospedador tal como, por ejemplo, una célula eucariótica, incluyendo la electroporación, precipitación o microinyección.

45 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de la expresión de una proteína VKD recombinante en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un organismo hospedador que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD integrada en su material genético, preferentemente en su genoma;
- (b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 en el organismo hospedador de la etapa (a); y
- (c) expresar los ácidos nucleicos de las etapas (a) y (b), como se define en las reivindicaciones.

50 En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD se expresa establemente.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de la expresión de la proteína VKD recombinante en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un organismo hospedador que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 integrado en su genoma;  
 (b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD en el organismo hospedador de la etapa (a); y  
 (c) expresar los ácidos nucleicos de las etapas (a) y (b), como se define en las reivindicaciones.

En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 se expresa establemente.

De acuerdo con la presente invención, el organismo hospedador definido anteriormente o el sistema de cultivo celular definido anteriormente puede utilizarse para mejorar sorprendentemente la productividad de la expresión de la proteína VKD recombinante por coexpresión de rVKORC1.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una proteína rVKD que se puede obtener por inserción de un ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 y un ácido nucleico recombinante que codifica dicha proteína rVKD, expresión de dichos ácidos nucleicos y recuperación de dicha proteína rVKD.

Las figuras muestran:

La figura 1 muestra las concentraciones de rFIX en ng/ml (eje vertical) calculadas basándose en los valores del ELISA (Fig. 1A) y las actividades específicas de rFIX calculadas basándose en los valores de la actividad de coagulación (APTT) en mU/ml (eje vertical) (Fig. 1B) tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de CHO que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2). Los sobrenadantes del cultivo celular libre de suero se recogieron después de 24 horas.

La figura 2 muestra las productividades específicas de rFIX en ng de rFIX/10<sup>6</sup> células/día (eje vertical) calculadas basándose en los valores del ELISA (Fig. 2A) y las actividades específicas de rFIX calculadas basándose en los valores de la actividad de coagulación (APTT) en mU de rFIX/10<sup>6</sup> células/día (eje vertical) (Fig. 2B) tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de CHO que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2). Los sobrenadantes del cultivo celular libre de suero se recogieron después de 24 horas.

La figura 3 muestra las concentraciones de rFIX en ng/ml (eje vertical) calculadas basándose en los valores del ELISA (Fig. 3A) y las actividades específicas de rFIX calculadas basándose en los valores de la actividad de coagulación (APTT) en mU/ml (eje vertical) (Fig. 3B) tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de HEK293 que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2). Los sobrenadantes del cultivo celular libre de suero se recogieron después de 24 horas.

La figura 4 muestra las productividades específicas de rFIX en ng de rFIX/10<sup>6</sup> células/día (eje vertical) calculadas basándose en los valores del ELISA (Fig. 4A) y las actividades específicas de rFIX calculadas basándose en los valores de la actividad de coagulación (APTT) en mU de rFIX/10<sup>6</sup> células/día (eje vertical) (Fig. 4B) tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de HEK293 que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2). Los sobrenadantes del cultivo celular libre de suero se recogieron después de 24 horas.

La figura 5 muestra las actividades específicas de coagulación de rFIX en % tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de CHO que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2) (Fig. 5A) y tras las transfecciones transitorias de una línea celular derivada de HEK293 que produce rFIX con rVKORC1 (1) o un vector vacío (2) (Fig. 5B).

La figura 6 muestra que la expresión transitoria de rVKORC1 en una línea celular derivada de CHO que expresa establemente rFVII. Esta línea celular se transfecta transitoriamente con un vector que codifica VKORC1 o el mismo vector sin VKORC1 ("vector vacío") como control. Las transfecciones se llevan a cabo por duplicado, y con el uso consiguiente de 5 concentraciones distintas de vitamina K1. Se muestran los resultados de la medición de la productividad y actividad del rFVII en los sobrenadantes de los cultivos frente a las concentraciones de vitamina K. Fig. 6A) Valores de productividad basados en las mediciones con ELISA. Fig. 6B) Valores de productividad basados en las mediciones de la actividad de coagulación. Fig. 6C) Cálculo de la actividad específica del FVII basado en unidades de coagulación por FVII por µg como se determina por ELISA.

La figura 7 muestra la expresión transitoria de rVKORC1 en una línea celular derivada de CHO y de HEK293 que expresa rFVII establemente. Estas líneas celulares se transfectan transitoriamente con un vector que codifica rVKORC1 o el mismo vector sin rVKORC1 ("vector vacío") como control. Las transfecciones se llevan a cabo por duplicado. Se muestran los resultados de las mediciones de la productividad y la actividad de rFVII basados en ELISA y en la coagulación por FVII y FVIIa en los sobrenadantes del cultivo. A) línea celular derivada de CHO. B) línea celular derivada de HEK293.

La figura 8 muestra la coexpresión bicistrónica estable de rFVII y rVKORC en células hospedadoras CHO-DHFR<sup>r</sup>. Las productividades de rFVII de los clones seleccionados generados por coamplificación génica con cantidades crecientes de MTX. Dos vectores de expresión diferentes que expresan rFVII humano se han introducido por transfección junto con un plásmido de selección que codifica DHFR. Fig. 8A) 83 clones transfectados con una

construcción de vector que causa la coexpresión bicistérica de rFVII y rVKORC1. Fig.8B) 133 clones cotransfectados con un vector que codifica rFVII.

La figura 9 muestra los valores de productividad y actividad específica de clones derivados de CHO que producen rFVII con y sin coexpresión bicistérica de rVKORC1 generada tras la transfección estable por subclonación y amplificación génica. Se comparan 133 clones sin coexpresión y 83 clones con coexpresión de rVKORC1 en términos de productividad de rFVII y actividad coagulante específica basadas en ELISA y en las mediciones de coagulación por FVII del rFVII secretado.

La figura 10 muestra un ejemplo de un análisis de transferencia de northern de expresión génica a nivel de ARNm aislado de líneas celulares derivadas de CHO. Calle 1: línea celular no transfectada CHO-DHFR. Calle 2: clon de rFVII. Calles 3 y 4: dos clones que se han transfectado posteriormente con vectores plasmídicos que codifican rFVII y rVKORC1 como se describe en el Ejemplo 4. Calles 5 a 7: clones que se han transfectado con un único vector que codifica un ARNm bicistérico con secuencias de rFVII y rVKORC1 unidas mediante IRES como se describe en el Ejemplo 3. Los Paneles A, B y C muestran la misma mancha de transferencia revelada tras la hibridación con tres sondas diferentes. A) Sonda para VKORC1 humana. B) Sonda para FVII humano. C) Sonda para GAPDH de hámster. Se dan las designaciones y los tamaños de los ARNm identificados.

La figura 11 muestra los niveles de expresión de rFVII de clones celulares derivados de CHO y HEK293 establemente transfectados aislados tras la 2ª transfección de líneas celulares que producen rFVII con un plásmido que codifica rVKORC1, o un plásmido de control. El control es el vector hospedador vacío. Los valores de productividad están basados en las mediciones del ELISA del rFVII secretado. Fig. 11A) clones celulares derivados de CHO. Fig. 11B) clones celulares derivados de HEK293.

La figura 12 muestra los niveles de expresión de rFVII comparados con los valores de actividad específica de clones celulares derivados de CHO y HEK293 establemente transfectados aislados tras la segunda transfección de líneas celulares que producen rFVII con un plásmido que codifica rVKORC1 o un plásmido de control. El control es el vector hospedador vacío. Los valores de productividad están basados en las mediciones con ELISA del rFVII secretado. Los valores de actividad específica están calculados como unidades de coagulación por FVII por  $\mu\text{g}$  de FVII como se determina por ELISA. La Fig. 12A) muestra clones celulares derivados de CHO, la Fig. 12B) clones celulares derivados de HEK293.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos sin limitarse por ellos de forma alguna.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Transfección transitoria y coexpresión de rVKORC1 en líneas celulares derivadas de CHO y HEK293 que producen rFIX**

La expresión del factor IX recombinante (rFIX) se consigue por la introducción de plásmidos de expresión que contienen la secuencia de ADN que codifica el factor IX (FIX) humano bajo el control de un promotor viral fuerte en líneas celulares hospedadoras de mamífero, mediante un procedimiento apropiado de transfección que da como resultado células que tienen las secuencias introducidas integradas establemente en sus genomas. Los plásmidos también confieren resistencia a un fármaco marcador seleccionable mediante el suministro de los genes adecuados de resistencia. En el caso de células CHO, que son capaces de crecer solo en presencia de precursores de nucleótidos en el medio debido a un defecto de una enzima de la ruta de la síntesis de nucleótidos de novo, se requiere la expresión de esta enzima, la dihidrofolato reductasa (DHFR). Esto permite la coamplificación del gen de FIX mediante el incremento gradual de la concentración de metotrexato (MTX), que lleva a un incremento del número de copias tanto del gen que codifica DHFR como del gen que codifica rFIX en el genoma celular. Para este propósito, los clones derivados de células CHO tienen que crecer también en medio selectivo al que le faltan nucleótidos y precursores de nucleótidos.

Para la identificación de las células que producen rFIX humano, después de la transfección y adición del fármaco o fármacos selectivos al medio, la suspensión celular se diluye para hacer posible el aislamiento de clones derivados de una única célula. Tras el aislamiento, estos clones celulares se cultivan hasta la confluencia para poder medir el contenido de rFIX en el sobrenadante del cultivo celular con la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para este propósito, las células tienen que cultivarse en ausencia de cualquier suero bovino fetal promotor del crecimiento o componente del mismo para asegurar la identificación del rFIX secretado por las células. Para asegurar una proteína rFIX totalmente funcional, se añade vitamina K. El sobrenadante se recoge después de 24 horas y se analiza por una técnica ELISA específica para rFIX. Además, la integridad de la proteína y la actividad se evalúan por medición del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).

La coexpresión de rVKORC1 se consigue con técnicas de expresión transitoria utilizando líneas celulares que ya se han seleccionado por la expresión de rFIX. En estas células se introduce por transfección un plásmido de expresión que comprende ADNc de rVKORC1 sin más selección de clones. Se recogen los sobrenadantes de todos los grupos de células transfectadas y el contenido y la actividad de rFIX se comparan con controles negativos y se normalizan con respecto a tasas de secreción de rFIX específicas para evaluar los efectos de la actividad de rVKORC1.

Materiales y métodos:

## Vectores de expresión

Los vectores de expresión se clonan según las técnicas de clonación convencionales. En resumen, se genera pSV-DHFR insertando el fragmento PstI de 1,5 kbp del vector pAdD26SV(A)-3 (Scahill, S. J., Devos, R., Van der, H. J., y Fiers, W. (1983) Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4654-4658; el vector es una donación del Dr. Hauser, GBF (Alemania) que contiene DHFR murina en un vector pSV $\beta$  (Clontech, Palo Alto, CA) que proporciona el potenciador, promotor temprano e intrón de SV40, en el que se ha retirado el gen de la  $\beta$ -galactosidasa por digestión con NotI, y se ha insertado un poliengarce. Este vector se ha usado también para generar phact que contiene el promotor y el intrón de la actina humana por intercambio del fragmento EcoRI/HindIII con el fragmento EcoRI/HindIII de p $\beta$ APr-1- $\beta$ gal, que es también una donación del Dr. Hauser. Phact-FIX, que contiene el ADNc de FIX humano de tipo silvestre con el polimorfismo ala148 (McGraw, R.A., Davis, L. M., Noyes, C. M., Lundblad, R. L., Roberts, H. R., Graham, J.B. y Stafford, D. W. (1985) Evidence for a prevalent dimorphism in the activation peptide of human coagulation factor IX. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 82, 2847-2851), se genera por digestión con EcoRI de pFIX-bluescript, que se ha generado por inserción de FIX humano procedente de una biblioteca de ADNc de hígado humano cebado aleatoriamente dentro de pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), e inserción del fragmento resultante en phact parcialmente digerido con EcoRI.

El vector pCMV-FIX-neo se genera insertando el fragmento EcoRI del vector pFIX-bluescript en pCMV $\beta$  (Clontech), en el que se ha retirado el ADNc de  $\beta$ gal. Dentro de este vector, el codón para ala se ha cambiado por el de thr por mutagénesis específica de sitio mediante PCR, cambiando el polimorfismo natural de ala148 a thr148. El producto de PCR se reinserta de nuevo en el mismo vector. El fragmento EcoRI de este vector se clona en pDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para producir pCMV-FIX-neo.

El vector pCMV-VKORC1-EDHpro se genera usando el vector pCEP4-VKORC1 (proporcionado amablemente por el Prof. Oldenburg, para su descripción véase Rost y col., 2004) como un molde para la PCR. El producto de PCR que contiene el ADNc de rVKORC1 se clona en el provector pCMV-EDH (Herlitschka, S.E., Falkner, F.G., Schlokot, U., y Dorner, F. (1996). Overexpression of human prothrombin in permanent cell lines using a dominant selection/amplification fusion marker. Protein Expr. Purif., 8, 358-364).

## Cultivo celular y transfecciones

Las células CHO DUKX/DXB11 se obtienen de la Universidad de Columbia (Nueva York, NY) y se cultivan en una mezcla de DMEM/F12 de Ham (1:1) (Invitrogen) suplementada con un 5% de suero bovino fetal (PAA, Linz, Austria), desoxiadenosina, adenosina y timidina (todo de Sigma, St. Louis, MO) y L-Glutamina (Invitrogen) y penicilina/estreptomina (Invitrogen). Las células HEK293 (ATCC N° CRL-1573) se cultivan en una mezcla de DMEM/F12 de Ham (1:1) suplementada con un 5% de suero bovino fetal y L-Glutamina y penicilina/estreptomina. Para las transfecciones estables, se utiliza un procedimiento de coprecipitación con fosfato cálcico. Las células CHO rFIX se generan por cotransfección con los plásmidos linealizados phact-FIX y pSV-DHFR y por selección en la mezcla de DMEM/F2 de Ham (1:1) sin hipoxantina, glicina y timidina (Invitrogen) suplementada con un 5% de FBS dializado (PAA). Para la amplificación génica, se añade MTX (Ebewe, Unterach, Austria) en etapas incrementando las concentraciones desde 10 nM hasta 200 nM. Las células HEK293 se transfectan con el plásmido pCMV-FIX-neo linealizado y se seleccionan en un medio que contiene G418 a 500  $\mu$ g/ml (Invitrogen). Los clones celulares se aíslan por técnicas de clonación en dilución limitada bien manualmente o utilizando una técnica de selección de células por citometría de flujo.

La secreción de FIX en los sobrenadantes del cultivo celular se detecta cambiando el medio de crecimiento por un medio libre de suero suplementado con 10  $\mu$ g/ml de vitamina K1 (Sigma). Los sobrenadantes se recogen y se determinan las concentraciones de FIX por ELISA y por ensayo de coagulación (tiempo parcial de tromboplastina activada, APTT). Para el cálculo de las tasas de secreción específicas, se hace el recuento del número de células usando un contador celular CASY (Schärfe Systems, Reutlingen, Alemania).

Para los experimentos de coexpresión transitoria, el plásmido no linealizado pCMV-VKORC1-EDHPro se transfecta usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Como control negativo, se usa el mismo vector sin ADN de rVKORC1.

## Métodos analíticos

Los ELISA se realizan utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-FIX humano (Accurate Chemical, Westbury, NY) en una dilución de 1:40000 como anticuerpo primario, y un anticuerpo policlonal de cabra anti-FIX humano conjugado con peroxidasa de rábano rústico como anticuerpo de detección. Como referencia se usa un FIX derivado de plasma humano (Enzyme Research Laboratories, S. Lafayette, IN). El APTT se determina utilizando un coagulómetro automático STA Compact (Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) diluyendo las muestras de FIX en plasma deficiente en FIX. Todos los reactivos para la coagulación se consiguieron en Baxter, Viena, Austria.



## Resultados

Se someten a transfecciones transitorias dos líneas celulares que producen rFIX de forma estable, una derivada de CHO y la otra de HEK293, con el vector de expresión pCMV-VKORC1-EDHpro que lleva un ADNc que codifica VKORC1 humana. Como controles, se usaron el vector vacío pCMV-EDHpro y la línea celular que expresa rFIX de forma estable. Después de las transfecciones transitorias, las células se dejan una noche en medio que contiene suero. Las células se lavan con PBS y se cultivan durante 24 horas en medio libre de suero, y después se recogen los sobrenadantes. La expresión de rFIX y la secreción en el medio se controla por procedimientos diagnósticos inmunoquímicos y de coagulación, midiendo el nivel de antígeno o la actividad coagulante. Para estimar los efectos sobre la productividad celular, se calculan las tasas de secreción basándose en la concentración de producto por número de células y 24 horas (Fig. 1 a Fig. 4).

Las células HEK293 que expresan rFIX muestran un incremento medio de 2,7 veces en las tasas de secreción específica y un incremento de 2,9 veces en las concentraciones de rFIX, tras la transfección con rVKORC1 en comparación con el control de vector vacío. Estos valores están basados en las mediciones de APTT. Los valores de ELISA muestran un incremento de 2,0 veces de las concentraciones y un incremento de 1,8 veces de las productividades específicas.

Para la línea celular derivada de CHO productora de rFIX, se observa un incremento de 1,5 veces en los títulos de ELISA y un incremento de 1,2 veces en las tasas de secreción específica basadas en ELISA. Las tasas de secreción calculadas con APTT son 1,4 veces mayores y las concentraciones de FIX medidas con APTT 1,7 veces mayores.

A partir de estos valores se puede concluir que se pueden alcanzar concentraciones más altas del rFIX producido en los dos tipos de células diferentes en presencia de rVKORC1, principalmente debido a una mayor tasa de secreción de rFIX con especificidad de célula. Una razón de la mayor tasa de secreción de moléculas de rFIX con  $\gamma$ -carboxilación completa podría ser un mecanismo de control de calidad celular para esta modificación post-traduccional (Lin, P. J., Straight, D.L., y Stafford, D.W. (2004) Binding of the factor IX gamma-carboxyglutamic acid domain to the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase active site induces an allosteric effect that may ensure processive carboxylation and regulate the release of carboxylated product. *J. Biol. Chem.*, 279, 6560-6566). Los mayores incrementos en los valores de APTT con respecto a los valores de ELISA en el caso de las dos líneas celulares también indican una mejor actividad coagulante del FIX.

El hecho de que rVKORC1 tenga efectos sobre la coexpresión de rFIX en las células derivadas de HEK293 más potentes que en las células CHO se puede explicar por una mayor productividad celular de rFIX. Antes de las transfecciones transitorias de VKORC1, el clon derivado de células HEK293 tiene una productividad 3,5 veces mayor que el clon derivado de células CHO en lo que respecta a los valores de APTT, y una productividad 5 veces mayor en lo que respecta a los valores del ELISA. Esto indica un grado más bajo de procesamiento post-traduccional en las células derivadas de la línea HEK293 debido a una mayor productividad. Por lo tanto, se produce un mayor rendimiento de la isoforma activa de rFIX cuando se restaura la capacidad de  $\gamma$ -carboxilación por coexpresión de rVKORC1 en esta línea celular.

### **Ejemplo 2: Coexpresión transitoria de VKORC1 recombinante humana en líneas celulares de mamífero derivadas de CHO y HEK293 que producen establemente factor de coagulación VII recombinante humano (rFVII)**

Cualquier influencia de rVKORC1 sobre la actividad y/o la tasa de secreción de rFVII puede estudiarse por coexpresión transitoria en células que producen factor VII de coagulación recombinante humano (rFVII). De esta forma, la mayor parte de la población celular que produce rFVII también coexpresa VKORC1 durante un corto periodo de tiempo. Durante este periodo, el rFVII secretado se puede muestrear, caracterizar y comparar con el rFVII secretado por las mismas líneas celulares transfectadas en paralelo con un vector vacío de control.

La expresión estable de rFVII en células de mamífero se puede alcanzar por transfección con vectores plasmídicos que contienen el ADNc de rFVII humano y genes de resistencia de selección y la posterior selección de clones productores. Para la expresión estable de rFVII se pueden usar las mismas líneas celulares hospedadoras indicadas en el Ejemplo 1. Los procedimientos de selección genética y de amplificación génica, y la exploración de clones productores tienen que llevarse a cabo analógicamente.

Posteriormente, un vector de expresión que lleva el ADNc de VKORC1 humano puede ser transfectado transitoriamente para alcanzar la coexpresión de VKORC1 recombinante (rVKORC1) de la misma forma que se ha descrito en el Ejemplo 1.

## Materiales y métodos

### Vectores de expresión

Un vector de expresión que comprende la información genética de rFVII humano se puede construir aislando el ADNc de FVII humano por PCR a partir de una fuente apropiada tal como el vector de expresión de vaccinia pselp/huFVII (Himly y col., 1998) como molde. El producto de la PCR puede insertarse a través de sitios de

restricción en un vector de expresión de mamífero que ofrezca un promotor viral potente tal como el de citomegalovirus (CMV) y un marcador de selección de antibiótico adicional tal como el gen de resistencia a la higromicina o la neomicina, por ejemplo pcDNA3.1/hyg+ o pcDNA3.1/neo+ (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5 Para la expresión génica estable en el sistema de expresión CHO-DHFR<sup>r</sup>, se puede utilizar un plásmido adicional tal como pSV-DHFR como se describe en el Ejemplo 1 para posibilitar la selección de clones celulares que contienen DHFR y la amplificación de gen MTX.

Para la expresión transitoria de rVKORC1 se puede utilizar el vector pCMV-VKORC1-EDHpro como se describe en el Ejemplo 1.

#### Cultivo celular y transfecciones

10 Se pueden utilizar las mismas líneas celulares y protocolos de cultivo que se han descrito en el Ejemplo 1. Para generar transfectantes estables, se puede utilizar un procedimiento de coprecipitación con fosfato cálcico. Los plásmidos tienen que linealizarse por digestión con enzimas de restricción antes de las transfecciones. Para la transfección estable de líneas celulares CHO o HEK293 hospedadoras, se puede usar un vector de expresión de mamífero que contenga ADNc de FVII. Las células CHO DUKX DXB11 deben cotransfectarse con pSV-DHFR. Si se  
15 usa la higromicina B como agente de selección, su concentración debe ser de 100 µg/ml en el medio para seleccionar transfectantes derivados de HEK293, y de 250 µg/ml en el caso de los transfectantes derivados de CHO. Si como marcador de selección se usa la resistencia a la neomicina, las concentraciones de G418 se deben ajustar como se describe en el Ejemplo 1 para cada tipo celular.

20 Los protocolos de transfección transitoria incluyen el uso del reactivo Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 como se describe en el Ejemplo 1. Para poder comparar las células que expresan rVKORC1 transitoriamente con un control negativo adecuado, el vector pCMV-VKORC1-EDHpro y el mismo vector sin la secuencia de ADNc de VKORC1 deben transfectarse en paralelo en varias repeticiones, preferentemente en placas de 6 pocillos. Las células derivadas de la misma población se distribuyen a iguales densidades celulares por pocillo. Cuando se produce la confluencia, todas las transfecciones se realizan simultáneamente.

25 La secreción de rFVII en los sobrenadantes del cultivo celular se puede detectar cambiando el medio de crecimiento por un medio libre de suero suplementado con una serie de concentraciones de vitamina K1 que varían de 0,1 a 10 µg/ml. Los sobrenadantes se pueden recoger después de 24 horas y las concentraciones de rFVII se pueden determinar por procedimientos adecuados como se describe posteriormente. Para el cálculo de las tasas de secreción de rFVII específica, las células deben contarse, por ejemplo, utilizando un contador celular CASY (Schärfe  
30 Systems, Reutlingen, Alemania), o por el procedimiento de exclusión de azul tripán.

#### Ensayos analíticos

Para seleccionar los clones productores de rFVII y para relacionar las actividades de FVII con los niveles de antígeno, son apropiados los siguientes ensayos:

35 La actividad de FVII puede medirse en un ensayo de coagulación como el tiempo de coagulación de protrombina (PT) o en un ensayo cromogénico de acuerdo con la Farmacopea Europea (Farmacopea Europea 5, 2005) como la cantidad de factor de coagulación Xa (FXa) generado cuantificada por la conversión de un sustrato cromogénico de FXa. Los niveles de antígeno FVII se pueden determinar por ELISA utilizando pares de anticuerpos apropiados, por ejemplo un antisuero policlonal de oveja anti-FVII humano purificado por afinidad (Affinity Biologicals, Ancaster, Canadá) diluido a 1:3000 para la captura, y un antisuero policlonal de oveja anti-FVII humano conjugado con peroxidasa del rábano rusticano (Cedarlane, Ontario, Canadá; diluido a 1:2000) para la detección, seguido de la  
40 adición de un reactivo cromogénico apropiado para la detección fotométrica.

Para todos los ensayos, las preparaciones de FVII derivadas del plasma se deben usar como material de referencia, que se ensayan frente al patrón de FVII internacional 97/592. Las actividades coagulantes específicas relativas se pueden estimar calculando las relaciones entre el antígeno medido y los valores de actividad y comparando estos  
45 valores internamente o con valores de FVII derivado de plasma o preparaciones de FVII.

Para estimar los niveles de FVIIa como parte del rFVII total secretado, se pueden utilizar los siguientes ensayos: el ensayo Staclot® (Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) es adecuado para medir el tiempo de coagulación de protrombina de FVIIa selectivamente (Morrisey y col., 1993). Los niveles de FVIIa deben ensayarse frente al patrón de FVIIa internacional 89/688.

#### 50 Resultados

Una línea celular derivada de CHO que produce rFVII estable se somete a transfecciones transitorias con un vector de expresión pCMV-VKORC1-EDHpro que codifica VKORC1. Como control se puede usar el vector vacío pCMV-EDHpro sin el ADNc que codifica VKORC1. Las células se siembran en placas de 6 pocillos a concentraciones celulares de  $1 \times 10^6$  células por pocillo. Cuando se alcanza la confluencia, el procedimiento de transfección transitoria  
55 se lleva a cabo por duplicado. Tras una incubación de una noche, las células se incuban en medio libre de suero sin

vitamina K1 para vaciar las reservas internas de vitamina K1 de las células debidas a los suministros de FBS. Después de 24 horas, el medio se cambia por medio libre de suero que contiene vitamina K1 a varias concentraciones que varían de 0 a 5  $\mu\text{g/ml}$ . Los sobrenadantes se recogen para análisis posteriores. Las productividades durante 24 horas se determinan a partir de los valores de antígeno rFVII y concentración de actividad que se miden por ELISA y ensayos de coagulación de una etapa. La actividad de coagulación de FVII específica se calcula como unidades de coagulación por FVII por  $\mu\text{g}$  de antígeno. Para estimar el grado de autoactivación de rFVIIa a rFVIIa, se puede usar el ensayo Staclot®. En las Figs. 6A, 6B y 6C se muestran los resultados de estos experimentos.

Después de la transfección transitoria con los dos vectores construidos, se determinan los niveles de expresión de rFVII por ELISA (Fig. 6A) y coagulación de FVII (Fig. 6B). No hay cantidades significativas de rFVIIa producidas por la línea celular, por lo tanto, la actividad de rFVII se puede correlacionar con la productividad de rFVII.

Sin vitamina K1 en el medio, la productividad celular y la actividad específica del rFVII producido son significativamente menores con y sin coexpresión de rVKORC1. En el caso de coexpresión de rVKORC1, la productividad de rFVII se recupera a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  hasta un valor 4 veces mayor que la transfección de control con el vector vacío, como se mide tanto por coagulación como por ELISA. La coexpresión de rVKORC1 mejora el uso de la vitamina K1 añadida al medio de cultivo celular independientemente de la concentración de vitamina K1. En general, la productividad de rFVII, determinada por dos procedimientos diferentes, es hasta cuatro veces mayor que el control a todas las concentraciones de vitamina K1 con coexpresión de rVKORC1. La actividad específica expresada en unidades de coagulación por  $\mu\text{g}$  de rFVII producido muestra valores significativamente menores solo a 0  $\mu\text{g/ml}$  de vitamina K1, y no muestra diferencias significativas con o sin rVKORC1.

Cuando se comparan líneas celulares derivadas de CHO con líneas celulares derivadas de HEK293 que expresan establemente rFVII tras la coexpresión transitoria de rVKORC1 en un experimento similar, se pueden encontrar productividades significativamente más altas que las de la transfección de control en ambos casos (Fig.7). En este experimento, se usan 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de vitamina K1. Para las células CHO-rFVII, se puede encontrar un nivel de expresión de rFVII 2,5 veces mayor con coexpresión de rVKORC1 que el del control, como se determinó por coagulación y ELISA.

Se puede concluir que la  $\gamma$ -carboxilación es una etapa limitante de la velocidad para la productividad de rFVII, cuando la forma reducida de vitamina K requerida para esta reacción no está disponible en cantidades suficientes. Un supuesto mecanismo de control celular retiene las moléculas de rFVII con  $\gamma$ -carboxilación incompleta dentro de la célula (Lin y col., 2004). La coexpresión transitoria de rVKORC1 mejora la productividad de rFVII en un amplio intervalo de concentraciones de vitamina K1, proporcionando un mejor suministro de forma reducida de vitamina K que asegura la  $\gamma$ -carboxilación completa.

Estos hallazgos están de nuevo en concordancia con trabajos previos, en los que la coexpresión de  $\gamma$ -carboxilasa llevaba a un descenso en la productividad del factor IX humano recombinante en células de mamífero (Hallgren y col., 2002). La única función conocida de VKORC1 en el metabolismo celular hasta la fecha es la reducción del 2,3-epóxido de vitamina K o la forma hidroquinona necesaria para la reacción de  $\gamma$ -carboxilación. Aunque las líneas celulares de mamífero posean una maquinaria de  $\gamma$ -carboxilación en buen funcionamiento *per se*, puede concluirse que la coexpresión de rVKORC1 garantiza la calidad deseada de  $\gamma$ -carboxilación completa de la proteína rFVII.

### **Ejemplo 3: Coexpresión bicistrónica estable de rVKORC1 y rFVII en líneas celulares derivadas de CHO tras la transfección génica no viral.**

Para hacer uso de cualquier efecto de la coexpresión de rVKORC1 sobre la  $\gamma$ -carboxilación dentro del alcance de generar líneas celulares de mamífero estables para la producción de rFVII, se puede usar un sistema de expresión bicistrónica. Con dicho sistema, se puede conseguir la expresión simultánea de dos proteínas en células eucariotas tras el suministro de un solo vector de expresión. Además, las dos proteínas se traducen a partir de la misma molécula de ARNm simultáneamente. Esto es posible por la introducción de un elemento genético viral que se denomina secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) entre los ADNc que codifican los dos transgenes en la construcción del vector de expresión (Mountford y Smith, 1995). Tras la transcripción del ARNm a partir de la construcción de vector de ADN, que se ha integrado establemente en el cromosoma de la célula hospedadora, dos ribosomas pueden unirse al ARNm procesado llevando a la elongación simultánea de ambas cadenas polipeptídicas.

Un vector tiene que construirse de manera que se proporcionen elementos para la expresión en mamíferos, por ejemplo promotores virales fuertes, señales de poliadenilación y genes de resistencia que permitan la selección de clones. Los dos ADNc que codifican las proteínas deseadas se clonan en el vector con una secuencia IRES entre ellos.

Para comparar la expresión de rFVII con la coexpresión bicistrónica de rFVII y rVKORC1, solo puede construirse un vector de expresión de control derivado exactamente del mismo vector hospedador que lleva el ADNc rFVII. Estos dos vectores se pueden transfectar en paralelo en la misma línea celular hospedadora, por ejemplo la línea celular CHO-DHFR<sup>+</sup> CHO DUXK DXB11. Esta línea celular ofrece la oportunidad de aumentar los niveles de expresión

proteica por amplificación génica. Esto se puede conseguir por cotransfección de un plásmido que porta el gen DHFR y por incremento de los niveles del fármaco MTX durante el subcultivo como se describe en el Ejemplo 1. Por comparación del vector de coexpresión con el vector monocistrónico rFVII en este sistema de expresión y coamplificación, se pueden observar los efectos de amplificación génica sobre los niveles de expresión de rFVII y las actividades en presencia o ausencia de rVKORC1 como una proteína auxiliar. La selección de clones productores de rFVII y la caracterización del rFVII producido se puede conseguir como se explica en el Ejemplo 2. Para evitar la polarización específica de los clones cuando se comparan los dos sistemas de expresión, se deben caracterizar un gran número de clones, que se han explorado por la misma metodología.

#### Materiales y métodos

##### 10 Vectores de expresión

Las construcciones de vector plasmídico, que proceden del mismo vector hospedador como se explica en el Ejemplo 2, pueden construirse por técnicas de clonación convencionales. La construcción del vector pCMV-rFVII se puede realizar como se describe en el Ejemplo 2, el vector análogo pCMV-rFVII-IRES-VKORC1 se puede construir como sigue: el ADNc de FVII humano se puede amplificar por PCR a partir de la misma fuente que se usa en el Ejemplo 2. El elemento IRES puede aislarse del vector fuente pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA), y el ADNc de VKORC1 puede clonarse a partir del mismo vector fuente que se describe en el Ejemplo 1 (pCEP4-VKORC1). Los tres elementos pueden clonarse en el mismo vector hospedador usado para la construcción de pCMV-rFVII (véase el Ejemplo 2). En detalle, el producto de la PCR del ADNc de FVII con una secuencia de Kozak y sitios de restricción EcoRI añadidos se puede clonar en un vector intermedio (por ejemplo, pBluescript; Stratagene, LaJolla, CA) para posibilitar la escisión a través de sitios de restricción apropiados. Un fragmento HindIII/BamHI de este vector intermedio que contiene ADNc de FVII puede clonarse en pcDNA3.1/Hyg+ (Invitrogen). Esta construcción intermedia digerirse con BamHI y XhoI para permitir la inserción de un fragmento BamHI/BstXI de pIRES-EGFP (que contiene IRES) junto con un producto de PCR con ADNc de VKORC1 (obtenido a partir del molde pCEP4-VKORC1) y sitios BstXI y XhoI en los extremos 5' y 3' simultáneamente en una reacción de ligamiento para obtener pCMV-rFVII-IRES-VKORC1.

Para permitir la expresión génica y la amplificación en el sistema de expresión CHO-DHFR<sup>r</sup>, se puede usar un segundo plásmido de selección pSV-DHFR como se describe en el Ejemplo 1.

##### Cultivo celular y transfecciones

Para la generación y selección de los clones productores de rFVII deseados, pueden usarse la línea celular hospedadora CHO-DHFR<sup>r</sup> y los mismos materiales y protocolos de cultivo y transfección que se han descrito en el Ejemplo 1. La amplificación con MTX se puede realizar analógicamente.

##### Ensayos analíticos

Para caracterizar en los clones y sobrenadantes el rFVII o la actividad y concentración, y para determinar la productividad específica de célula, se pueden utilizar los mismos ensayos que se han descrito en el Ejemplo 2. La actividad de FVIIa tiene que supervisarse analógicamente.

##### Transferencias de northern

Esta técnica se puede usar para detectar la transcripción de los genes introducidos específicamente a nivel del ARNm, y comprobar los tamaños correctos de ARNm. El ARN celular total aislado y preparado a partir de una población celular puede separarse sobre un gel de agarosa y transferirse sobre una membrana de nylon. Las secuencias específicas de ARN pueden detectarse por hibridación de una sonda marcada con DIG y revelarse con un anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina (Roche, Basel, Suiza) después de unirse a la sonda hibridada por quimioluminiscencia sobre una película de rayos x. Los niveles de ARNm diana (rVKORC1 y rFVII) deben compararse frente a un gen constitutivo (por ejemplo, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de hámster (GAPDH)).

#### Resultados

Los clones celulares estables derivados de los sistemas de expresión CHO-DHFR<sup>r</sup> pueden generarse y ensayarse con respecto a la productividad de rFVII por ELISA y técnicas de coagulación de tiempo de protrombina (PT). Los plásmidos de expresión pCMV-rFVII-IRES-VKORC1 o pCMV-rFVII pueden cotransfectarse con el plásmido de selección pSV-DHFR por la técnica de coprecipitación con fosfato cálcico, y los clones pueden obtenerse por exposición al medio de selección al que le falta hipoxantina, glicina y timidina y a selección con antibiótico. Los clones derivados de una única célula se seleccionan después de una clonación de dilución limitada y se subcultivan varias veces con concentraciones crecientes de MTX para conseguir la amplificación génica. Los clones se exponen a concentraciones de MTX de hasta 320 nM en cada etapa de subclonación. De todas las rondas de subclonación, se expandieron y caracterizaron con detalle un total de 133 clones derivados de transfecciones con pCMV-rFVII y 83 clones derivados de transfecciones con la construcción de coexpresión de rVKORC1. Por los sobrenadantes de los cultivos celulares, las concentraciones de rFVII se pueden determinar por ELISA, las actividades de rFVII y rFVIIa se miden por ensayos de coagulación PT en paralelo. Para la caracterización, solamente se consideran los clones con

menos de un 10% de rFVII activado a FVIIa para evitar los valores de coagulación de FVII de alta especificidad artificial (datos no mostrados). Los niveles de expresión se calculan a partir de los valores de concentración por ELISA como ng por  $10^6$  células por 24 horas. La actividad de coagulación de FVII específica se calcula como unidades de coagulación por  $\mu\text{g}$ .

5 En la Fig. 8 se representan los valores de productividad específica basados en ELISA frente a las concentraciones de MTX para clones que solo expresan rFVII (Fig. 8A), y clones que coexpresan rFVII-rVKORC1 (Fig. 8B), respectivamente. En ambas líneas es visible una relación entre los niveles de MTX y los niveles de expresión. Los clones iniciales sin MTX empiezan a niveles comparables o incluso más altos para los clones con solo rFVII. Especialmente, cuando se incrementa el MTX a bajos niveles de partida de 20 a 40 nM, es claramente visible un patrón de aumento concomitante escalonado de los niveles de expresión para los clones que coexpresan rFVII-rVKORC1 en la Fig. 8A frente a la Fig. 8B. A MTX 80 nM, todos los clones que coexpresan rFVII-rVKORC1 expresan de 2 a 80 veces más rFVII que los clones iniciales, mientras que en el caso de los clones con solo rFVII, todavía se encuentran algunos clones con niveles de expresión similares a los clones iniciales. Desde 20 nM en adelante, se encuentran mejores clones productores entre los clones rFVII-rVKORC1 en comparación con los clones con solo rFVII a todos los niveles de MTX. Se puede ver que el nivel de expresión de los mejores clones productores de rFVII tras la amplificación génica es dos veces mayor con la coexpresión de rVKORC1, especialmente en las rondas iniciales de incremento de MTX.

Con respecto a la actividad de coagulación de FVII específica, los valores calculados para todos estos clones se pueden representar frente a la productividad para comparar la funcionalidad de las proteínas. En la Fig. 9 se comparan las dos líneas mostrando valores de actividad aproximadamente iguales a intervalos de productividad similares con un declive global a mayor productividad en ambas líneas. Como se encuentran coproductores de rFVII-rVKORC1 con una productividad más de dos veces mayor, no pueden compararse los valores de actividad a un intervalo mayor de  $4 \mu\text{g}$  por  $10^6$  células por día. Por encima de este nivel de expresión en los clones rFVII-rVKORC1, se puede mantener un valor constante de actividad de 2 U por  $\mu\text{g}$  similar al FVII derivado del plasma. (Moor y col., 1995).

La funcionalidad y la integración genómica funcional de la construcción de vector que incluye el elemento IRES que lleva a la transcripción de un único ARNm bicistrónico que contiene secuencias que codifican rFVII y rVKORC1 se pueden demostrar por la técnica de transferencia de northern, especialmente si no se dispone de un ensayo específico de VKORC1.

30 La Fig. 10 muestra un ejemplo de una transferencia de northern, en el que se ha aislado el ARNm total de células transfectantes derivadas de CHO o de células de control después de la lisis celular, y se ha transferido a una membrana de nylon tras la separación electroforética. Posteriormente, la membrana se ha hibridado tres veces con sondas de ADN marcadas con DIG específicas para VKORC1 humano, para FVII humano y para un gen de referencia, GAPDH de hámster. Las sondas se detectan con anticuerpos marcados específicos de DIG. Las muestras son: células CHO-DHFR<sup>-</sup> no transfectadas, un clon derivado de CHO que expresa solo rFVII, dos clones, que se han transfectado posteriormente con vectores que codifican rFVII y rVKORC1 como se describió en el Ejemplo 3, y tres clones con coexpresión bicistrónica de rFVII y rVKORC1. Con las tres sondas pueden detectarse transcritos de ARNm con tamaños de aproximadamente 2,4 kb para la construcción de rFVII-IRES-rVKORC1, de 1,4 kb para la construcción de rFVII, de 0,5 kb para el ARNm de rVKORC1 y de 1,0 kb para el ARNm de control de GAPDH. Puede encontrarse GAPDH en todos los clones, mientras que rVKORC1 y rFVII están presentes de acuerdo con los vectores plasmídicos transfectados en las líneas celulares respectivas.

En resumen, la coexpresión bicistrónica estable de rVKORC1 tiene un efecto potenciador sobre la productividad de rFVII en células de mamífero, especialmente cuando se aplica la amplificación génica. El rendimiento de los clones de alta producción de rFVII tras la transferencia génica es mayor con coexpresión de rVKORC1. Con la mitad de los clones explorados, pueden conseguirse niveles de expresión dos veces más altos a los mismos niveles de concentración de MTX. La actividad proteica puede mantenerse a altos niveles de secreción de proteínas celulares. Ambos efectos se pueden explicar por un aporte suficiente de la forma reducida de vitamina K requerida para la reacción de  $\gamma$ -carboxilación, que tiene que producirse a una alta tasa de renovación a altos niveles de secreción de proteínas para asegurar la liberación oportuna de la proteína completamente carboxilada.

#### 50 **Ejemplo 4: Coexpresión estable de rFVII y rVKORC1 tras dos transfecciones no virales posteriores en células de mamífero CHO o HEK293**

Para verificar los efectos de rVKORC1 como proteína auxiliar sobre la expresión recombinante de rFVII en un cultivo celular de mamífero, se puede usar otra aproximación para conseguir la coexpresión de rVKORC1 junto con rFVII. Se puede emplear una estrategia para seleccionar clones que muestren una coexpresión estable de rFVII y rVKORC1 después de una segunda transfección. Un clon, que se ha seleccionado para la expresión de rFVII tras la transfección estable, puede transfectarse una segunda vez con otro vector plasmídico que codifique VKORC1 humano. Se puede introducir un segundo marcador de resistencia para asegurar una etapa de selección por resistencia a otro antibiótico. Como control apropiado, en la misma población celular se puede transfectar en paralelo el mismo vector sin ADNc de VKORC1. A partir de estas transfecciones pueden aislarse clones estables después de la selección simultánea con dos antibióticos en una etapa de clonación y caracterizarse como se

describe en los Ejemplos 2 y 3. Una comparación de estos clones que se acaban de aislar debería proporcionar conclusiones sobre los efectos de la coexpresión de rVKORC1 sobre la productividad y actividad de rFVII.

Materiales y métodos

Vectores de expresión

5 Para generar clones que produzcan rFVII, se pueden utilizar los mismos vectores de expresión y fuentes de ADNc de rFVII que han indicado en el Ejemplo 2. Para el sistema CHO-DHFR<sup>r</sup> se puede usar un plásmido de selección adicional pSV-DHFR.

10 Para lograr la coexpresión de rVKORC1 tras una segunda transfección, se puede coger un vector que codifique VKORC1 humana y un marcador de selección de antibiótico diferente del usado para la primera transfección. Este vector puede construirse por inserción de un producto de PCR generado a partir del mismo molde como se describe en el Ejemplo 1 en un vector basado en pcDNA3.1 (Invitrogen). En este caso, se debe tomar el mismo vector pcDNA3.1 sin inserto para la 2<sup>a</sup> transfección de control. Como alternativa, se puede tomar el vector pCMV-VKORC1-EDHpro como se describe en el Ejemplo 1 como vector de expresión para la misma transfección. Como plásmido de control se puede usar el vector vacío pCMV-EDHpro (véase como referencia el Ejemplo 1).

15 Cultivo celular y transfecciones

20 Para generar líneas celulares estables que produzcan rFVII se pueden usar las mismas líneas celulares que se usan en el Ejemplo 1, CHO y HEK293. Por consiguiente, se pueden utilizar todos los medios de cultivo celular, y protocolos de cultivo y transfección. Para conseguir una coexpresión estable de rVKORC1 en estas líneas celulares, se puede usar una segunda transfección usando coprecipitación con fosfato cálcico. Se necesita otra etapa de clonación usando un fármaco adicional de selección antibiótica para obtener clones con coexpresión de rFVII y rVKORC1.

Ensayos analíticos

25 Para verificar la expresión de rFVII, se pueden usar los mismos ensayos para las mediciones de concentración y actividad que se describen en los Ejemplos 2 y 3. La transcripción de rVKORC1 a nivel del ARNm se puede mostrar por la técnica de transferencia de northern descrita en el Ejemplo 3.

Resultados

30 Para demostrar un efecto de la proteína auxiliar rVKORC1 sobre la expresión de rFVII, se puede emplear una aproximación de dos transfecciones y rondas de clonación posteriores. En la primera ronda, pueden aislarse clones celulares que expresan rFVII mediante técnicas apropiadas de selección tras la transfección estable y la selección antibiótica. Uno de estos clones puede expandirse y usarse para una segunda transfección con un plásmido que codifica VKORC1 humana o con un plásmido vacío de control. Se puede introducir otro marcador de selección. De nuevo, los clones se pueden seleccionar por técnicas adecuadas con respecto a la expresión de rFVII, tras la adición del segundo fármaco de selección antibiótica al medio, asegurando así la eliminación de las células no transfectadas. Los clones que se originaron por transfecciones de rVKORC1 o de control se pueden comparar en términos de productividad o actividad de rFVII. El vector de control vacío asegura que la comparación entre clones se exponga a las mismas condiciones de cultivo con influencia sobre la expresión de rFVII, especialmente la selección con dos antibióticos.

40 Típicamente, de todos los clones derivados de células transfectadas con éxito, se selecciona un pequeño número de clones de acuerdo con su productividad de rFVII y se expanden para su posterior caracterización. Esta caracterización incluye la determinación de las concentraciones secretadas de rFVII por la técnica ELISA con antígeno y por medición de las actividades de coagulación de rFVII y rFVIIa. La coexpresión de rVKORC1 y rFVII a nivel del ARNm se puede verificar por la técnica de transferencia de northern como se muestra para dos clones derivados de CHO en la figura 10, calles 3 y 4.

45 En la Fig. 11 se muestran los valores de productividad específica basados en los títulos de ELISA en sobrenadantes de cultivo para una serie de clones seleccionados que se originaron a partir de 2<sup>as</sup> transfecciones de rVKORC1 o transfecciones de control de una línea celular derivada de CHO (Fig.11A) y una línea celular derivada de HEK293 (Fig. 11B) que producen rFVII. Se puede ver, en ambos tipos de células, que los clones derivados de la transfección con rVKORC1 producen más rFVII que los procedentes de la transfección de control. El valor medio de todas las productividades es aproximadamente dos veces mayor para los clones rVKORC1 en ambos casos.

55 En las Figs. 12A y 12B se muestran las actividades de coagulación de rFVII específicas proporcionadas como unidades de coagulación de FVII por microgramo ELISA para clones derivados de ambos tipos celulares tras las 2<sup>as</sup> transfecciones. Para los cálculos de la actividad específica, no se deben considerar los clones con alta cantidad de activación de rFVII a rFVIIa, que puede medirse por un ensayo de coagulación específica para FVIIa. Puede elegirse un valor del 10% de unidades de coagulación de FVIIa por unidad de coagulación de FVII para excluir los clones que

producen una cantidad significativa de rFVII activado a rFVIIa. Por lo tanto, en la Fig. 12 se muestran menos clones que en la Fig. 11.

Las diferencias en la actividad de coagulación específica del FVII se pueden correlacionar más con el nivel de expresión que con la coexpresión de rVKORC1. Sin embargo, en el caso de los clones derivados de CHO, los clones con niveles similares de expresión muestran una actividad mayor en presencia de coexpresión de rVKORC1. En lo concerniente a la productividad tanto de los clones celulares derivados de CHO como de los clones derivados de HEK293, se puede concluir que la coexpresión de rVKORC1 lleva a una mejora media del doble en comparación con un control. Además, se puede concluir que la actividad de rFVII también está afectada por otros factores influenciados por la secreción metabólica de proteínas de la célula y la capacidad de modificación además de la  $\gamma$ -carboxilación. Los valores de productividad y actividad están de acuerdo con los resultados de los experimentos de coexpresión de rFVII/rVKORC1, como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

#### Lista de referencias

Farmacopea Europea 5. Assay of Human Coagulation Factor VII. 5ª Edición 2.7.10, 203. 2005.

Tipo de Ref: Genérica

15 Hallgren, K.W., Hommema, E.L., McNally, B.A. y Berkner, K.L., 2002. Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: implications for the release of vitamin K-dependent proteins. *Biochemistry* 41, 15045-15055.

20 Himly, M., Pfeleiderer, M., Holzer, G., Fischer, U., Hannak, E., Falkner, F.G. y Domer, F., 1998. Defective vaccinia virus as a biologically safe tool for the overproduction of recombinant human secretory proteins. *Protein Expr. Purif.* 14, 317-326.

Lin, P.J., Straight, D.L. y Stafford, D.W., 2004. Binding of the factor IX gamma-carboxyglutamic acid domain to the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase active site induces an allosteric effect that may ensure processive carboxylation and regulate the release of carboxylated product. *J. Biol. Chem.* 279, 6560-6566.

25 Moor, E., Silveira, A., van't Hoof, F., Suontaka, A.M., Eriksson, P., Blomback, M. y Hamsten, A., 1995. Coagulation factor VII mass and activity in young men with myocardial infarction at a young age. Role of plasma lipoproteins and factor VII genotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 655-664.

Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F. y Comp, P.C., 1993. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81, 734-744.

30 Mountford, P.S. y Smith, A.G., 1995. Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet.* 11, 179-184.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un organismo hospedador que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína dependiente de la vitamina K (VKD), en el que tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD recombinante se expresan en dicho organismo hospedador, y en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.
- 10 2. El organismo hospedador de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica la VKORC1 recombinante o el ácido nucleico que codifica la proteína VKD recombinante o ambos se expresan mediante un modo de expresión seleccionado del grupo que consiste en expresión inducida, transitoria y permanente.
3. El organismo hospedador de la reivindicación 1 o 2, en el que el organismo hospedador es una célula de mamífero.
4. El organismo hospedador de la reivindicación 3, en el que la célula de mamífero es una célula derivada de una línea celular de mamífero seleccionada del grupo que consiste en células CHO y células HEK293.
- 15 5. El organismo hospedador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína VKD recombinante es un factor sanguíneo procoagulante.
6. El organismo hospedador de la reivindicación 5, en el que el factor sanguíneo procoagulante se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX y factor X.
- 20 7. El organismo hospedador de la reivindicación 6, en el que el factor sanguíneo procoagulante es el factor FIX humano.
- 25 8. Un sistema de cultivo celular que comprende células que contienen un ácido nucleico recombinante que codifica una subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) y un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína dependiente de la vitamina K (VKD), en el que tanto la VKORC1 recombinante como la proteína VKD se expresan en dichas células, y en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.
9. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 8, en el que las células cultivadas son células de mamífero.
10. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 9, en el que las células de mamífero se seleccionan del grupo que consiste en células CHO y células HEK293.
- 30 11. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 8 a 10, en el que la proteína VKD recombinante es un factor sanguíneo procoagulante.
12. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 11, en el que el factor sanguíneo procoagulante se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX y factor X.
- 35 13. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 12, en el que el factor sanguíneo procoagulante es el factor IX humano.
14. Un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de una proteína recombinante dependiente de la vitamina K (VKD) en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:
  - 40 (a) proporcionar un organismo hospedador;
  - (b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD en el organismo hospedador de la etapa (a);
  - (c) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) en el organismo hospedador de la etapa (a); y
  - (d) expresar los ácidos nucleicos recombinantes de las etapas (b) y (c);
- 45 en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.
15. Un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de una proteína recombinante dependiente de la vitamina K (VKD) en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:
  - 50 (a) proporcionar un organismo hospedador que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD integrado en su genoma;
  - (b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina



K (VKORC1) en el organismo hospedador de la etapa (a); y  
(c) expresar los ácidos nucleicos de las etapas (a) y (b);

5 en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD se expresa establemente.

17. Un procedimiento para incrementar la tasa de secreción de una proteína dependiente de la vitamina K (VKD) recombinante en un organismo hospedador, que comprende las etapas de:

10 (a) proporcionar un organismo hospedador que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica una subunidad 1 del complejo reductasa de la vitamina K (VKORC1) integrado en su genoma;  
(b) insertar un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína VKD en el organismo hospedador de la etapa (a); y  
(c) expresar los ácidos nucleicos de las etapas (a) y (b);

15 en el que la tasa de secreción de la proteína VKD expresada de forma recombinante está sustancialmente incrementada cuando se compara con la expresión de la proteína rVKD en un organismo hospedador que no coexpresa rVKORC1.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el ácido nucleico recombinante que codifica VKORC1 se expresa establemente.

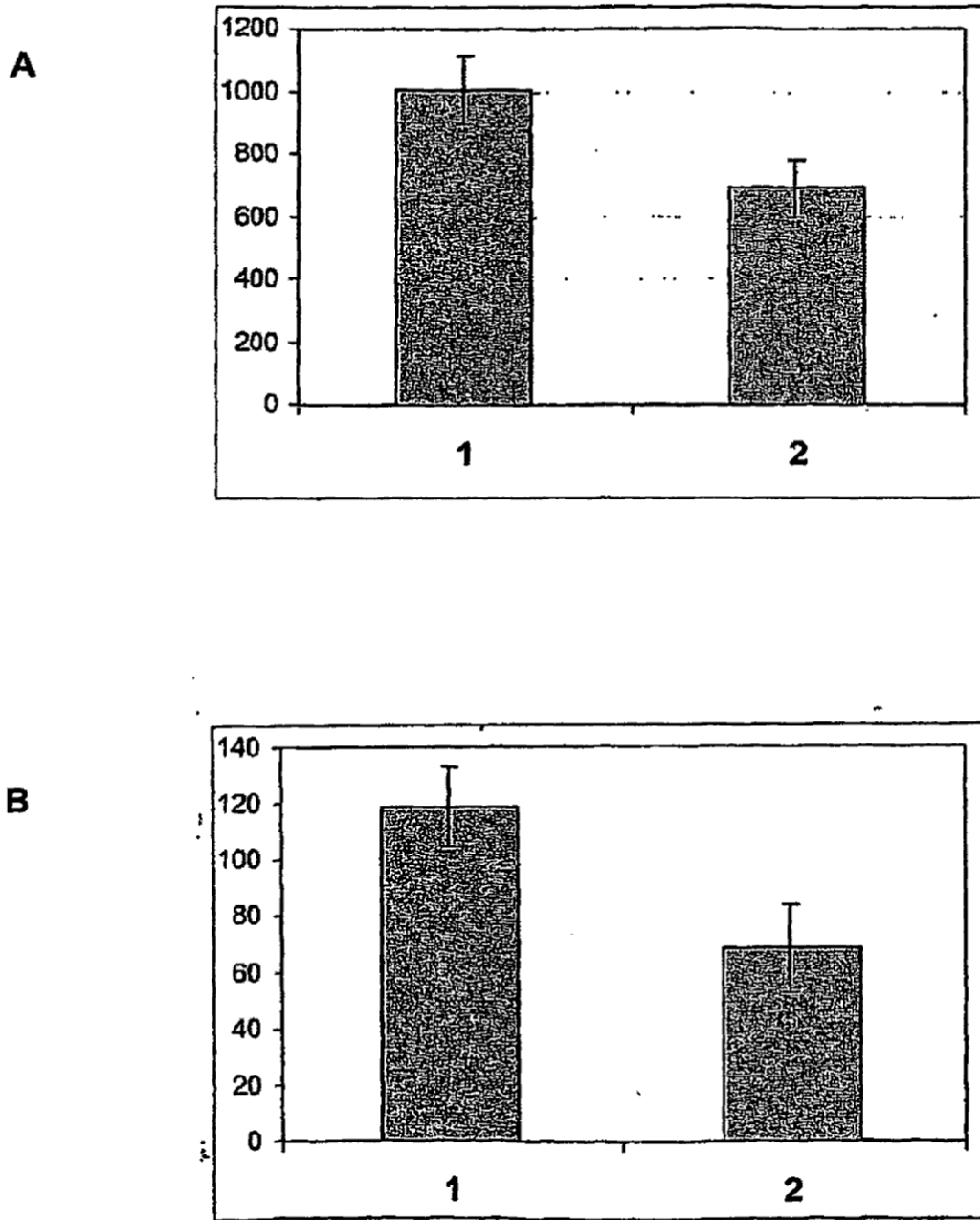
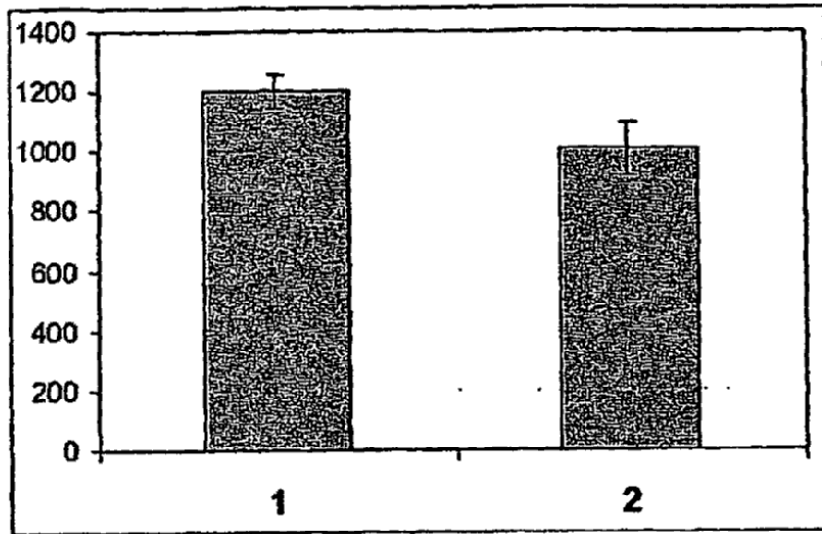


Figura 1

**A**



**B**

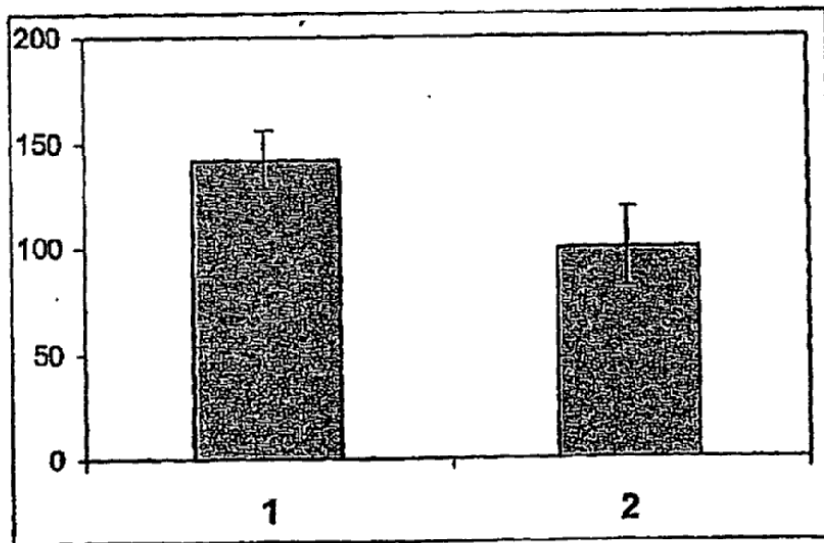
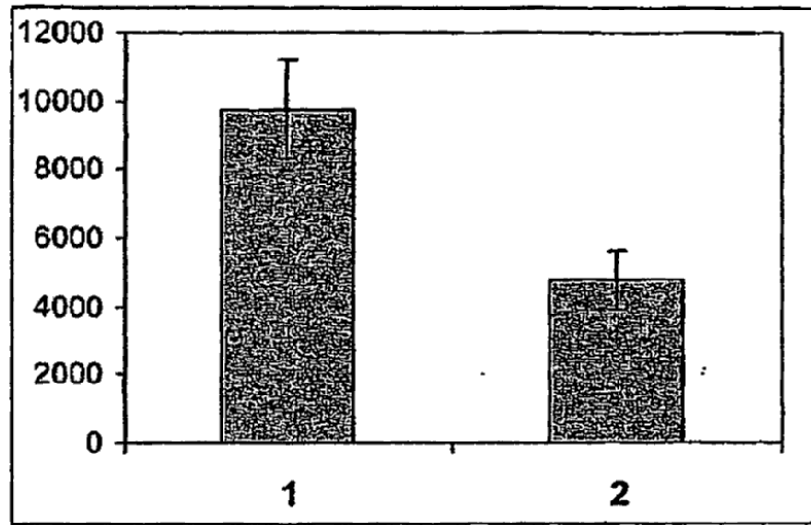


Figura 2

**A**



**B**

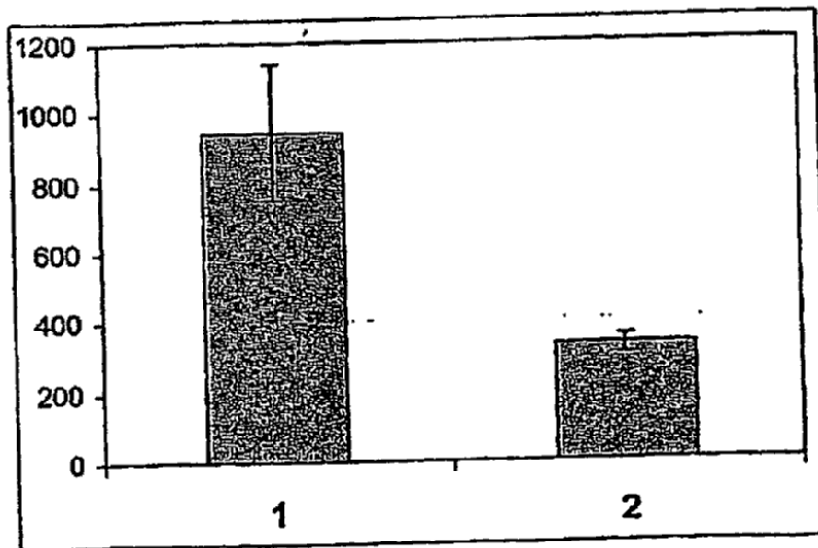


Figura 3

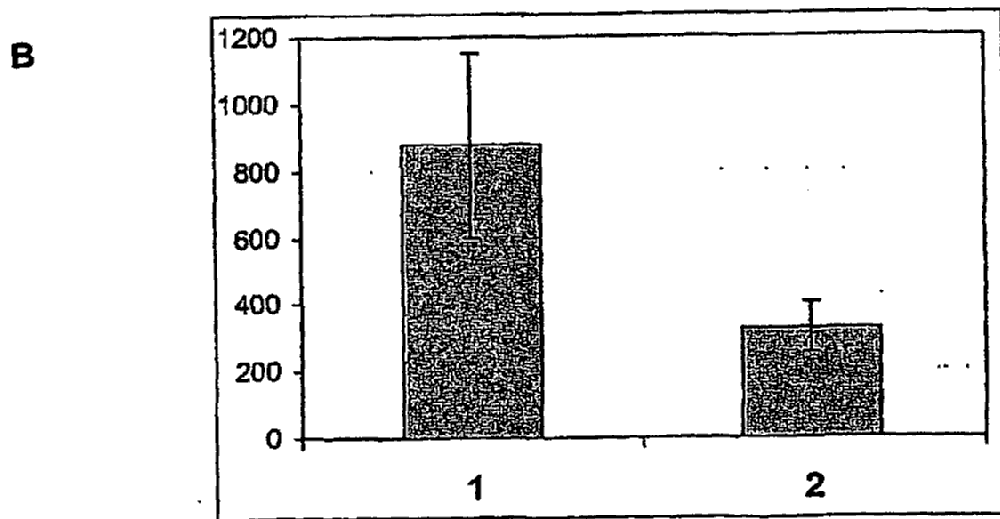
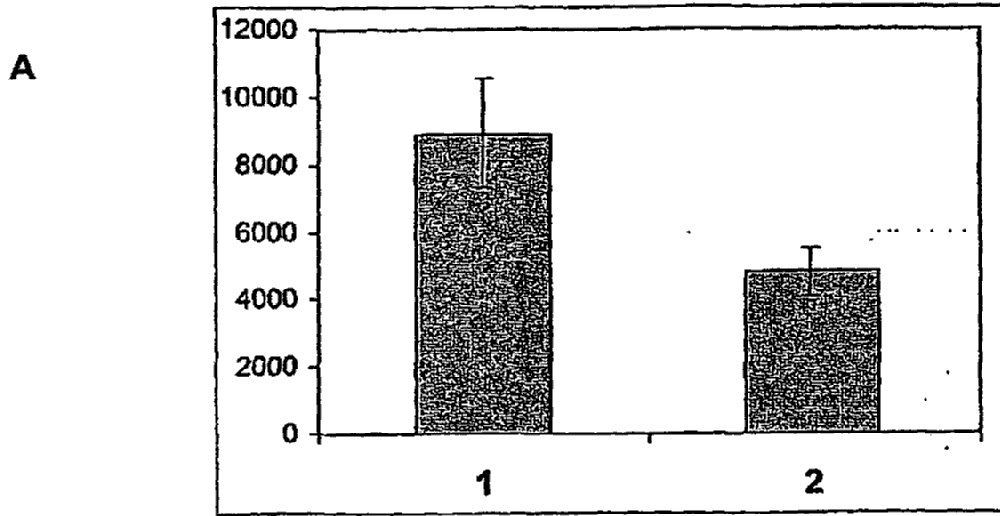


Figura 4

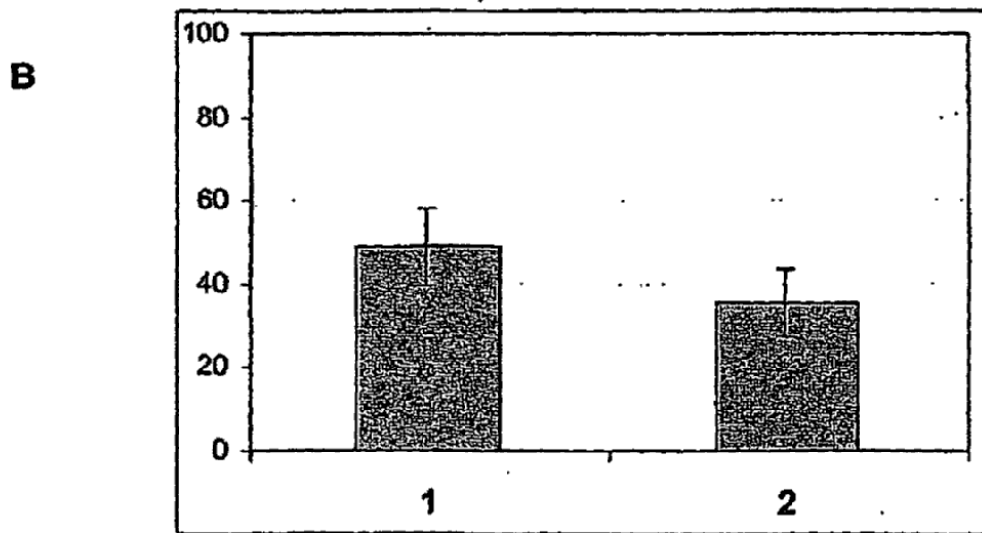
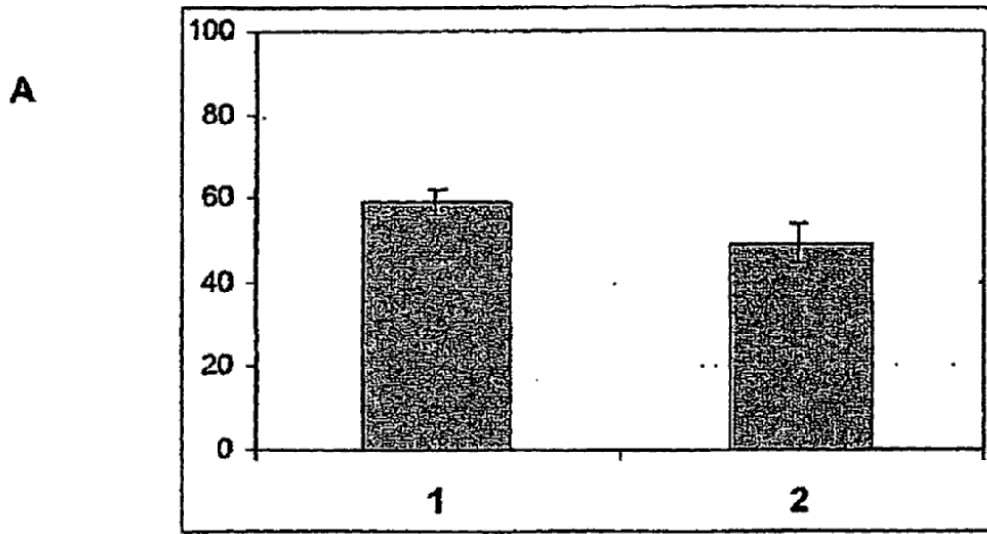


Figura 5

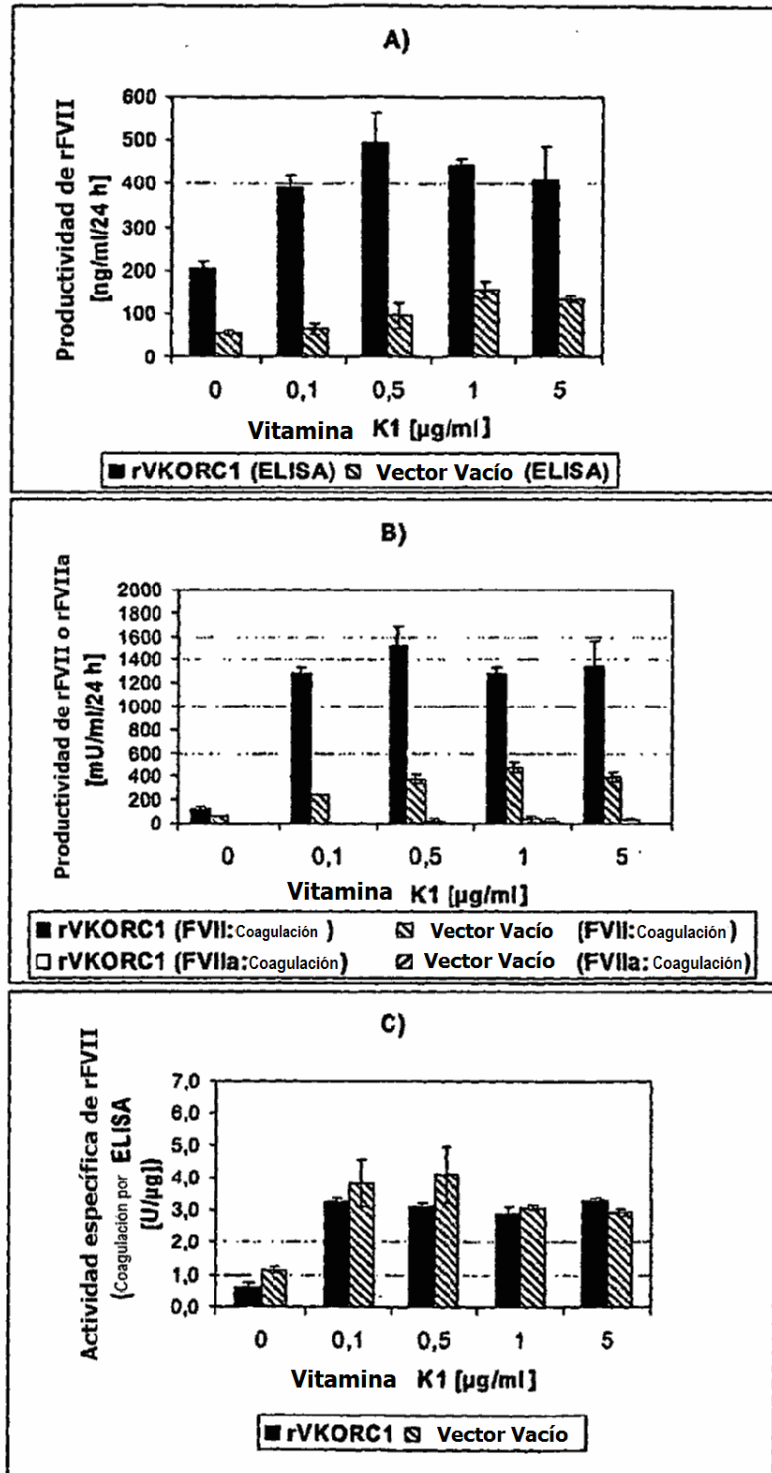


Figura 6

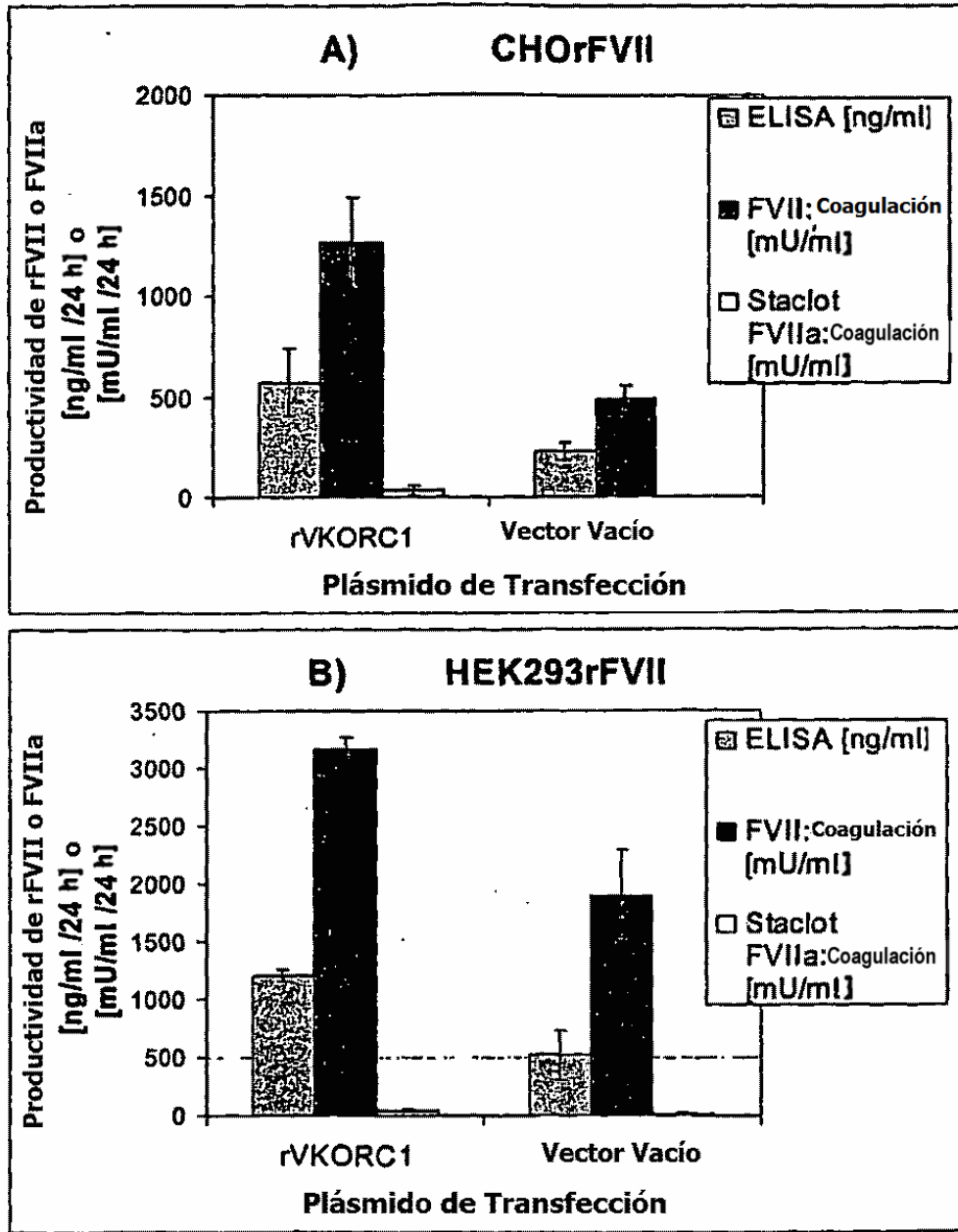


Figura 7



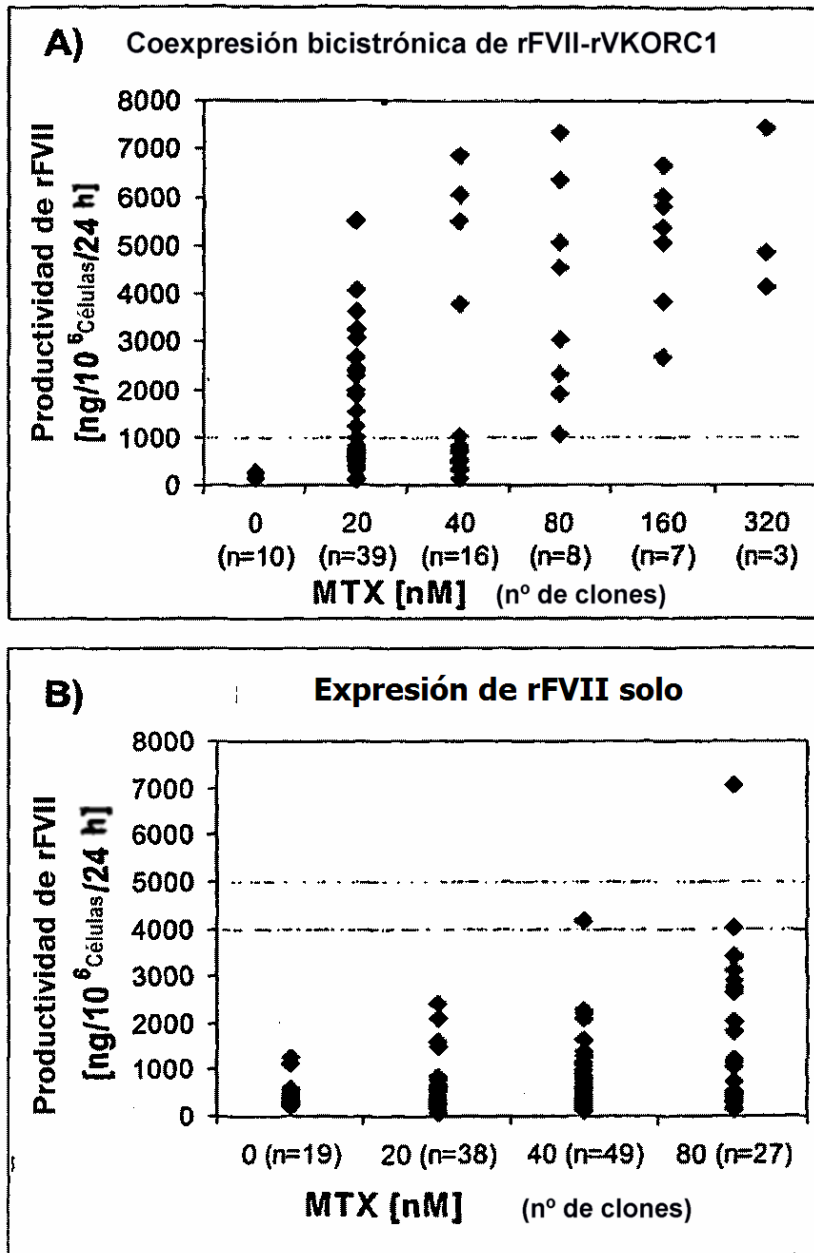


Figura 8

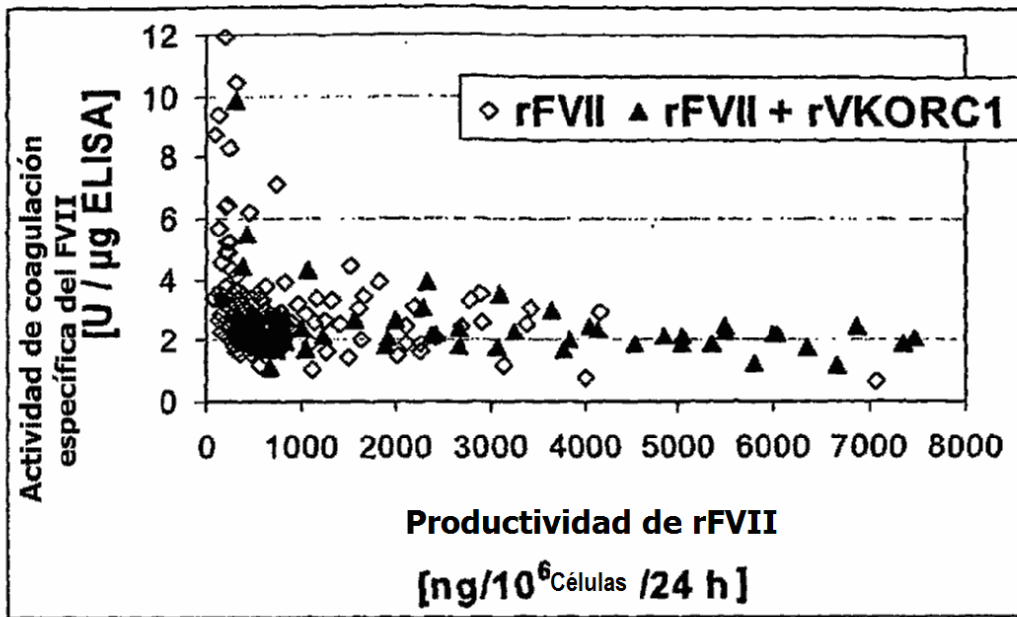


Figura 9

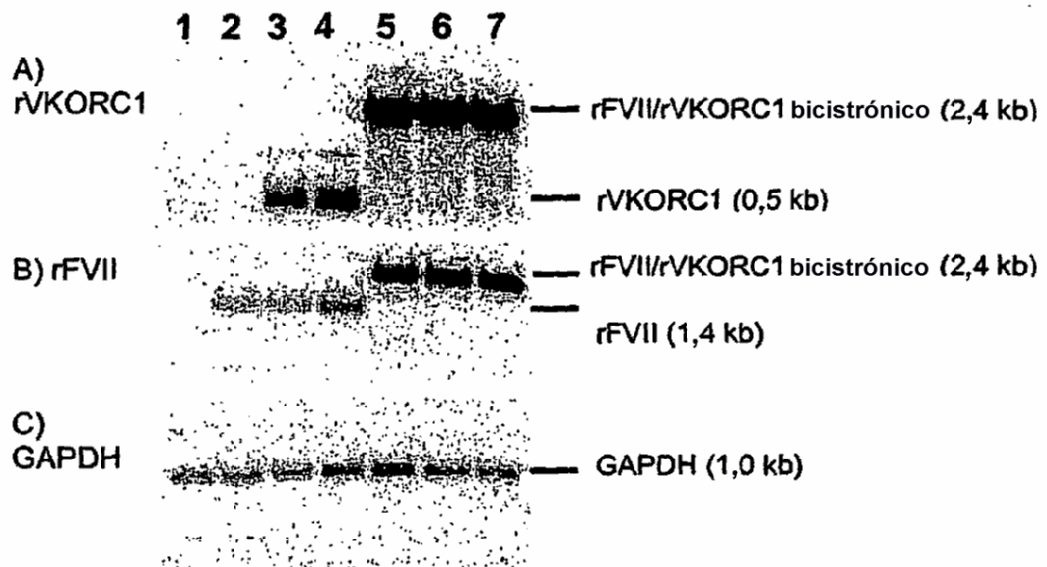


Figura 10

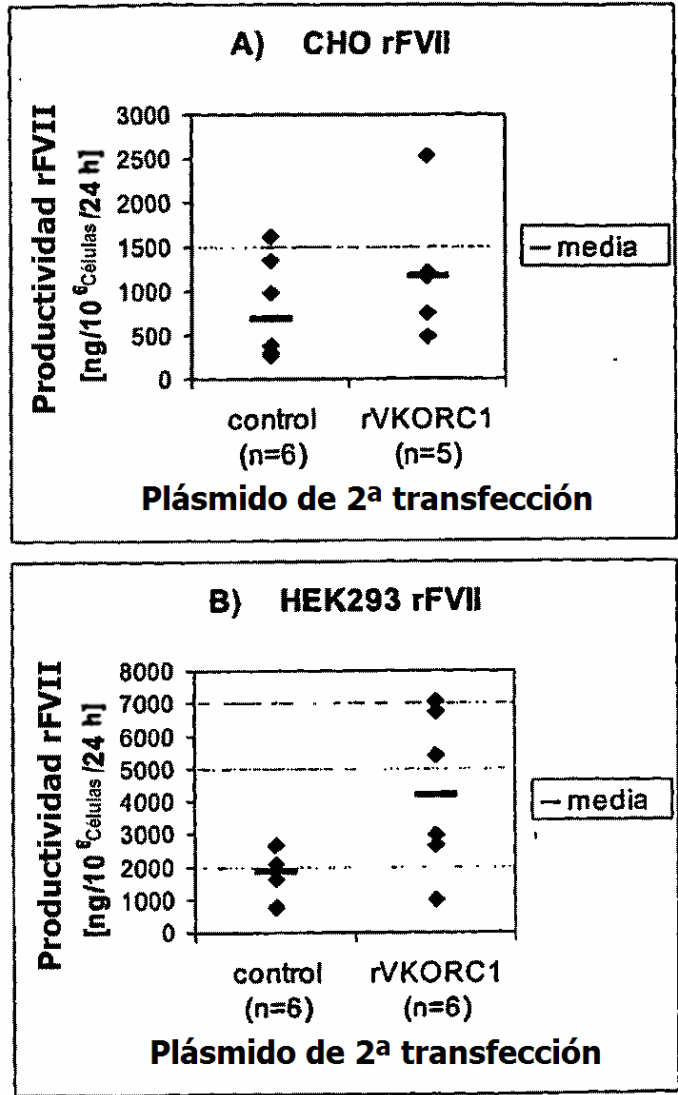


Figura 11

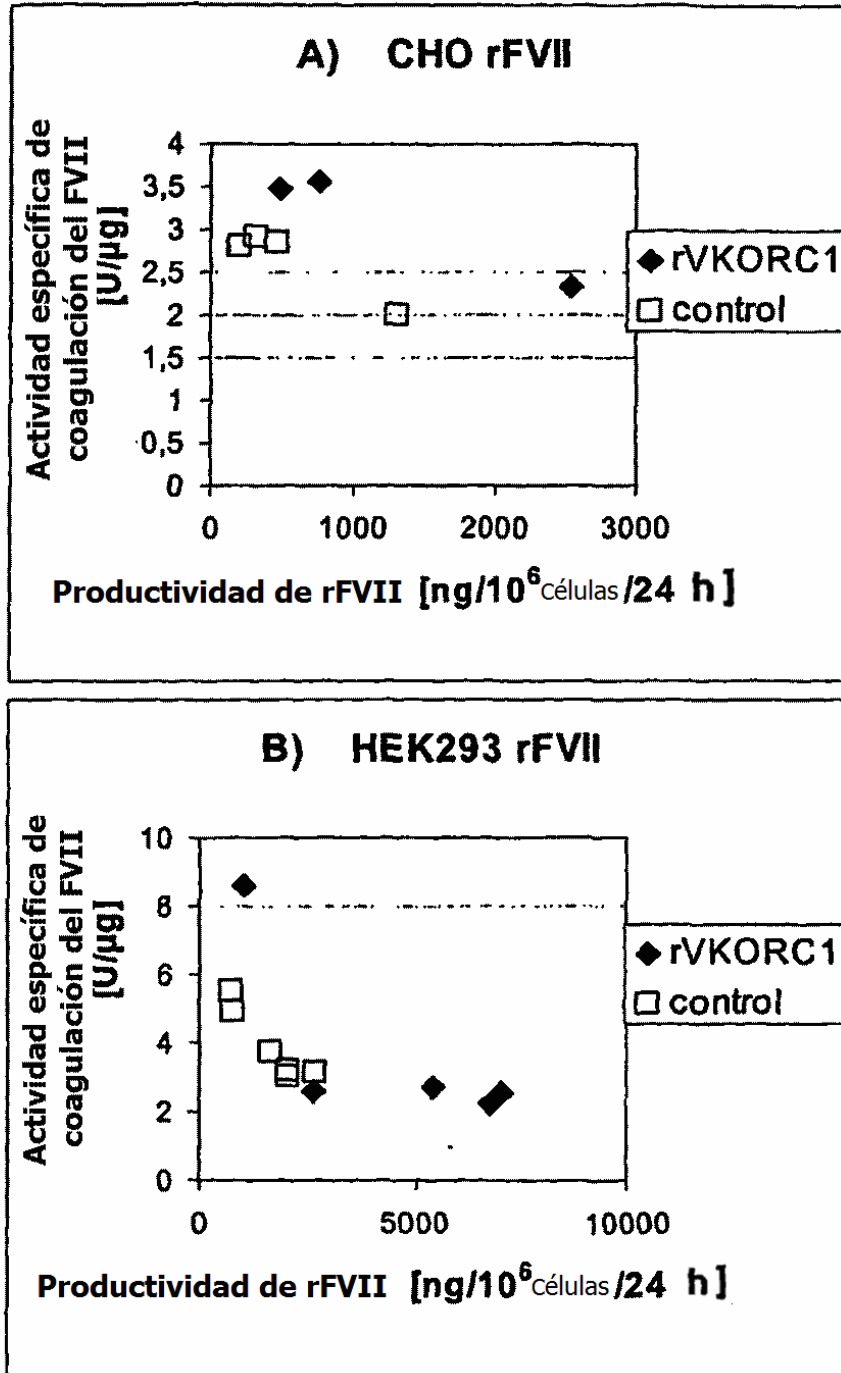


Figura 12