

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 851**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2006 E 06764160 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1904528**

54 Título: **Células de inactivación proteínica de la célula huésped para la producción de proteínas terapéuticas**

30 Prioridad:

13.07.2005 EP 05106401

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**STEENSTRUP, THOMAS, DOCK y
NØRBY, PEDER, LISBY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 397 851 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

Células de inactivación proteínica de la célula huésped para la producción de proteínas terapéuticas

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos para producir composiciones incluyendo proteína dependiente de la vitamina K con un contenido muy bajo o insignificante de contaminantes de proteína y a composiciones derivadas de tales métodos. Tales métodos pueden usarse bien solos o en combinación con otros métodos para reducir el contenido relativo de contaminantes de proteína. La presente invención es particularmente pertinente para la preparación de composiciones de factores de coagulación seleccionados de polipéptidos de trombina (FII/FIIa), polipéptidos de Factor X (FX/FXa), polipéptidos de Factor IX (FIX/FIXa), polipéptidos de Factor VII (FVII/FVIIa) y la proteína C anticoagulante, en particular polipéptidos de Factor VII.

15 Antecedentes de la invención

[0002] En la producción de proteínas recombinantes a partir de cultivos de microorganismos o líneas celulares, el paso de producción final es la recuperación y, opcionalmente, la concentración del producto de interés. Los medios de cultivo en los que las células se han cultivado y que contienen proteínas segregadas, y, en particular, lisatos celulares que contienen proteínas intracelulares de interés también contienen, en mayor o menor medida, otras proteínas producidas por las células, además de otros contaminantes, tales como componentes de medios, ácidos nucleicos y similares. Para obtener un producto proteínico purificado es necesario separar la proteína de interés de otras proteínas y polipéptidos y otras impurezas en el material bruto que contiene la proteína de interés. No obstante, frecuentemente es difícil eliminar contaminantes de proteína que comprenden dominios de la misma naturaleza que el polipéptido de interés.

[0003] Las proteínas dependientes de la vitamina K se distinguen de otras proteínas por compartir una característica común estructural en su parte amino terminal de la molécula. El N-terminal de estas proteínas, también llamado dominio Gla, es rico en el inusual ácido γ -carboxi glutámico de aminoácido que se sintetiza a partir de glutamato en una reacción dependiente de la vitamina K catalizada por la enzima γ -glutamil carboxilasa. Debido a la presencia de aproximadamente 9 a 12 residuos de Gla, el dominio Gla se caracteriza por ser capaz de unir cationes bivalentes tales como Ca^{2+} . Por unión de iones metálicos, estas proteínas sufren cambios conformacionales que se puede medir mediante diferentes técnicas, tales como el dicroísmo circular y la emisión de fluorescencia.

[0004] El descubrimiento de cambios conformacionales inducidos por metal de proteínas que contienen Gla (Nelsestuen et. al., J. Biol. Chem. 1976; 251, 6886-6893) junto con la identificación de anticuerpos policlonales específicos de conformación (Furie et al., J. Biol. Chem. 1978; 253, 8980-8987) abrió el camino a la introducción de cromatografía de inmunoafinidad específica de conformación. Estos anticuerpos pudieron reconocer y enlazar el dominio Gla en presencia de iones de Ca^{2+} pero liberaron la proteína por eliminación de iones de Ca^{2+} utilizando un quelador de Ca^{2+} tal como EDTA o citrato.

[0005] En los 80 se desarrolló la cromatografía de pseudoafinidad específica de conformación haciendo uso de la propiedad única de las proteínas que contienen Gla para sufrir cambios inducidos por metal en la conformación. La cromatografía de pseudoafinidad difiere de la cromatografía de afinidad convencional en que no hay ningún ligando de afinidad inmovilizado implicado y en que ésta se realiza en una matriz convencional cromatográfica (Yan S. B., J. Mol. Recog. 1996; 9, 211-218). La proteína de Gla se puede adsorber a un material de intercambio de anión por eliminación de iones de metales bivalentes. Posteriormente, se lleva a cabo la elución añadiendo Ca^{2+} al tampón de elución.

[0006] En 1986, Bjørn y Thim informaron de la purificación de rFVII en un material de intercambio de aniones aprovechando la propiedad de unión a Ca^{2+} del dominio Gla de FVII (Bjørn S. and Thim L., Research Disclosure, 1986, 26960-26962.). La adsorción se consiguió en un tampón sin Ca^{2+} y la elución de FVII fue posible utilizando un tampón conteniendo Ca^{2+} con fuerza iónica baja y bajo condiciones moderadas. Yan et al. usaron el mismo principio para la purificación de proteína humana C recombinante (Yan S. B. et al., Bio/technology. 1990; 8, 655-661).

[0007] Brown et al. (Brown et al., J. Biol. Chem. 2000; 275, 19795-19802.) proporcionaron anticuerpos monoclonales específicos para residuos de Gla. Estos anticuerpos podían reconocer todas las proteínas Gla evaluadas: Factor VII, Factor IX, Factor II, proteína C, proteína S, GAS-6, proteína Gla de la matriz del hueso, conantokin G. Diferentes anticuerpos específicos conformacionales dirigidos contra una proteína de Gla muestran reactividad en cruce con otras proteínas de Gla (Furie B. and Furie B., J. Biol. Chem. 1979; 254, 9766-9771; Church et al., J. Biol. Chem. 1988; 263, 6259-6267).

[0008] Mientras la presencia del dominio Gla proporciona una ventaja para separación de proteínas que contienen Gla de otras proteínas, los inventores de la presente invención observaron que las propiedades y el comportamiento similares de las proteínas que contienen Gla hace difícil separar unas de las otras.

[0009] Las proteínas con un dominio Gla comprenden las siguientes proteínas: GAS-6, proteína S, Factor II (protombina), Factor X, Factor IX, proteína C, Factor VII, proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico de

transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 4 de ácido gama-carboxiglutámico de transmembrana, proteína Gla del hueso, proteína Gla de la matriz y osteocalcina.

[0010] La necesidad de separar eficazmente una proteína dependiente de la vitamina K de interés, tal como un polipéptido conteniendo dominio Gla de interés, de contaminantes de proteína es una cuestión particularmente pertinente cuando se trata de la purificación de tales polipéptidos producidos en cultivos celulares, debido a que la célula huésped puede producir cantidades significativas de contaminantes de proteína que pueden causar reacciones inmunogénicas indeseables en el uso del polipéptido.

Resumen de la invención

[0011] La presente invención se refiere en un amplio aspecto a la generación de composiciones que incluyen una proteína dependiente de la vitamina K de interés que está desprovista o sustancialmente desprovista de al menos un contaminante de proteína expresado por la célula huésped.

[0012] Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped expresando proteína dependiente de la vitamina K de interés, dicha célula huésped siendo modificada con un constructo polinucleótido para codificar la proteína dependiente de la vitamina K de interés; y donde la célula huésped se modifica para expresar una cantidad sustancialmente inferior de proteína S endógena mediante cualquier método seleccionado de:

- (a) ruptura por inactivación génica del gen que codifica la proteína S endógena;
- (b) transfección con un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un mRNA codificando proteína S;
- (c) transfección con un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc uniéndose a un elemento de ADN del gen que codifica proteína S endógena;
- (d) mutagénesis aleatoria para ruptura del gen que codifica proteína S endógena;

[0013] El término "modificado", como se utiliza en este caso, se refiere a una célula que ha sido creada genéticamente por cualquier técnica o proceso de biología celular o molecular artificial útil en la industria.

[0014] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de una célula huésped según la invención, el método comprendiendo los pasos siguientes en cualquier orden:

- a) transfección de dicha célula con un constructo polinucleótido que codifica una proteína dependiente de la vitamina K de interés; y
- b) modificación de dicha célula para expresar una cantidad sustancialmente inferior de proteína S endógena mediante cualquier método seleccionado de:

- (i) ruptura por inactivación génica del gen que codifica la proteína S endógena;
- (ii) transfección con un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un mRNA que codifica proteína S;
- (iii) transfección con un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc que se une a unos elementos de ADN del gen que codifica la proteína S endógena;
- (iv) mutagénesis aleatoria para ruptura del gen que codifica la proteína S endógena.

[0015] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de una composición que incluye una proteína dependiente de la vitamina K de interés con una cantidad sustancialmente inferior de al menos una proteína siendo la proteína S expresada endógena por dicha célula huésped en ausencia de modificación, dicho método incluye las etapas de:

- (a) producción de una célula huésped expresando una proteína dependiente de la vitamina K de interés, dicha célula huésped siendo modificada para expresar una cantidad sustancialmente inferior de proteína S endógena mediante cualquier método seleccionado de:

- (i) ruptura por inactivación génica del gen que codifica la proteína S endógena;
- (ii) transfección con un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un mRNA que codifica proteína S;
- (iii) transfección con un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc que se une a un elemento de ADN del gen que codifica proteína S endógena;
- (iv) mutagénesis aleatoria para ruptura del gen que codifica la proteína S endógena; y

- (b) cultivo de dicha célula huésped en un medio de crecimiento y cosecha de dicho medio de crecimiento incluyendo dicha proteína dependiente de la vitamina K de interés.

Breve descripción de los dibujos

[0016]

La figura 1 ilustra el vector RansiRNA. El vector está compuesto de dos promotores de polimerasa III que transcriben el molde de siRNA en cada dirección. Las dos transcripciones de RNA (ARN en español) son complementarias y se recuecen para formar la molécula de siRNA final. El vector contiene un gen de resistencia de higromicina que hace posible seleccionar clones de célula estables.

La figura 2 ilustra los pasos del método de manipulación génica dirigida. En el constructo de manipulación génica dirigida de la proteína S de CHO la parte codificadora de exón 1 ha sido cambiada por un gen de resistencia a higromicina o a blasticidina para selección positiva. Además, el gen de TK está insertado junto al exón 2 para selección negativa. Dos sitios cre/lox están flanqueando el gen de resistencia. Después de la recombinación homóloga la población celular puede ser seleccionada utilizando cebadores específicos para la región promotora exterior al constructo y para el gen de resistencia del constructo. Una vez que los alelos se han eliminado para la proteína S de tipo salvaje, las células se pueden modificar por unos plásmidos de expresión que contienen recombinasa Cre. La recombinasa Cre se recombinará en los sitios cre/lox y los genes de resistencia se eliminarán del genoma celular.

La figura 3 ilustra la infrarregulación del gen de la proteína S en las células CHO-K1 utilizando el gen ZNF-PS hecho de manera sintética.

Figura 3a: el gen sintético ZNF-PS infrarregula la transcripción de la proteína S en las células CHO-K1, determinada por ensayo de indicador de luciferasa. La figura muestra la lectura de luciferasa a partir de un indicador que contiene el promotor de proteína S. El vector pRL-CMV (Promega, Madison) se usó como control para eficiencia de transfección. ZNF-PS infrarregula la actividad promotora de la proteína S un 50% en una transfección transitoria.

Figura 3b: el gen sintético ZNF-PS infrarregula la transcripción de la proteína S en células CHO-K1, determinada por PCR en tiempo real en mRNA de proteína S. La figura ilustra una cuantificación mediante PCR en tiempo real del mRNA de la proteína S en CHO-K1 transitoriamente transfectado con ZNF-PS. El vector pEGFP (Clontech, Mountain View) se usó como control para eficiencia de transfección. En este experimento ZNF-PS también infrarregula la proteína S al 50%.

Figura 4: el gen de proteína S se localiza sobre dos cromosomas diferentes de la misma metafase de células CHO-K1. La figura ilustra la localización del gen de proteína S en el genoma CHO-K1. Se llevó a cabo el FISH en cromosomas CHO-K1 usando intrón 1 de proteína como sonda.

Figura 5: dos proteínas de dedo de zinc se fundieron con nucleasas que se enlazan dentro del exon1 del gen de la proteína S de CHO. La figura ilustra la especificidad de enlace de ADN de dos proteínas de dedo de zinc fundidas con nucleasa Fok I. La proteína de dedo de zinc de la izquierda se espera que se enlace a 5'-GTCCTGAGC-3' (cadena superior) y el dedo de zinc de la derecha se enlazará a 5'-GCTGGTATG-3' (cadena superior) ambos elementos de secuencia son albergados por el exón 1 de la proteína S. Los dos dedos de zinc se funden con nucleasas Fok I o Sts I, las nucleasas homodimerizarán y desempeñarán la escisión de las cadenas de ADN.

Figura 6: manipulación génica dirigida por recombinación homóloga mejorada por escisión de nucleasa de dedo de zinc. La figura ilustra el paso de recombinación homóloga mejorada por nucleasas de dedo de zinc. Las nucleasas de dedo de zinc enlazarán su sitios de enlace específicos dentro del exón 1 de la proteína S y disociarán las cadenas de ADN. El vector de manipulación génica dirigida transfectado junto con las nucleasas contiene un fragmento grande idéntico al gen de la proteína S, a cada lado del gen EGFP. La recombinación tiene lugar entre el gen de la proteína S y el vector de reconocimiento. Células recombinantes se pueden clasificar mediante expresión de EGFP.

Descripción detallada de la invención

[0017] La presente invención se refiere a una célula huésped para la producción de proteínas recombinantes, donde esta célula huésped se modifica para expresar una cantidad sustancialmente inferior de un contaminante de proteína S expresado endógeno por la célula huésped en ausencia de modificación.

[0018] Debido a la estrecha relación entre una proteína dependiente de la vitamina K de interés y un contaminante de proteína, que es una segunda proteína dependiente de la vitamina K, tal contaminante de proteína puede ser muy difícil de eliminar por métodos de purificación.

[0019] En una forma de realización de la invención, la proteína dependiente de la vitamina K de interés se selecciona del grupo que consiste en: proteína S, Factor II (protombina), Factor X, Factor IX, proteína C, Factor VII, proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína Gla del hueso, proteína Gla de la matriz y osteocalcina. Las proteínas dependientes de la vitamina K puede estar bien en una forma activada bien en una forma no activada, tal como Factor II y Factor IIa y Factor X y Factor Xa.

- [0020] En una forma de realización de la invención, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un factor de coagulación, tal como por ejemplo polipéptidos de FVII o FVIIa. En una forma de realización, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es FVIIa humano de tipo salvaje.
- 5 [0021] En una forma de realización, los contaminantes de proteína son proteína S de hámster.
- [0022] En una forma de realización de la invención, la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células 293 (HEK293), células BKH, células HKB11, células SP2/0 y células NS0.
- 10 [0023] La presente invención además se refiere a una célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés, esta célula huésped comprende un constructo de siRNA apuntando a un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped.
- 15 [0024] El término "siRNA", como se utiliza en este caso, se refiere a ARN pequeño de interferencia, a veces llamado ARN corto de interferencia o ARN de silenciamiento, conocido en la técnica de biología molecular.
- [0025] En una forma de realización, la célula huésped se ha modificado por transfección con al menos un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un mRNA que codifica un contaminante de proteína S expresado endógeno por la célula huésped.
- 20 [0026] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés comprende un constructo de siRNA apuntando a un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped, donde el contaminante de proteína es una segunda proteína dependiente de la vitamina K.
- 25 [0027] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés comprende un constructo de siRNA apuntando a un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped.
- [0028] La presente invención también se refiere a una célula que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés comprendiendo un gen interrumpido para un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped.
- 30 [0029] En una forma de realización la célula huésped ha sido modificada mediante ruptura por inactivación génica de al menos un gen que codifica endógeno un contaminante de proteína S expresado endógeno por la célula huésped. En una forma de realización, el gen endógeno que codifica la proteína S se ha interrumpido por inactivación génica del exón 1.
- 35 [0030] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés comprende un gen interrumpido para un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped.
- [0031] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés comprende un gen interrumpido para la proteína S, donde el gen de la proteína S se interrumpe por omisión del exón 1.
- 40 [0032] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés ha sido modificada por transfección con al menos un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc enlazando a un elemento de ADN del gen que codifica el contaminante de proteína S expresado endógeno por la célula huésped.
- 45 [0033] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés ha sido modificada por transfección con al menos una proteína de fusión de nucleasa para escisión específica de sitio de las cadenas de ADN que codifican el contaminante de proteína expresado endógeno por la célula huésped.
- 50 [0034] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés incluye un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc enlazando a la secuencia de ADN que codifica proteína S endógena.
- 55 [0035] En una forma de realización de la invención, la proteína de dedo de zinc se enlaza a un elemento de ADN que comprende la secuencia de SEQ ID n° 35.
- [0036] En una forma de realización de la invención, la proteína de dedo de zinc se enlaza al elemento de ADN GGAGAGGAGGGGGG.
- 60 [0037] En una forma de realización, la célula huésped que expresa una proteína dependiente de la vitamina K de interés se modifica por mutagénesis aleatoria para ruptura de al menos un gen endógeno que codifica un contaminante de proteína S expresado endógeno por la célula huésped.

[0038] La presente invención también se refiere a un método para la reducción del contenido de un contaminante de proteína S en una composición incluyendo una proteína dependiente de la vitamina K de interés, donde se inhibe un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped.

5 [0039] En una forma de realización, el método para la reducción del contenido de contaminante de proteína S en una composición incluyendo una proteína dependiente de la vitamina K de interés, donde un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped es inhibido, es un método que comprende el uso de siRNA.

10 [0040] En una forma de realización, el método para la reducción del contenido de un contaminante de proteína S en una composición que incluye una proteína dependiente de la vitamina K de interés, donde un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped es inhibido, es un método que comprende el uso de mutagénesis aleatoria.

15 [0041] En una forma de realización, el método para la reducción del contenido de un contaminante de proteína S en una composición que incluye una proteína dependiente de la vitamina K de interés, donde un contaminante de proteína S expresado por la célula huésped es inhibido, es un método que comprende el uso de inactivación dirigida.

20 [0042] La palabra "polipéptidos" se refiere a cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje, así como sus respectivas "variantes", "polipéptidos relacionados", "derivados" y "conjugados" de los mismos.

25 [0043] En particular, como se utiliza en este caso, los términos "polipéptido de Factor VII" o "polipéptido de FVII" se refieren a cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos 1-406 de Factor VIIa humano de tipo salvaje (es decir, un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente estadounidense n°. 4 784 950), variantes de los mismos, al igual que polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados de Factor VII y conjugados de Factor VII. Esto incluye variantes de FVII, polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados de Factor VII y conjugados de Factor VII que muestren sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica con respecto al Factor VIIa humano de tipo salvaje.

30 [0044] El término "Factor VII" pretende abarcar polipéptidos de Factor VII en su forma no dividida (zimógeno), así como aquellos que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas bioactivas respectivas, que se pueden designar Factor VIIa. Típicamente, el Factor VII se divide entre los residuos 152 y 153 para producir Factor VIIa.

35 [0045] Las variantes del Factor VII pueden mostrar propiedades diferentes con respecto al Factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión de fosfolípidos, actividad específica alterada y similares.

40 [0046] El "Factor VII" o "Factor VIIa" de la definición anterior también incluye variaciones naturales alélicas que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de glicosilación u otras modificaciones de postraslación pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y de la naturaleza del entorno celular huésped.

[0047] Como se utiliza en este caso, el "FVIIa humano de tipo salvaje" es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente estadounidense n°. 4 784 950.

45 [0048] El término "derivado de Factor VII" como se utiliza en este caso, se usa para designar un polipéptido de FVII que muestra sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica con respecto al Factor VII de tipo salvaje, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido progenitor se han modificado genética y/o química y/o enzimáticamente, por ejemplo por alquilación, glicosilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similares. Esto incluye Factor VIIa humano pegilado, Factor VIIa humano de cisteína pegilado y variantes de los mismos, aunque no se limita a éstos. Ejemplos no limitativos de derivados de Factor VII incluyen derivados de FVII glicopegilados como se describen en WO 03/31464 y las solicitudes de patente estadounidenses US 20040043446, US 20040063911, US 50 20040142856, US 20040137557, y US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); conjugados de FVII como se describen en WO 01/04287, la solicitud de patente estadounidense US 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764 y la solicitud de patente estadounidense US 20030211094 (University of Minnesota).

55 [0049] El término "actividad biológica mejorada" se refiere a polipéptidos de FVII con i) sustancialmente la misma o aumentada actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante o ii) a polipéptidos de FVII con sustancialmente la misma o aumentada actividad de unión de TF en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante o iii) a polipéptidos de FVII con sustancialmente la misma o aumentada vida media en plasma sanguíneo en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. El término "Factor VIIa humano pegilado" significa Factor VIIa humano, con una molécula de PEG conjugada con un polipéptido de Factor VIIa humano. Debe entenderse que la molécula de PEG se puede unir a cualquier parte del polipéptido de Factor VIIa incluyendo cualquier residuo de aminoácido o fracción de carbohidrato del polipéptido de Factor VIIa. El término "Factor VIIa humano de cisteína pegilado" significa un Factor VIIa con una molécula de PEG conjugada con un grupo de sulfhidrilo de una cisteína introducida en el Factor VIIa humano.

65

[0050] Ejemplos no limitativos de variantes del Factor VII que tienen sustancialmente la misma o aumentada actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que muestran estabilidad proteolítica aumentada como las descritas en la patente de EEUU n.º. 5 580 560; Factor VIIa que se ha dividido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas de Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de FVII como las descritas en el PCT/DK02/00189 (correspondiente a WO 02/077218); y variantes de FVII que muestran estabilidad proteolítica aumentada como las descritas en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII con un dominio Gla modificado y que muestran una unión de membrana mejorada como las descritas en WO 99/20767, las patentes estadounidenses US 6017882 y US 6747003, la solicitud de patente estadounidense US 20030100506 (University of Minnesota) y WO 00/66753, la solicitudes de patente estadounidenses US 20010018414, US 2004220106, y US 200131005, las patentes US 6762286 y US 6693075 (University of Minnesota); y variantes de FVII como las descritas en WO 01/58935, patente estadounidense US 6806063, la solicitud de patente US 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS), WO 04/029091 (Maxygen ApS), WO 04/083361 (Maxygen ApS), y WO 04/111242 (Maxygen ApS), así como en WO 04/108763 (Canadian Blood Services).

[0051] Ejemplos no limitativos de variantes de FVII con actividad biológica aumentada comparadas con el FVIIa de tipo salvaje incluyen variantes de FVII como las descritas en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/027147, WO 04/029090, WO 05/075635, y la solicitud de patente europea con número de solicitud 05108713.8 (Novo Nordisk A/S), WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con actividad mejorada como las descritas en JP 2001061479 (Chemo-Sero- Therapeutic Res Inst.).

[0052] Ejemplos de variantes de Factor VII incluyen, sin limitación, P10Q-FVII, K32E-FVII, P10Q/K32E-FVII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII,

5 F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII,
F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,
F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII,
F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,
F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,
F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,
10 F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII,
F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
15 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,
F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
20 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,
F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,
25 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,
F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
30 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-FactorVII, R152E-FactorVII, S344A-
FactorVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII,
K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de
aminoácidos desde 233Thr hasta 240Asn; FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de
aminoácidos desde 304Arg hasta 329Cys; y FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de
35 aminoácidos desde 153Ile hasta 223Arg.

[0053] Así, las variantes de sustitución de un polipéptido del Factor VII incluyen, sin limitación, sustituciones en
posiciones P10; K32; L305; M306; D309; L305; L305; F374; V158; M298; V158; E296; K337; M298; M298; S336; S314;
K316; K316; F374; S52; S60; R152; S344; T106; K143; N145; V253; R290; A292; G291; R315; V317, y sustituciones,
40 adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde T233 hasta N240 o desde R304 hasta C329 o desde I153
hasta R223, o combinaciones de las mismas, en particular variantes tales como P10Q, K32E, L305V, M306D, D309S,
L305I, L305T, F374P, V158T, M298Q, V158D, E296V, K337A, M298Q, M298K, S336G, S314E, K316H, K316Q, F374Y,
S52A, S60A, R152E, S344A, T106N, K143N, N145T, V253N, R290N, A292T, G291N, R315N, V317T y sustituciones,
adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde T233 hasta N240, o desde R304 hasta C329, o desde
45 I153 hasta R223 o combinaciones de las mismas.

[0054] "Una proteína dependiente de la vitamina K de interés", como se utiliza en este caso, se refiere al único producto
de proteína dependiente de la vitamina K producido por las células huésped, que es pertinente obtener en la forma más
pura. En una forma de realización, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es el producto proteínico
50 producido por la célula huésped en la cantidad máxima. En una forma de realización, la proteína dependiente de la
vitamina K de interés se transfecta en la célula huésped.

[0055] "Composición", como se utiliza en este caso, significa cualquier composición, tal como una composición líquida,
tal como una composición de líquido acuoso.

[0056] La proteína dependiente de la vitamina K de interés se produce más típicamente bajo condiciones de cultivo
celular, es decir la proteína dependiente de la vitamina K de interés se obtiene bien directamente como un constituyente
de un sobrenadante de cultivo celular, bien de un sobrenadante de cultivo celular después de uno o más pasos de
proceso de purificación posteriores.

[0057] Típicamente, el contenido total de contaminantes de proteína de la composición no purificada es de al menos 200
ppm, tal como al menos 300 ppm, por ejemplo al menos 400 ppm o al menos 500 ppm. También típicamente, el
contenido total de contaminantes de proteína S de la composición no purificada es al menos 200 ppm, tal como al
menos 300 ppm, por ejemplo al menos 400 ppm o al menos 500 ppm.

[0058] Los términos "contaminante de proteína" y "contaminantes de proteína", como se utilizan en este caso, significan constituyentes de proteína o de polipéptido producidos endógenamente por la célula huésped y constituyendo una impureza en relación con la proteína dependiente de la vitamina K de interés. Así, la proteína dependiente de la vitamina K de interés obviamente no se tiene que contar como un contaminante de proteína.

[0059] "Desprovisto o sustancialmente desprovisto", como se utiliza en este caso, se refiere a una composición donde el contenido total de un contaminante de proteína de la composición está como mucho en 500 ppm, tal como, como mucho 100 ppm, tal como, como mucho 10 ppm, por ejemplo como mucho 1 ppm o como mucho 0,1 ppm. También típicamente, el contenido total de contaminantes de proteína S de la composición está como mucho en 500 ppm, tal como, como mucho 100 ppm, tal como, como mucho 10 ppm, por ejemplo como mucho 1 ppm o como mucho 0,1 ppm.

[0060] La frase "expresa una cantidad sustancialmente inferior de al menos un contaminante de proteína", como se utiliza en este caso, se refiere al nivel de expresión de un contaminante de proteína endógeno, que se reduce al menos 30%, tal como al menos 40%, tal como al menos 50%, tal como al menos 60%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 99 %.

[0061] Una clase particularmente pertinente de contaminante de proteína son las proteínas muy similares a la proteína dependiente de la vitamina K de interés, tal como la proteína S.

[0062] Como un ejemplo no limitativo, la proteína S se ve a veces como una impureza en la producción de FVIIa recombinante en células mamíferas. La proteína S es como el FVII una glicoproteína de plasma dependiente de la vitamina K con un dominio de tipo EGF y un dominio gamma-carboxi-glutamato (GLA). Debido a la similitud estructural entre el FVII(a) y la proteína S, es difícil recuperar FVII mediante métodos cromatográficos *supra* sin contaminación con proteína S. Por lo tanto, sería deseable evitar la expresión de proteína S por la célula huésped. Esto se puede conseguir apuntando al mRNA o al genoma.

[0063] La expresión estable del ARN pequeño de interferencia, siRNA, es una nueva tecnología que permite la reducción del mRNA objetivo y así suprimir la expresión del gen objetivo en células mamíferas (T. R. Brummelkamp, R. Bernards, and R. Agami. Science 296(5567): 550-553, 2002 & M. Mivaishi and K Taira. Nat Biotechnol 20(5):497-200, 2002.). Se han generado varios siRNA individuales en una estrategia similar a las descritas en las referencias. Algunos de estos siRNA han demostrado ser útiles (ejemplo 2).

[0064] El uso de mutagénesis aleatoria para introducir cambios genómicos en las células huésped, algunos de los cuales pueden evitar la generación de mRNA en la célula huésped, se puede aprovechar también. Esto se puede conseguir mediante el tratamiento de una población de células CHO con un mutágeno, tal como por ejemplo sulfonato de metano de etilo, EMS (por sus siglas en inglés), que induce mutaciones puntuales en las células. Las células supervivientes pueden mostrar fenotipos alterados debido a estas mutaciones. Las células se pueden sembrar en un formato de selección (p. ej. placas de 96-pocillos) para permitir el aislamiento de poblaciones de células clonales. Después de un periodo de crecimiento, el medio puede cosecharse de los pocillos y ser evaluado para contenido de proteína S. Los clones sin expresión de proteína S se pueden aislar y utilizar para la producción de Factor VII libre de proteína S.

[0065] La ruptura del genoma se puede obtener mediante la técnica de manipulación génica dirigida o inactivación génica (ejemplo 3). La generación de células de inactivación es una técnica bien descrita para erradicar la expresión de proteínas endógenas, y una célula inactivación de CHO se describió recientemente en Yamane-Ohnukiet al. Biotechnol. Bioeng. 87 (5):614-622, 2004.

[0066] Se generó plásmido de inactivación de proteína S genómica y se modificó en células CHO. Por recombinación homóloga se interrumpió el gen de la proteína S en las células CHO. Este procedimiento se repitió hasta que todos los alelos del gen de la proteína S se eliminaron de forma estable (ejemplo 3).

[0067] El factor de transcripción que diseña la infrarregulación transcripcional es una vía alternativa para modificar la expresión del gen (ejemplo 4).

[0068] Para que todos estos métodos se apliquen es necesario conocer la secuencia del gen de la proteína contaminante. La secuencia de la proteína S de ovario de hámster chino, CHO (por sus siglas en inglés), no está disponible públicamente y se realizó una clonación del ADNc de la proteína S de CHO como se describe en el ejemplo 1 y se divulgó como SEQ ID nº 1. La secuencia de codificación de la proteína S de CHO y la secuencia de aminoácidos de la proteína S de CHO se divulgan como SEQ ID nº 2 y 3, respectivamente.

[0069] La presente invención se ilustra a continuación por los siguientes ejemplos que, no obstante, no deben ser interpretados como limitación del alcance de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos pueden, tanto separadamente como en cualquier combinación de los mismos, ser material para asimilar la invención en diversas formas de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: clonación del ADNc de la proteína S de CHO.

[0070] La secuencia de ADNc de la proteína S de ovario de hámster chino, CHO, no se conocía a partir de una base de datos de nucleótidos o de proteínas, pero se preveía que tendría una alta identidad con la secuencia de nucleótidos de la proteína S de otros roedores.

[0071] Los fragmentos de PCR de la proteína S de CHO se generaron a partir de ADNc de CHO utilizando cebadores diseñados a partir del alineamiento entre secuencias genómicas o secuencias de ADNc de proteína S de rata y de ratón. Los fragmentos de ADNc fueron secuenciados y ensamblados para formar una secuencia de codificación en toda su longitud para el gen de proteína S de CHO. El ADNc de proteína S de CHO en toda su longitud fue clonado por PCR utilizando los cebadores "sentido de ProtS de CHO" y "antisentido de ProtS de CHO" y el ADNc derivado de CHO-K1 como molde.

[0072] La secuencia de aminoácidos de la proteína S de CHO predicha tiene un 90,5% de identidad con la proteína S de ratón y un 90,7% de identidad con la proteína S de rata.

Sentido de ProtS de CHO (SEQ ID n° 1):
5'-GCCCAGGCTCGCAGCTCCTCTGG-3'

Antisentido de ProtS de CHO (SEQ ID n° 2):
5'-CAGGTGACACCTGCCAGCTGGTG-3'

Secuencia de ADNc de la proteína S de CHO (SEQ ID n° 3):

```

gccaggctcgagctcctctggcgaggcgccgctcggtcccgctgcgagccgtgatcccggcagcctgctcagcaa
tgagggtcctgagcgcgctgctggtatgctagccctggctgctgagcctcgagacaaactttttgtcaa
aagaaatgctcgcagctcctggtgaggagcgccgcgcaaatccttgcctgaagaaactaaaaagggaatcttgaaa
gagaatgcacgaagagctcgcataaagagggaagccagggaggtctttgaaaaaatcccgaaacggattaattttatcc
aaaataatttgggtgtctggcagcttccgtgctgacctgttcagtgctgcgcgcagctctgttaatgcttaacccgcacctcagga
gctgtgtcaatgccatcccgacaaatgtgatacctatgccatgaagatgggtatctgagctgcaaagatggccaagct
gctttcacatgcacctgcacaaaccaggatggcaaggggacaaatgccagtttgatgtaaataatgaaagatcccttaaatgta
aatgggggctgcagccagatttgtgacaacactcctggaagttaacctgctcctgcagaagtggctttgctatgctttcaaca
aaaaagactgcacagatgtgatgaatgctctatgaagccagtggttggctcagctgtgtgcaagaaactccaggagaa
ctatgagtgtaatgtcctgacggctacagatatgatccctcatcgaagcttgcacagatgtggacgaatgctctgagaacat
gtgtgctcaattgtgtgtcaattacctggaggctactctgttactgtgatggaaagaaaggattcaagcttgcccaagatcag
aagagttgtgagggtattccagtgctcctccctgaaccttgacaaaaattatgaattattgtaacttggtgagcagttgtagg
agttgtcttatactgaaatttcgtttgccgaaattaccagattttcagctgaatttgatttcggacatatgattcagagggcatc
atcctgtatgcagaatctcttgatcactcaaattggctcctgattgcacttcgtgatggaaaaattgaagttcagtttaagaatga
gttttcaacccaaatcacaaaccggaggcaatgttattaacaatggtaaattggaacatgggtatccgtggaagaattagacgaca
gtgttagcattaaaatagctaaagaagctgtgatgaatataaataaatttgggagcctctttaaacctacagatggatttctgga
caccaaaatatactttgcaggattacctcggtagtggaagtgcaactcattaaaccgattaacctcgtctggatggatgtata
cgaggctggaaacttgatgaacaaggagctttagggtgcaagggaattattcaaggaaaaacaaaataagcattgcttctcat

```

gggtggagaagggctccta ctaccctggttctggaattgctcgggttcagcatagattaca ataatgtaaccaatgcagagggctg
gcaaaataaatgtgacctgaatatctgcatccactggcactggaattatgcttgacctggttctggagacaaagtgcctttg
cctgtccttggtgggtccagctctgaaaattctcaggatattgtggtattgttgaaaattcagtggtggtcgaatggagggcc
ataactctgtgttctgaccagcaatcccaactgaaatgtaatgttaacagacatggcctagagctatggagcccactgaagaa
agatgtcatctactctaaagatatcaaggacaaactagcagcttggaacaaagcaatgaaaggaaacgtggccacttatctgg
gtggcattccagatctttccttcagtgccacgcccagtgaaatgccttctacagtggtgcatggaagtgaacatcaacgggggtgc
agttggatctggatgaagccatttctaatacataatgacatcagagctcactcatgtccttcagttaagaaaatccagaagaacg
tctaattgtctgtttctgtgcttataatgccccttctgtgtaattatgtcaccgcccctatcaccagctggcaggtgtcactgtgaa
gtgcaatgtttgaaatgagtgtggtacttgccttcagatttttgtataataaacacgttttttttttttaagcttttctctattg
ctgtctagaaattaataa

Secuencia codificando proteína S de CHO (SEQ ID nº 4):

atgagggctctgagcgcgcgtgtcggtactgctggtatgcttagccctggtgctgcccagcctcggagacaaactttttgtca
aaagaacatgcctcgcaagtctggtgaggaagcgcgcgcaataccttgctgagaaactasaaagggcaatcttgaa
agagaatgcacgaagagctctgcaataaagaggaagccagggaggtccttgaaaaaatcccgaaacggattattttatc
caaaaatatttggtgtctggtgcatgttcgtgctggcctgttcagtgctgcgcgcagctctgtaatgcttaccccgacctcagg
agctgtgtcaatgccatccagaccaatgtgatcctatgccatgcaatgaagatgggtatctgagctgcaaaagtggccaagc
tgctttcacatgcacctgcaaacaggatggcgaaggggacaaatgccagtttgatgtaaatgaatgtaagatcccttaaagt
aatgggggctgcagccagattgtgacacactcctggaagtaccactgctcctgcagaagtggccttgctatgcttcaaac
aaaaaagactgcaaaagatgtggatgaatgctctatgaagccagtggttggtgctcagctgtgtgcaagaacactccaggag
actatgagtgatgaatgtcctgacggctacagatatgatccctcatcgaagtcttgcaagatgtggacgaatgctctgagaaca
tgtgtgctcaattgtgtgcaattacccctggaggctactctgttactgtgatggaaagaaaggattcaagcttcccaagatca
gaagagttgtgagggtaattcagtgctcctccctgaaccttgacaaaaattatgaattatgtacttggtgctgagcagttgtag
gagttgtcttatatctgaaatttcgtttgccagaaattaccagatttcagctgaatttgatttcggacatatgattcagagggca
tcactctgtatgcagaatctcttgatcactcaaatggcctcctgattgcacttcgtgatggaaaaattgaagttcagtttaagaat
gagttttcaacccaaatcacaacggagggaatgttattaacaatggtaaatggaaacatggatccgtggaagaattagacga
cagtggttagcattaaaaatagctaaagaagctgtgatgaatataataaatttgaggagcctcttaaacctacagatggatttctg
gacacccaaaatatactttgcaggattacctcgggtagtggaaagtgcactcattaaacggattaaacctcgtctggatggatgt
atacggaggctggaacttgatgaacaaaggagccttaggtgcaaggaaattattcaaggaaaaacaaataagcattgcttcc
tcatggtgagaagggctcctactaccctggttctggaattgctcgggttcagcatagattacaataatgtaaccaatgcagagg
gctggcaaataaatgtgacctgaatatctgcatccactggcactggaattatgcttgacctggttctggagacaaagtgcctc
tttgcttgctccttggtgggtccagctctgaaaattctcaggatattgtggtattgttgaaaattcagtggtggtcgaatggag
gccataactctgtgttctgaccagcaatcccaactgaaatgtaatgttaacagacatggcctagagctatggagcccactgaag
aaagatgtcatctactctaaagatatcaaggacaaactagcagcttggaacaaagcaatgaaaggaaacgtggccacttatct
gggtggcattccagatctttccttcagtgccacgcccagtgaaatgccttctacagtggtgcatggaagtgaacatcaacgggggt
gcagttggatctggatgaagccatttctaatacataatgacatcagagctcactcatgtccttcagttaagaaaaatccagaagaa
cgtctaa

5

Secuencia de aminoácidos de proteína S de CHO (SEQ ID nº 5):

mrvisarcrillvclalvlpasetnflskehasqvlvrkrrantileetkkgnlerecieelcnkeearevfennpetdyfypkylgcl
gmfraglfsaarqsvnaypdlrscvnaipdqcdpmpcndegylsckdggaaftclckpgwgqdkcqdvdneckdplnvng
gcsqicdntpgsyhcsrsgfamlsnkkdckdvdecsmkpsvcgsavckntpgdyecpcdgyrydpssksckdvdec
enmcaqlcvnyppggyscycdgkkgfklaqdksccegipvcplnldknyellylaeqfvgvvylylklrlpaitrfsaefdrtyds
egillyaesldhsnwllialrdgkievqfknefstqlttggvinnngkwnmvsveelddsvsikiakeavmnlnkfgsifkptdgf
ldtkiyfagiprvvesalikpinprldgclrgwnlmkqgalgakeiliqgkqnkhcfmvekgssyypgsglarfsldynnvtnaeg
wqinvtnirpstgtgimlalvsgdkvpfalslvgsessensqdlvvfvensvvarmealticsdqqsqikcnvnrhglelwsplik
kdviyskdiqqqlavidkamkgnavatylggldlfsatpvnafysgcmevningvqldideaiskhndlrahscpsvkkklqk
nv

Ejemplo 2: degradación del mRNA de la proteína S de CHO por el uso ARN pequeño de interferencia.

- 5 [0073] El mRNA de proteína S en las células de ovario de hámster chino (CHO) se puede degradar por la introducción de ARN pequeño de interferencia, siRNA, en las células. El siRNA es una molécula bicatenaria corta que se puede separar dentro de la célula y la parte antisentido de la molécula puede hibridar a un mRNA complementario e inducir escisión de este mRNA mediante un proceso en el que la nucleasa Dicer desempeña un papel clave. El efecto del siRNA se describe en Elbashir-SM et al., Nature 411 (2001) 494-498. El siRNA se puede sintetizar como ARN
- 10 monocatenario y posteriormente se puede anillar para formar la molécula de siRNA bicatenaria. La molécula de siRNA puede posteriormente transfectarse transitoriamente en células y ejercer su función. Alternativamente, el siRNA se puede expresar como una molécula de horquilla bajo regulación de un promotor de polimerasa III como se describe en Brummelkamp TR; Bernards R; Agami R, Science 296 (2002) 550-553.
- 15 [0074] Un vector que permite la transcripción de cada una de las dos cadenas complementarias por promotores individuales fue desarrollado en nuestro laboratorio. El vector se llama RansiRNA porque el ADN aleatorio se puede insertar en éste y ambas cadenas del inserto se pueden transcribir. El vector RansiRNA contiene el promotor de polimerasa III H1 humano y el promotor de polimerasa III U6 de ratón. Los dos promotores apuntan hacia el molde de siRNA desde cada dirección, transcribiendo la cadena antisentido y con sentido de la molécula de siRNA, respectivamente. El vector también alberga el gen de resistencia al fármaco de higromicina. El vector de RansiRNA es
- 20 similar, pero no idéntico, al vector pHippy descrito por Kaykas & Moon (Kaykas-A & Moon-RT, BMC Cell Biology Vol. 5 (1) pp. 16 (2004).
- 25 [0075] Diferentes secuencias de siRNA objetivo se seleccionaron a partir de la secuencia codificante de la proteína S de CHO, sólo fueron elegidos los objetivos conteniendo la secuencia AGN17 CT (SEQ ID n° 6). Cada secuencia objetivo se adquiere como dos oligonucleótidos de ADN complementarios extendidos con 5' de A hasta el objetivo y 3' de T hasta el objetivo que sirven como señal de terminación cuando se transcribe en dirección antisentido y con sentido. Los oligonucleótidos también albergan un 5'-saliente de cuatro pares de bases que es compatible con el sitio de restricción Bgl II (GATC). Los oligonucleótidos anillados se clonan en el sitio BgIII del vector RansiRNA-higro.
- 30 [0076] Los constructos de siRNA específicos se modificaron de manera estable en una línea celular de CHO K1 expresando un análogo de FVII humano. Las células se colocaron en placas de 6 pocillos a densidad de 2×10^5 c/pocillo en el medio completo (medio DMEM que contiene 10% FBS, aminoácidos no esenciales y vitamina K). Después de dos días, las células se modificaron al 90% de confluencia. Se llevó a cabo la transfección utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Después de 48 horas, las células se transfirieron al medio de selección, que estaba compuesto del medio completo suplementado adicionalmente con 300 ug/ml de higromicina. Después de la selección durante 14 días, las células se clonaron por dilución limitante. Después de que crecieran los clones, el FBS conteniendo el medio completo se cambió por medio libre de suero (PF CHO
- 35 suplementado con vitamina K, Hyclone) para evitar la detección de la proteína S bovina en el siguiente ELISA. El sobrenadante de aproximadamente 100 clones de cada constructo de siRNA fue seleccionado por ELISA de proteína S utilizando proteína S humana como estándar. El mismo sobrenadante fue también seleccionado mediante un ELISA de FVII humano. Los clones que tuvieron la menor expresión de proteína S y que no habían perdido la expresión de FVII se caracterizaron ulteriormente. Los clones que infrarregularon la expresión de la proteína S al nivel de sólo 10 % del nivel de expresión mostrado por la línea celular expresando FVII de K1 de CHO fueron aislados.
- 40
- 45 Secuencias objetivo de siRNA
- [0077]
- 50 #821 objetivo de siRNA1 (SEQ ID n° 7):

5'-agtgtgaatgtcctgacggct-3'

#821 oligonucleótidos superiores de siRNA1 (SEQ ID nº 8):

5 5'-gatctaaaaaagtgtgaatgtcctgacggcttttta-3'

#821 oligonucleótidos inferiores de siRNA1 (SEQ ID nº 9):

10 5'-gatctaaaaaagccgtcaggacattcacacttttta-3'

#822 objetivo de siRNA2 (SEQ ID nº 10):

15 5'-agctgcaaagatggccaagct-3'

#822 oligonucleótidos superiores de siRNA2 (SEQ ID nº 11):

5'-gatctaaaaaagctgcaaagatggccaagcttttta-3'

20 #822 oligonucleótidos inferiores de siRNA2 (SEQ ID nº 12):

5'-gatctaaaaaagcttgccatctttgcagcttttta-3'

25 #835 objetivo de siRNA4 (SEQ ID nº 13):

5'-agaacatgcctcgcaagtcct-3'

#835 oligonucleótidos superiores de siRNA4 (SEQ ID nº 14):

30 5'-gatctaaaaaagaacatgcctcgcaagtccttttta-3'

#835 oligonucleótidos inferiores de siRNA4 (SEQ ID nº 15):

35 5'-gatctaaaaaaggacttgcgaggcatgttcttttta-3'

#836 objetivo de siRNA5 (SEQ ID nº 16):

5'-agaaactaaaaagggaatct-3'

40 #836 oligonucleótidos superiores de siRNA5 (SEQ ID nº 17):

5'-gatctaaaaaagaaactaaaaagggaatcttttta-3'

45 #836 oligonucleótidos inferiores de siRNA5 (SEQ ID nº 18):

5'-gatctaaaaaagattgcccttttagtttcttttta-3'

#837 objetivo de siRNA6 (SEQ ID nº 19):

50 5'-agccagattgtgacaacact-3'

#837 oligonucleótidos superiores de siRNA6 (SEQ ID nº 20):

55 5'-gatctaaaaaagccagattgtgacaacacttttta-3'

#837 oligonucleótidos inferiores de siRNA6 (SEQ ID nº 21):

5'-gatctaaaaaagtgtgtcacaatctggcttttta-3'

60 **Ejemplo 3: manipulación génica dirigida de proteína S de CHO.**

[0078] Una forma definitiva de anular la expresión proteínica de la proteína S es disgregar el gen. La técnica de "la manipulación génica dirigida" o "la inactivación génica" en ratones se conoce desde hace muchos años. La manipulación génica dirigida en células cultivadas también está bien establecida, y un ejemplo de una célula de

inactivación de CHO se describió recientemente en Yamane-Ohnukiet et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(5): 614-622, 2004.

[0079] Predijimos la estructura de exón del gen de la proteína S de CHO por un alineamiento del ADNc de la proteína S de CHO con el gen humano. Se usaron cebadores diseñados para enlazar en el exón 1 y exón 2 de la proteína S de CHO en una reacción en cadena de polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés), el molde fue ADN genómico de CHO. El producto de 4,4 kb amplificado fue secuenciado. Se usaron cebadores enlazando con el exón 2 y el exón 3 para amplificar por PCR el intrón 2. Un fragmento amplificado de 3,5 kb conteniendo el intrón 2 fue clonado y secuenciado.

[0080] Las regiones aguas arriba de exón 1 de ratón y proteína S de rata fueron alineadas y se usaron extensiones de secuencia con identidad alta para diseñar cebadores oligonucleótidos para su uso en el PCR. Se clonó y secuenció una 1650 pb 5'UT/banda promotora. El constructo de manipulación génica dirigida combinará "1,6 kb 5' UT /fragmento promotor", "gen Plox de resistencia a Plox-PGK-higromicina", "intrón 1", "exón 2" y "PGK-TK". Este constructo está omitiendo la secuencia codificante del exón 1 en la proteína S de CHO, codificando los aminoácidos MRVLSVRCRLLLVCLALVLPASETN (SEQ ID nº 22). Un segundo constructo conteniendo el gen de resistencia a fármaco de blasticidina se puede hacer de manera similar.

[0081] El constructo de manipulación génica dirigida de "higromicina" puede someterse a electroporación en células CHO y células colocadas en placas. Los días siguientes las células son expuestas a 600 microg/ml de higromicina y 1 micromolar de ganciclovir. Los clones se seleccionan para el gen de resistencia a la higromicina y contra el gen de quinasa de timidina de herpes simplex. Después de que aparecen las colonias éstas se transfieren a placas de 96 pocillos. Las células crecen hasta la confluencia y se hacen duplicados de las placas. El ADN genómico se cosecha de los clones celulares y se llevan a cabo reacciones de PCR usando un cebador específico de gen de resistencia a la higromicina y un cebador 3', el promotor presente en el constructo. Los clones con una banda de PCR positiva se cultivan en matraces y se realiza una transferencia de Southern para verificar el resultado del PCR.

[0082] Segundo, el constructo objetivo que contiene el gen de resistencia a la blasticidina se somete a electroporación en las células CHO homocigóticas después de que las células se hayan seleccionado para el gen de resistencia a la blasticidina y contra el gen de quinasa de timidina utilizando 10 microg/ml de blasticidina y 1 micro-molar de ganciclovir. Nuevamente, los clones celulares se verifican por PCR usando un cebador específico de gen de resistencia a la blasticidina y un cebador 3' para el promotor presente en el constructo. Los clones positivos se evalúan de nuevo mediante transferencias de Southern.

[0083] Los disociadores homocigóticos se modifican con un plásmido de expresión de recombinasa Cre. La recombinasa Cre recombinará los sitios lox y eliminará los genes de resistencia al fármaco.

Cebadores de intrón 1:

[0084]

CHO-proteína-S-exón1-sentido2 (SEQ ID nº 23):

5'-CTGCTGGTATGCCTAGCCCTGGTG-3'

CHO-proteína-S-exón2-antisentido2 (SEQ ID nº 24):

5'-TGCAGAGCTCTTCGATGCATTCTC-3'

Cebadores de intrón 2:

[0085]

CHO-proteína-S-exón2-sentido2 (SEQ ID nº 25):

5'-AAGGGCAATCTTGAAAGAGAATGC-3'

CHO-proteína-S-exón3antisentido (SEQ ID nº 26):

5'-CCAAATATTTTGGATAAAAATAATC-3'

Cebadores de 5'UT/promotor:

[0086]

Promotor sentido2 de PS-CHO (SEQ ID nº 27):

5'-AARCAACCCCTTTTGACCAT-3'

CHO-proteína-S.promotorAntisentidoI (SEQ ID nº 28):

5 5'-CCCAGAGGAGCTGCGAGCCTG-3'

5'UT/promotor (inmediatamente 5' a secuencia de codificación) (SEQ ID nº 29):

[illegible]

exón1 (SEQ ID nº 30):

atgagggctctgagcgtagcgtgtcggctactgctggtatgcctagccctggctgcccagcctcggagacaaac

15 intrón1 (SEQ ID nº 31):

tgtaagtaatccatacctctctggttctccattccctatgtgccccggcttgaaagattttccactaggctgtttgctgctcctaagtt
 tccagtaagtcgccaccattcagagagtcgcgccagcctgggtctggtgggcagtgtaaagggtgggacaggatcaaagctt
 gccttgcttgagaaccaattgtccacaggacttgattccagaaccgggtgacactaagtgtcaaaggaattgcttgaaacatag
 tcctaaatattgctagggaagctaagtcagcctgttgccctcctccggttacaagagtgccccagccccgacccctctcctgcg
 gctaaccttcttttgcaatttctggacttgaacttgattgactggctcaccattgacaaactgtttggggactgctgggggtgttac
 atatgatttcttaaccttgatataagaaatagctgttggtgttaccttgtaaccgaggatcatttctgaggggtttgactgttgc
 gcttgagatggcagcaagaattctgtacaacacacacattttgtgttcttggtcttctcttccattctcagattccgggag
 tatatcgagtttctcttagaaatataaaacgaaccacaagggttttagtaacatttaattggtcaattaaattgttttagaagcttaa
 atatgttcataattaacactgcttctttgtcttttgtagtccagtcactggcatgggagcaataactgtatacaaaataccact
 taggtcactgcgagcaccaaagaactttcaagatgtgaattaagtaggagttgctggaattgcaagctttattaattagt
 aaggaatctagcctgataattttaaatgtctaactaagttaaagaccagaatgaaactggtcactttttattgaggataaaca
 gttacagttataaagcctcaacaatcaaagccctacgatgaagcagcgtgtgactgtatgcacatgatctatctgttcagagg
 aacaatcaaacattttcagatagcatcagggcggtgtgtgtactgcctataatcctagcaaaagtcagaggcaagcagatctc
 tgtgttcaaggccagcctagtctacagagtgagttccaggacaactggggctacacagagaaacctgtctcagagaaaaaca
 aaataaaaccaaatcagatagctggtgtttgggaaaagagcaaaagacagcagtgctggccacacagagagtagacaag
 ttcattctacaaggacatcacagaagaatatgtgacccaatgacgaccataaactttctgttctgtgtcaaattatctccgt
 ttattgatgaagaaccagacactatgagctgcgtctcctcctaagattttgtttggtgtctgtttttgtcaaggggttcattgtg
 gccctgagcattagatccagggtttgtgcatgctaggccaggagctatattccgaactcagaagactagggaattgagat
 ataatagaatttgaaattaccttctgtacaattgattgtatggttctagaaatatgtctatattaagggaagcctttgcagaagac
 agttattttgagatggtgcataacacaaaagaaatgaactaaagcctgaggcctgctctgtagctctgccttgcccttagcctac
 aataactttctttacctttcaagcatgtgccaccacgcctgactttcaggcccttcattttaacaagaaagcaagtattcagttatc
 aactgactttccaaatgcattgtatgaataaaaaactacaaaaatataaaaataagaactatacacacaaaagccttgattta
 aaatttacgctgtggacatatttgtcatcattcgtgaagccttgcggtataaaaggcaagggggaaggaggatattctattt

tgggtaggctaatttggccttatccagacttcccttttgggtggatgcagtctgccagcacactattggcccatcttctacatg
 gctttgtgctctgctctgcccttagctaattgtccctttgacatgctttgtcttctcttaaggtttctatacttcaaaaaccatccgc
 tacactaatggagtgattttctcaagggttgctttatgtttggggttgtagtcaagagttagttctgatatagcaatgggtgata
 gtatagtcttctacatgaactctatgccagcaagtagacaggggtatattcatatgggtgttttctgttcaactgagttcatgtctc
 tttgtatcttttgtttgtttgtgagacaggggttctctgtatgctttgagtcagtcctggaacttgctggccggccttgaactcaca
 gagattcacctgctctgctcccaagtgtctgggatttaaggtgtgagtcaccactgccagggttttcttgtatcttgagtgaa
 taaataggtaagctttaaataataatagagcagtcatttatatacattaaataataatgcattgtgagatgagcatagccttt
 gagggccagggaacagaaagatttacttcaactgttaataatactgggtatacacaacgtacatacnnnnnnngtgtgtgtgt
 gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtcatgccatagcacacatgtgaagtcagagtagcagcattctcttttctaccttctgtagattctgt
 ggtcagagtcagggtcaaatcaaatcagacagatgcattgtataaaatgctcttaccactgaaccatcttctgtctgtgtccaca
 agcttagtggaagaatgctgggaagtgaatagtatttttaaatgtagttaacctgacttttgtgtgtgtgtgtattgagg
 ccacattttcattgttctgagaaaataattactatttctcagacagaattatataatttattgaagttcatgaattccatattatttc
 ctgtattattacaaaatagcatgcttaaacacttccaagtgtgaaaacagctgtcatgtaggacacggattattgacagtgtg
 ccatttatcagccagtaatacacttggcaggttagcagctcatctgttatctttatgcacacaaagccttgttgaaattttatcttt
 aatgagtgatcaatgaaatggaaagagataagagttaaaaatacaacccaaactattgtatttacatttctctttagaagaac
 ctaaaagcagcattacttcttggccatatttaataaataacatcatttaacctgttccctgctccagactctcccatatactcctctt
 caattttattggccctttaaatgacatatcattacatgtatatccctacacataagataaccagttcagttgtataatgttacttg
 catgtgtgttttcaatgctgtatcatttggtagtggataaccaatgggtgtgccctatgaaggggagagatttgtatcatgcttag
 cattccttgttgactgtaggatttgtttaagggtgaggtctcttggcttcttccctgtctgtctctgtcatgtccatggccatcctgtt
 cagctcatgtttatgtagtcatgctgtatgaggctttatggatgtagcttctgacattgctaagcaacacagctcagcaaaactccc
 cagtcctctggttcttacaatctttccacactgtttcccatgttgtctgtagccttaggtgtgaagtgtttgtgtctgtatccattg
 ggactagggtccacatgtctgcatttgaatta cttgtgtgtttctgttaacgggtctctatgtgttgcaacgagaaggagtagttgctt
 tgacgatgtgtaaaagactatcttgtgggtataaggacaaaatatttgcattgaagctatggattatgtcgtgtcctcaagcatgaactg
 gataaattgtacagctcacacaaaacagctatagctagctgcacagtcaggcatgactgatctgtggggaggtgttaacca
 aagggttatacatagctatgtattttctaagctctagttttactatcacaaagaaaattaattcaccttaattgttttaataagatgat
 atatcttagggaaaaaatgaaggtcttttttgacttatataaaagcttatgttttctacagttt

exón2 (SEQ ID nº 32):

tgtcaaaagaacatgcctcgcaagtcctggtaggaagcgccgcgcaaataccttgcttgaagaaactaaaagggaatct
 tgaaagagaatgcatcgaagagctctgcaataaagagggaagccagggaggtctttgaaaacaatcccgaaacg

intrón2 (SEQ ID nº 33):

gtaagagttcgtggaaatgaccaagtccacactcggatataattggcagtcagaacactgccagcttgagctaccttgcctt
 gtttgaagctaattgacttaggagttcatttctcatgtgttaccactgacatttcaggcagggtgccatgacaggcactccagc
 caaactccatttcccttaagtctcattactcgcaactagtatcgactttataatgtgtgactattttattatcctaaacaaatctggt
 gccttgagggtgcaagagaagatgcgactgaagggtgaagtaccatatatgtacttgcatgtcactgtgcttttgtttgttg
 attgtgtttgagacagtccttactctgtagctccaaactacaaggagctccctatccatctgctttggcttcagcctcccaagta
 gtgattatagactggtgtgtcttgcatttatctttaagagggtctagatagaatggggccactaaactgagatttagtcattaca

[illegible]

exón3 (SEQ ID nº 34):

5 gattattttatccaaaatatttgg

Ejemplo 4: ingeniería genética del factor de transcripción.

10 [0087] La expresión de la proteína S se puede reducir o anular por infrarregulación transcripcional del mRNA de la proteína S. Los factores de transcripción se pueden diseñar para enlazar elementos de ADN específicos en la región promotora del gen de la proteína S CHO. Las proteínas de dedo de zinc son ideales para este tipo de manipulación y los

procedimientos comunes son examinados por Wolfe-SA et al. Annu. Rev. Biophys. Struct. vol 3:183-212, 1999 y Jamieson-AC et al. Nature Reviews, vol 2:361-368, 2003. Típicamente, un único dedo de zinc se enlaza a tres bases adyacentes entre sí en la misma cadena de ADN y una cuarta base en la cadena complementaria. Así, diferentes dedos de zinc se pueden combinar para enlazar con un elemento de ADN deseado. El reconocimiento de un elemento de ADN de 15-18 pares de bases, que en realidad puede ser universal en el genoma, necesita una combinación de 5-6 dedos de zinc.

[0088] Se elige un elemento de ADN con la secuencia GGAGAGGAGGGGGG (SEQ ID n° 35) del promotor de la proteína S CHO y se predicen proteínas de dedo de zinc enlazando con el elemento de ADN de acuerdo con las publicaciones de Liu-PQ et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 276 (14), pp. 11323-11334, 2001 y Zhang-L et al. Journal of Biological Chemistry, Vol. 275 (43), pp. 33850-33860, 2000. Se fabrica una proteína de cinco dedos de zinc sintética basada en SP1 y BTEB4 mediante PCR a partir de oligonucleótidos de superposición como se describe en Zhang-L et al. Journal of Biological Chemistry, Vol. 275 (43), pp. 33850-33860, 2000: 5 dedos de zinc CXXCXXXXXQSGHLQRHXXXH (SEQ ID n° 36) interactúa con GGAg; 4 dedos de zinc CXXCXXXXXRSNDLARHXXXH (SEQ ID n° 37) interactúa con GAGg; 3 dedos de zinc CXXCXXXXXRSNDLTRHXXXH (SEQ ID n° 38) interactúa con GAGg; 2 dedos de zinc CXXCXXXXXRSNDHLRTHXXXH (SEQ ID n° 39) interactúa con GGGg; 1 dedo de zinc CXXCXXXXXRSNDHLARHXXXH (SEQ ID n° 40) interactúa con GGGa; y N-terminal para los dedos de zinc el dominio KRAB de KOX1 se inserta.

[0089] En la unión de la proteína de dedo de zinc creada genéticamente con el elemento de ADN GGAGAGGAGGGGGG (SEQ ID n° 41), la transcripción de la proteína S CHO se esperaba que fuera infrarregulada.

[0090] La región promotora de la proteína S CHO (SEQ ID n° 29) se clonó en pGL3-básico (Promega; Madison) y se usó como constructo indicador en un ensayo de indicador de luciferasa para determinar el efecto de ZNF-PS. El plásmido que codifica el gen ZNF-PS y el plásmido indicador de la proteína S CHO se modificaron en células CHO-K1 y se determinó la actividad de luciferasa. ZNF-PS puede infrarregular la transcripción de la proteína S al 50% de una manera independiente de respuesta a la dosis. La figura 3a ilustra la infrarregulación de ZNF-PS de la proteína S. En un experimento similar las células CHO-K1 se modificaron con ZNF- PS y pEGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína de fluorescencia verde mejorada) y se determinó por PCR en tiempo real la proteína S y mRNA de pEGFP. El pEGFP sirvió como control de transfección. La figura 3b muestra una disminución del número de proteína S en un 50 %.

ZNF-PS (SEQ ID n° 42)

**MdaksItawsrIvtfkdvfdftreewklIdtaqqIvymvmlenyknivsIgyqItkpdvIlrlekgeepwIvereihqethp
dsetafelkssvssrsIfkdkqscdIkmeqmarmdlwylsleevwkpqkkqkqhichiqgckgkvygrsdhlarhIrwhtgerpf
mctwsycgkrftrsdltrhkrthtgekkfacpecpkrfmrnsdltrhikthtgerpfacdwwqgcdkkfarsdnlarhhrthtg
ekrfscplcskrftqsghlqrharrhpgfhpdllrrpgarstspdsIpcslagspapsapapagl**

Ejemplo 5: determinación del número de alelos de proteína S en el genoma CHO K1

[0091] La línea celular CHO-K1 tiene sólo 21 cromosomas, en comparación con el hámster chino que tiene 22 cromosomas, y sólo 8 de estos 21 son normales. En las 13 translocaciones de cromosomas alteradas se han detectado deleciones e inversiones pericéntricas (Deaven & Petersen, Chromosoma 1973; 41(2), 129-144). No se sabe si el gen de la proteína S está presente en cromosomas alterados o normales o cuántos alelos están presentes en el genoma CHO-K1.

[0092] La empresa SeeDNA Biotech Inc. efectuó un análisis FISH (*Flourescence In Situ Hybridization*, hibridación de fluorescencia in situ) en las células del genoma de CHO K1 (ATCC# CCL-61) usando un plásmido conteniendo la sonda del intrón 1 de la proteína S (SEQ ID n° 43) en pCR2,1 (Invitrogen; Carlsbad) clonada y suministrada por nosotros. Los resultados del análisis FISH se muestran en la Figura 4. El gen de la proteína S se localiza en dos cromosomas diferentes de la misma metafase. El cromosoma con locus A (mostrado por una flecha) es submetacéntrico y de tamaño más pequeño. El cromosoma con locus B (mostrado por una punta de flecha) es metacéntrico y de tamaño mayor. El diagrama de bandas de estos dos cromosomas es también diferente. La sonda de intrón 1 de la proteína S (SEQ ID n° 43).

ctgctggtatgcttagccctggtgctgccagcctcggagacaaactgtaagtaatccatacctcctggcttctccattccctatgt
 gccccggcttgaagattttccactaggctggttgcctcctaagtttccagtaagtcgccaaccaatcagagagtcgcggcag
 cctgggtctggtgggcagtgtaaagggtgggacaggatcaaaagcttgcttgcttgagaaccattgtccacaggacttgattcc
 agaaccggggtgacactaagtggtcaaaaggaattgcttgaaatagtcctaaatattgctaggaaagctaagtaagcctgttg
 cctcctcccggtttacaagagtgccccagccccgacccctcctctgcggtacaccttccttttgcaatttctggactttgaacttgatt
 gactgggtctcacattgacaaactggttggggactgctgggggtgttacatatgatttcttaaccttgatataagaatagctgttg
 atgtaccttgtaaccgaggatcattttctgaggggtttgactgttgccgcttgagatggcagcaagaattctgtacaacacacac
 attttctgttcttgggtcttctcctcttccattctcagattccgggcagtatatcgagtttctcttagaaatataaaacgaaccaca
 aggttttagtacatttaattggtcaattaattgtttttagaagcttaataatgttcataattaacactgcttcttttgctctttgtag
 tccagtcactggcatgggagcaataactgtataacaaataccacttaggtcactgcgagcaccacaagaaacttttcaagat
 ggtaattaaataggagtttgctggaattgcaagttttattaaatagtaagggaatctagcctgatatttttaaatgtctaactaagt
 taaagaccagaatgaaactggttcactttttattgaggataaacaagttacagttataaagcctcaacaatcaaagccctacga
 tgaagcagcgtgtgactgtatgcacatgatctatctgttcagagggaacaatcaaacattttcagatagcatcagggcggtggt
 ggtactcgccctataatcctagcaaaagtcagaggcaagcagatctctgtgttcaaggccagcctagtctacagagtgagttccag
 gacaactggggctacacagagaaacctgtctcagagaaaaacaaaataaaaccaaattcagatagctgggtgtttgggaaaa

[illegible]

Ejemplo 6: manipulación génica dirigida de la proteína S CHO mejorada por proteínas de fusión de nucleasa de dedo de zinc.

[0093] La manipulación génica dirigida por recombinación homóloga es un trabajo difícil y laborioso debido a que las recombinaciones somáticas que se desarrollan en células mamíferas no son homólogas muy a menudo. No obstante, la escisión específica de sitio de las cadenas de ADN pueden mejorar la recombinación homóloga. El diseño de dedos de zinc de enlace con ADN fundidos con endonucleasas hace posible diseñar casi exactamente dónde debería producirse la escisión de ADN (Durai et al., *Nucleic Acids Research*, 2005; 33(18), 5970-5990 and Smith et al., *Nucleic Acids Research*, 2000; 28(17), 3361-3369). Dos proteínas de dedo de zinc, diseñadas para enlazar los elementos 5'-GTCCTGAGC-3' (dedo derecho) y 5'-GCTGGTATG-3' (dedo izquierdo), se crearon en el marco publicado por Mani et al. (Mani et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 335; 447-457). El ADN de dedo de zinc enlazando con la especificidad del dedo de zinc se ha descrito por (Rebar-EJ, et al. *Nature Medicine* 8 (2002) 1427-1432; Liu-PQ, et al. *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 11323-11334; Ren-D, et al. *Genes & Development* 16 (2002) 27-32; Mani-M, et al *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (2005) 447-457).

[0094] Los dedos de zinc derecho e izquierdo se fundieron con el dominio de nucleasa de la enzima de restricción de Fok I y Sts I (SEQ ID n° 44-51). La enzima de restricción Fok I y Sts I necesita homodimerizar para ser capaz de disociar ADN, lo que también aumenta la especificidad del par de dedos de zinc. La función de las nucleasas creadas genéticamente se ilustra en las figuras 5 y 6. Cuando el ADN genómico ha sido dividido por las nucleasas de dedo de zinc, el mecanismo de reparación intentará reparar el espacio, muy posiblemente por recombinación homóloga. El constructo de manipulación génica dirigida (SEQ ID n° 52) desprovisto del gen de la proteína S será modificado junto con las nucleasas. En la posición del exón 1 de la proteína S en el genoma, se insertará el gen EGFP. La figura 6 ilustra el esquema de flujo de la recombinación homóloga. El constructo de manipulación génica dirigida se realizó por cambio del gen de luciferasa en el constructo indicador de la proteína S (ejemplo 4) por el gen EGFP y además la inserción del intrón 1 de la proteína S después de la señal poli A. El constructo está formado por el promotor de la proteína S, el gen EGFP, la señal poliA y el intrón1 de la proteína S, no el exón1. La línea celular CHO recombinante homocigótica expresará EGFP y no proteína S debido a que el péptido señal de la proteína S se ha eliminado y el transcrito será truncado justo después de que el EGFP codifique secuencia debido a la señal poliA. Los clones de célula heterocigota se espera que sean los más abundantes y un análisis de PCR revelará si hemos conseguido hacer un clon de célula homocigótica. Un clon de célula heterocigota se puede tratar una segunda vez con un vector objetivo conteniendo un gen de resistencia antibiótica en lugar del gen EGFP para facilitar la selección.

(SEQ ID n° 44) secuencia de ADN de dedo de zinc izquierdo-Fok I

**atgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgcccaaaaaagaagagaaaggtagatgaaaaaccttacaagtgtccggaat
gtgggaagtcttttagtcggagcgacaacctggcccgccaccagcggacgcataccggtgagaagccctacaaatgccag
aatgcggaaatcattttcgcggagcagcaacctgcccggagcaccacgaacccacacaggcgagaaaccatttaaatgtc
ctgagtggtgtaagagcttttagccggagcgaacaaacctgacccggcatcaagctactcatacgggcccgggtggcagcggtg
gcggtagcggcgggtggcagcgggtggcggatcccaactagtcaaaagtgaactggaggagaagaaatctgaacttcgtcata
aattgaaatatgtgcctcatgaatatattgaattaattgaaattgccagaaattccactcaggatagaattcttgaaatgaagg
aatggaatttttatgaaagtttatgatatagaggttaaacatttgggtggatcaaggaaacccgacggagcaatttatactgt
cggatctcctattgattacggtgtgatcgtggatactaaagcttatagcggaggttataatctgccattggccaagcagatga
aatgcaacgatattgtcgaagaaaatcaaacacgaacaaacatatcaacccctaataatggtggaaagtctatccatcttctg
taacggaatttaagttttattgtgagtggtcactttaaggaaactacaaagctcagcttacacgattaaatcatatcactaatt
gtaatggagctgttcttagtgtagaagagcttttaattggtggagaaatgattaaagccggcacattaaccttagaggaagtga
gacggaaaatttaataacggcgagataaacttttag**

(SEQ ID n° 45) secuencia de ADN de dedo de zinc izquierdo-Sts I

atgaagctactgtcttctatcgaaacagcatgccccaaaaagaagagaaaggtagatgaaaaaccttacaagtgtccggaat
 gtgggaagtccttttagtcggagcgacacacctggcccgccaccagcggacgcataccggtgagaagccctacaaatgccag
 aatgcggaaaaatcattttcgcgagcagcaacctgcccggagcaccacgaacccacacaggcgagaaaccatttaaatgtc
 ctgagtgtgtaagagctttagccggagcgacaacctgacccggcatcaagctactcatacgggcccgggtggcagcgggtg
 gcggtagcggcgggtggcagcgggtggcggatccgtattagaazaaagtgatattgaaaaattagaatcaattgcgtacgga
 actaaccaatattgaccaattcttatctaaggaattgatatagctagtaaaaagaaaaaccagtaattgtgaaaatacgggaatt
 gaagcaatatcaaccaagattttacggatgagttgggttttcaggcaaacatctaggagggaagcaacaaaccagatggact
 cctgtgggatgatgattgtgcaattattctgattcaaaagcttactcagaaggctttccactcactgcctccacacagatgctat
 ggggaagataattgaggcaattacagagcgaaaagaagaataaagccaacgtggtgggatattgctccagaacatttaga
 caatacatatttcgcttacgtttctgggagtttttcgggttaattataaggaacagttacaaaaatttaggcaagatacaaaccatt
 taggtggggcactagagttgttaaatgttatta ctagcaataattataaaaactcaaaaaatgagtaaaaaagaagttaag
 aaaagtattcttgattataatatttcatatgaagaatatgtccattacttgcaagaatagagtaa

(SEQ ID nº 46) secuencia de ADN de dedo de zinc derecho-Fok I

atgaagctactgtcttctatcgaaacagcatgccccaaaaagaagagaaaggtagatgaaaaaccttacaagtgtccggaat
 gtgggaagtccttttagtcggagcgacgcacctgacccagcaccagcggacgcataccggtgagaagccctacaaatgccag
 aatgcggaaaaatcattttcgcgagcagccacctggcccggcaccacgaacccacacaggcgagaaaccatttaaatgtcc
 tgagtgtgtaagagctttagccaagcagccacctgacccggcatcaagctactcatacgggcccgggtggcagcgggtggc
 ggtagcggcgggtggcagcgggtggcggatcccaactagtcaaaagtgaactggaggagaagaatctgaactctgcataaa
 ttgaaatatgtgcctcatgaatatattgaattaattgaattgccagaaattccactcaggatagaattcttgaaatgaaggtaa
 tggaaatttttatgaaagtttatggatatagaggtaaacatttgggtggatcaaggaaaaccggacggagcaatttatactgtcg
 gatctctattgattacgggtgtagctgtgatactaaagcttatagcggaggttataatctgccattggccaagcagatgaaat
 gcaacgatattgtcgaagaaaatcaaacacgaacaaacatatcaaccctaattgaatgggtggaaagictatccatcttctgtaa
 cggaatttaagtttttattgtgagtggtcactttaaggaactacaaagctcagcttacgattaatcataatcataatgtta
 atggagctgttcttagttagaagagcttttaattgggtggagaaatgattaaagccggcacattaaccttagaggaagtgaga
 cggaatttaataacggcgagataaaacttttag

(SEQ ID nº 47) secuencia de ADN de dedo de zinc derecho-Sts I

atgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgccccaaaaagaagagaaaggtagatgaaaaaccttacaagtgtccggaat
gtgggaagtcccttagtcggagcgacgccctgaaccagcaccagcggacgcataccggtgagaagccctacaagtgccag
aatgcggaatcatcttcgcagagcagccacctggcccgccaccaacgaacccacacagggcgagaaaccatttaaatgtcc
tgagtgtggtagaagccttagccagagcagccaacctgacccggcatcaagctactcatacgggcgccgggtggcagcgggtggc
ggtagcggcggtggcagcgggtggcggatccgtattagaaaaaagtgatattgaaaaattagaatcaattgcgtacggaac
taaccaatattgaccattcttatcttaaaaggaattgatatagctagtaaaaagaaaaaccagtaattgtgaaaaatacgggaattg
aagcaatatcaaccaagatttttacggatgagttgggtttttcaggcaaacatctaggaggaagcaacaaaccagatggactc
ctgtgggatgatgattgtgcaattattcttgattcaaaagcttactcagaaggcttccactcactgctccacacagatgctat
gggaagatatttgaggcaatttacagagcgaagaaagaagaataaagccaaacgtggtgggataattgctccagaacatttaga
caatacatattcgctacgtttctgggagttttcgggtaattataaggaacaggtacaaaaatttaggcaagatacaaaaccatt
taggtggggcactagagttgttaaattgttattactagcaataattataaaactcaaaaaatgagtaaaaaagaagttaag
aaaagtattcttgattataatattcatatgaagaatatgctccattacttgcaagaatagagtaa

(SEQ ID nº 48) secuencia de proteína de dedo de zinc izquierdo-Fok I

mklssieqacpkkkrkvdekpykcpecgksfsrsdnlarhqrthtgekpykcpecgksfsrssi rehqrthtgekpfkcpe
cgksfsrsdnltrhqathtggggsgggsgggsgggsgqlvkseleekkselrhklkyvpheyieliearnstqdrilemkvmef
fmkvygyrgkhlggsrkdgalvtvgspidygvivdtkaysggynlpigqademqryveenqtrnkhipnewwkvyys
svtefkflfvsgfhkgnykaqltrnhitncngavlsveelllggemikagttleevrrkfnngelnf

(SEQ ID nº 49) secuencia de proteína de dedo de zinc izquierdo-Sts I

mklssieqacpkkkrkvdekpykcpecgksfsrsdnlarhqrthtgekpykcpecgksfsrssi rehqrthtgekpfkcpe
cgksfsrsdnltrhqathtggggsgggsgggsgggsgqlvkseleekkselrhklkyvpheyieliearnstqdrilemkvmef
kiftdeigfsgkhlggsrkdgalwdddcailldskaysegfptashtdamgrylrqfterkeelkptwwdiapehlntyfay
vsgsfsgnykeqlqkfrqdrnhlggalefvklillannnyktqkmskkevksildynisyeyapllaeie

(SEQ ID nº 50) secuencia de proteína de dedo de zinc derecho-Fok I

mklssieqacpkkkrkvdekpykcpecgksfsrsdaltqhqrthtgekpykcpecgksfsqsshlarhqrthtgekpfkcpe
cgksfsqsshltrhqathtggggsgggsgggsgggsgqlvkseleekkselrhklkyvpheyieliearnstqdrilemkvmef
fmkvygyrgkhlggsrkdgalvtvgspidygvivdtkaysggynlpigqademqryveenqtrnkhipnewwkvyys
svtefkflfvsgfhkgnykaqltrnhitncngavlsveelllggemikagttleevrrkfnngelnf

(SEQ ID nº 51) secuencia de proteína de dedo de zinc derecho-Sts I

mklssieqacpkkkrkvdekpykcpecgksfsrsdaltqhqrthtgekpykcpecgksfsqsshlarhqrthtgekpfkcpe
cgksfsqsshltrhqathtggggsgggsgggsgggsgqlvkseleekkselrhklkyvpheyieliearnstqdrilemkvmef
kiftdeigfsgkhlggsrkdgalwdddcailldskaysegfptashtdamgrylrqfterkeelkptwwdiapehlntyfay
vsgsfsgnykeqlqkfrqdrnhlggalefvklillannnyktqkmskkevksildynisyeyapllaeie

(SEQ ID nº 52) promotor de proteína S-EGFP-constructo objetivo de intrón 1 de proteína S

atcattacatgtatatccctacacataagtataaccagttcagtttgataatgttacttgcatgtgtgttttcaatgctgatcatttg
 gtagtgagataaccaatgggtgtccctatgaaggggcagagtagtttgatcatgcttagcatttcttgcgaccgatgccctga
 gagccttcaaccagtcagctcctccggtgggcgcggggcatgactatcgctgcgcgacttatgactgtcttcttatcatgcaa
 ctctgtaggacaggtgcccgcagcgctcttcgcttctcgcctcactgactcgcgtgcgctcggtcggtcggtcggtcggtcggt
 atcagctcactcaaaaggcggtatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcca
 gcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcggtgtgtggtgttttccataggtccgccccctgacgagcatcaca aaaatc
 gacgtcaagtacagagggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgtct
 cctgttccgacctgcgcgttacgggatacctgtccgcttctccctcgggaagcggtggtggttctcctatagctcagcgtgtagg
 tatctcagttcgggtgtaggctgttcgtccaaagctgggtgtgtgcaagacccccgttcagcccgaccgtgcgccttatccg
 gtaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcg
 aggtatgtaggcggtgtacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtaatttggtatctgcgt
 ctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtgagctcttgatccggcaaaacaaaccgctggtagcggtggtttttg
 ttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtgg
 acgaaaaactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttt
 aaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcaccatctcagcgatctgtct
 atttgcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgca
 atgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcgagaagt
 ggtctcgaactttatccgctccatccagctattaaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcg
 caacgttggtgccaattgctacaggcatcgtggtgtcagctcgtcgtttggtatggttcattcagctccgggtcccaacgatcaa
 ggcgagttacatgatcccccatggtgtgcasaaaagcggttagctccttcggtcctcogacgtgtgcagaagtaagttggccgc
 agtgttatcactcatgggtatggcagcactgcataattctctactgtcatgcatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagta
 ctcaaccaagtcattctgagaatagtgatgctggcgacagagttgctcttgcggcggtcaatacgggataataccgcgccaca
 tagcagaactttaaaagtgtcatcatttgaaaaagcttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagt
 tcgatgtaaacccctcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttaattcaacagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggc
 aaaatgcccgaaaaaagggaataaggggcgacacgggaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcattta
 tcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtatttagaaaaataaacaataaggggttcgcgcacatttccccga
 aaagtgcacctgacgcgcctgtagcggcgcatgaagcgcgcggtgtgtgtggttacgcgcagcgtgaacgctacacttg
 ccagcgccctagcgcgcctccttctcgttcttccctccttctcgcacggttcgcggccttccccgtcaagctctaaaacgggg
 gctccctttaggggtccgatttagtctttagcggcacctcgaccccaaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtgggcat
 cgccctgataagcgggttttgccttttagcgttgaggtccaagttctttaaagtggactcttggtccaaactggaacacactca
 accctatctcgggtctattcttttgatttataagggttttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatt
 taacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaatttgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggggcgatcgggtg
 cgggctccttcgtattacgccaagcccaagctacatgataagtaagtaataattaaggtaagggaagtaacttgagcggccgc
 aataaaatatcttattttcattacatctgtgtgtgtgtttttgtgtgaatcgatagtaactaacatacgctctccatcaaaacaaa
 cgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtgagggtgcagaaacatttctctatcgata.

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped expresando una proteína dependiente de la vitamina K de interés, dicha célula huésped siendo transfectada con un constructo de polinucleótido para codificar la proteína dependiente de la vitamina K de interés; donde dicha célula huésped comprende:
- (a) un gen endógeno interrumpido codificando la proteína S;
 - (b) un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un RNAm que codifica la proteína S expresada endógenamente por la célula huésped; o
 - (c) un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc enlazando con un elemento de ADN del gen que codifica la proteína S endógena;
- y donde dicha célula huésped expresa una cantidad inferior de proteína S endógena cuando se compara con la célula huésped en ausencia de la modificación (a); (b) o (c).
2. Célula huésped según la reivindicación 1, donde dicha proteína dependiente de la vitamina K de interés se selecciona del grupo que consiste en proteína S, Factor II (Protrombina), Factor X, Factor IX, Proteína C, Factor VII, Proteína Z, proteína 1 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 2 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 3 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 4 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína Gla del hueso, proteína Gla de la matriz y Osteocalcina.
3. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células 293 (HEK293), células BKH, células HKB11, células SP2/0 y células NS0.
4. Célula huésped según las reivindicaciones 1-3, donde el gen endógeno que codifica la proteína S se ha interrumpido por inactivación génica del exón 1.
5. Célula huésped según las reivindicaciones 1-3, donde el gen endógeno que codifica la proteína S se ha interrumpido por mutagénesis aleatoria.
6. Célula huésped según la reivindicación 1, donde dicha proteína de dedo de zinc se enlaza con un elemento de ADN que comprende la secuencia de SEQ ID nº 35.
7. Método para la producción de una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, dicho método incluye los siguientes pasos en cualquier orden:
- a) transfección de una célula con un constructo de polinucleótido que codifica una proteína dependiente de la vitamina K de interés; y
 - b) modificación de dicha célula para expresar una cantidad sustancialmente inferior de proteína S endógena por cualquier método seleccionado de:
 - i) ruptura por inactivación génica del gen que codifica la proteína S endógena;
 - ii) transfección con un constructo de polinucleótido de siRNA apuntando a un mRNA que codifica la proteína S;
 - iii) transfección con un factor de transcripción siendo una proteína de dedo de zinc enlazando con un elemento de ADN del gen que codifica la proteína S endógena;
 - iv) mutagénesis aleatoria para ruptura del gen que codifica la proteína S endógena.
8. Método según la reivindicación 7, donde dicha proteína dependiente de la vitamina K de interés se selecciona del grupo que consiste en proteína S, Factor II (protombina), Factor X, Factor IX, proteína C, Factor VII, Proteína Z, proteína 1 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 2 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 3 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína 4 de ácido de gamma-carboxiglutámico de transmembrana, proteína Gla del hueso, proteína Gla de la matriz y Osteocalcina.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células 293 (HEK293), células BKH, células HKB11, células SP2/0 y células NS0.
10. Método según la reivindicación 7, donde el gen endógeno que codifica la proteína S se ha interrumpido por inactivación génica del exón 1.
11. Método según la reivindicación 7, donde dicha proteína de dedo de zinc se enlaza a un elemento de ADN que comprende la secuencia de SEQ ID nº 35.
12. Método para la producción de una composición que incluye una proteína dependiente de la vitamina K de interés con una cantidad sustancialmente inferior de al menos un contaminante de proteína siendo la proteína S expresada endógenamente por dicha célula huésped en ausencia de modificación, dicho método incluyendo las etapas de:

- a) producción de una célula huésped expresando una proteína dependiente de la vitamina K de interés según cualquier método de las reivindicaciones 7-11 y
- b) cultivo de dicha célula huésped en un medio de crecimiento y cosecha de dicho medio de crecimiento incluyendo dicha proteína dependiente de la vitamina K de interés.

5

FIGURA 1

vector RansiRNA

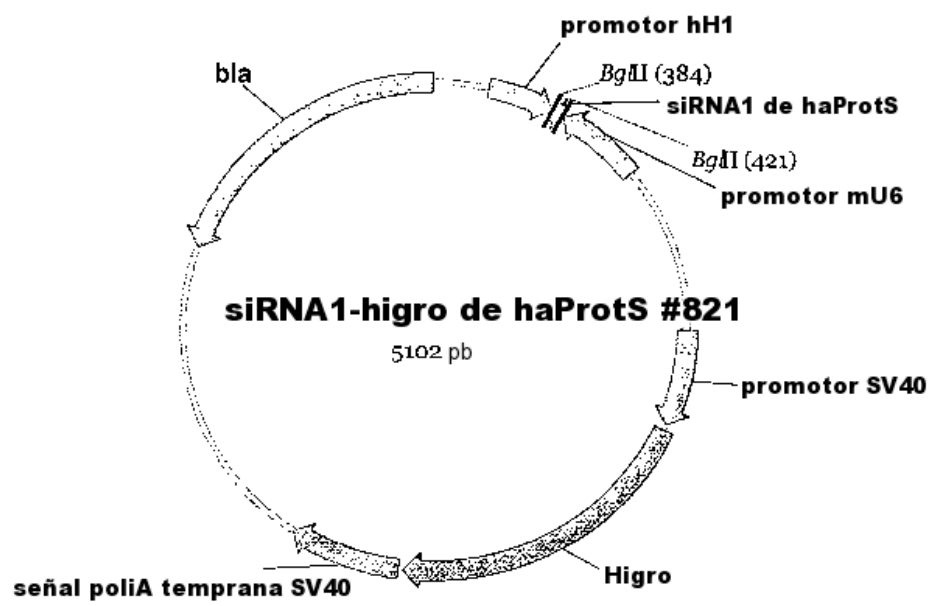


FIGURA 2

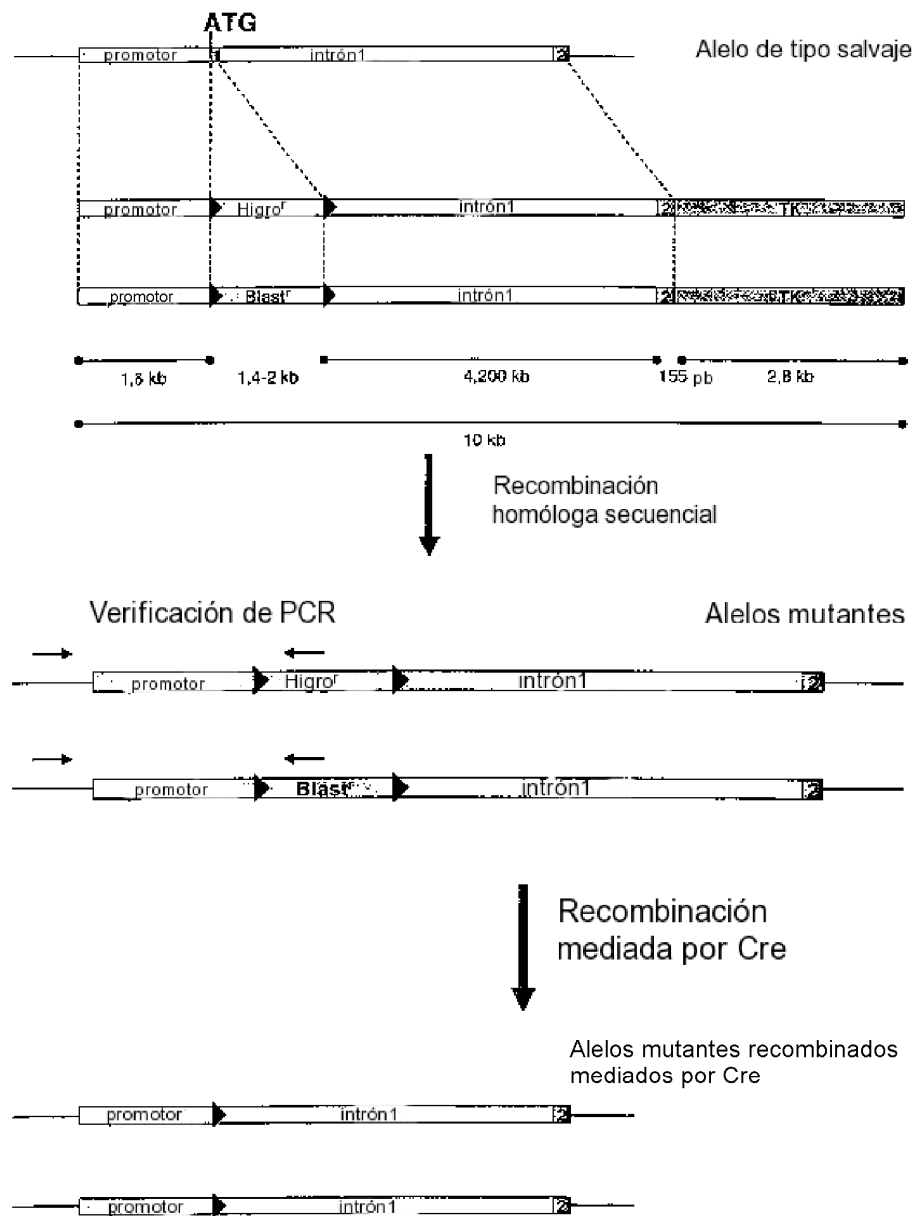
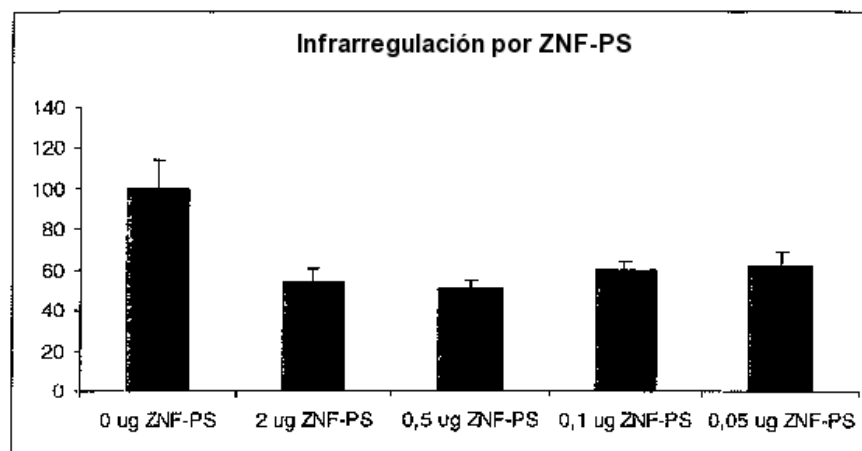


FIGURA 3

A)



B)

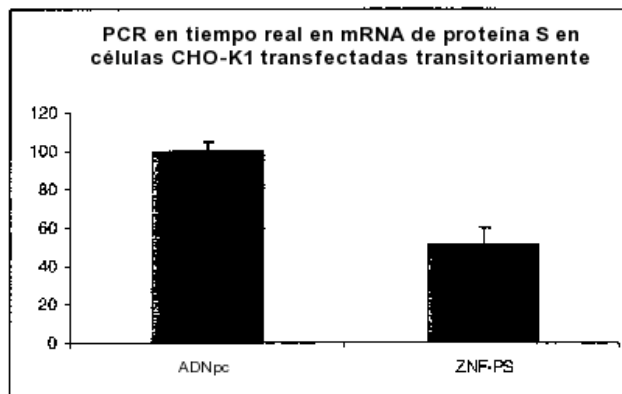


FIGURA 4



FIGURA 5

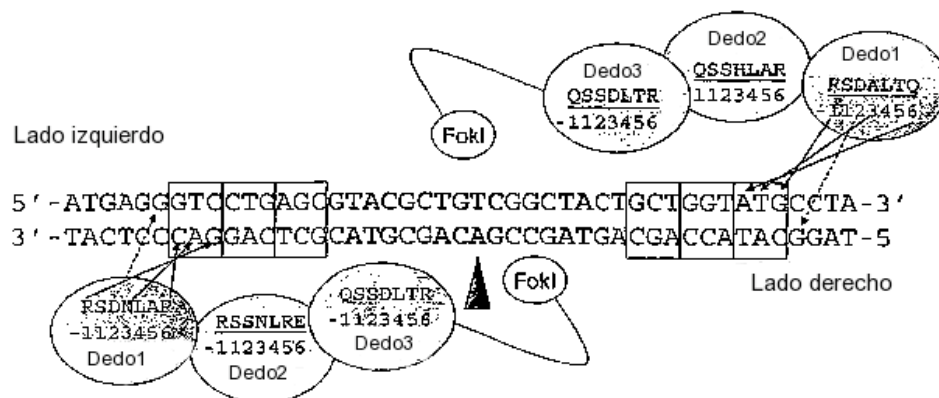


FIGURA 6

