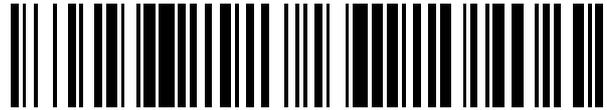


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 718**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10796596 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2451963**

54 Título: **Método para incrementar el rendimiento de la expresión de proteínas dependientes de vitamina K**

30 Prioridad:

10.07.2009 EP 09009064
26.08.2009 US 237016 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2014

73 Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)
45 Poplar Road
Parkville, Victoria 3052, AU

72 Inventor/es:

KEANE, JULIAN;
STOWERS, ANTHONY;
SOUPOURMAS, PETER y
GOODWIN, FRASER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 475 718 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

Método para incrementar el rendimiento de la expresión de proteínas dependientes de vitamina K

La vitamina K está implicada en la carboxilación de determinados residuos de ácido glutámico en proteínas para formar residuos gamma-carboxiglutamato (residuos Gla). Los residuos modificados se encuentran dentro de dominios proteicos específicos denominados dominios Gla. Los residuos Gla están implicados frecuentemente en la unión al calcio. Los residuos Gla son esenciales para la actividad biológica de todas las proteínas Gla conocidas.

La bioquímica de cómo se utiliza la vitamina K para convertir Glu a Gla se ha aclarado a lo largo de los últimos treinta años. Dentro de la célula, la vitamina K se somete a una reducción electrónica para pasar a una forma reducida de vitamina K (denominada vitamina K hidroquinona) a través de la enzima epóxido reductasa de vitamina K (VKOR). El gen que codifica VKOR (VKORC1) se ha identificado recientemente, y se describe con detalle en Rost et al., 2004 ((2004) Nature, 427, 537-541)). Otra enzima oxida a continuación la vitamina K hidroquinona para permitir la carboxilación de Glu a Gla; esta enzima se llama gamma-glutamyl carboxilasa o carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC). La reacción de carboxilación continuará solo si la enzima carboxilasa es capaz de oxidar la vitamina K hidroquinona a vitamina K epóxido al mismo tiempo; las reacciones de carboxilación y de epoxidación se dice que son reacciones acopladas. La vitamina K epóxido se vuelve a convertir después en vitamina K a través de la epóxido reductasa de vitamina K. Estas dos enzimas comprenden el ciclo denominado de la vitamina K. http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_K-cite_note-Stafford-28#cite_note-Stafford-28

En la actualidad, las siguientes proteínas humanas que contienen Gla han sido caracterizadas a nivel de estructura primaria: los factores de coagulación sanguínea II (protrombina), VII, IX y X, las proteínas anticoagulantes C y S, y la proteína Z que se dirige al factor X, así como la proteína Gla ósea osteocalcina, la proteína Gla de la matriz que inhibe la calcificación (MGP), la proteína del gen 6 específica de la detención del crecimiento (Gas6) que regula el crecimiento celular, y las cuatro proteínas Gla transmembranales (TMGPs) de función todavía desconocida. Gas6 puede actuar como un factor de crecimiento que activa la cinasa de tirosina del receptor Axl y estimula la proliferación celular o evita la apoptosis en algunas células. En todos los casos en los que se conocía su función, la presencia de residuos Gla en estas proteínas resultó ser esencial para una actividad funcional. Los múltiples residuos Gla permiten que el dominio Gla sufra cambios conformacionales que son necesarios para la actividad de las proteínas dependientes de vitamina K, en combinación con la unión a superficies de membranas de fosfolípidos.

Las proteínas de la coagulación de la sangre dependientes de vitamina K requieren una carboxilación completa o casi completa para unirse a las superficies de membranas en presencia de iones de calcio. Si antagonistas de la vitamina K inhiben la gamma carboxilación, las proteínas dependientes de vitamina K hipocarboxiladas no pueden por tanto formar la estructura dependiente de calcio que produce como resultado una baja afinidad hacia las membranas de fosfolípidos y menos actividad. La falta de actividad procoagulante de los mutantes del Factor IX hipocarboxilados encontrados en pacientes con hemofilia B, se puede asignar a deficiencias en los cambios conformacionales inducidos por calcio y a una pérdida de la capacidad para unirse a vesículas de fosfolípidos.

La biotecnología ha brindado la esperanza de producir productos biofarmacéuticos económicos. En cuanto a los factores de coagulación, esta prometía una oportunidad para proporcionar un tratamiento adecuado a una amplia variedad de hemofílicos. Desafortunadamente, esta promesa no se ha cumplido debido en gran parte a la complejidad inherente de las moléculas biológicas de origen natural y a una variedad de limitaciones asociadas con la síntesis de sus homólogos proteicos recombinantes en células manipuladas genéticamente.

La presente solicitud se dirige a la necesidad de un método para producir proteínas dependientes de vitamina K, tales como el Factor IX o el Factor VII/VIIa que han sido procesadas correctamente de modo que son activas y tienen un rendimiento suficiente para su producción comercial. Para aumentar la disponibilidad de proteínas de la coagulación sanguínea dependientes de vitamina K, para satisfacer la necesidad médica mundial de tratamiento de trastornos hemorrágicos tales como la hemofilia B, son necesarias unas mejoras en la producción de una proteína completamente funcional, el Factor IX en este ejemplo, a partir de células modificadas genéticamente. Específicamente, se necesita una identificación y complementación de las deficiencias en las actividades enzimáticas requeridas para obtener una modificación postraduccional esencialmente completa.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de mejorar la expresión, en particular la expresión recombinante de las proteínas dependientes de vitamina K en organismos hospedadores, que produzca una mejora de las tasas y/o las actividades secretoras de las proteínas dependientes de vitamina K expresadas.

La hipoexpresión recombinante de las proteínas gamma carboxiladas en el caso del Factor IX humano se observó que daba lugar a una limitación de la escisión del propéptido y una gamma carboxilación con mayores tasas de secreción, produciendo de este modo proteínas que solo están ocupadas parcialmente con residuos Gla, también cuando la vitamina K está disponible en exceso en el medio de cultivo. Esto conduce a la secreción de variantes de proteínas recombinantes dependientes de vitamina K, con actividades reducidas. La adición de vitamina K en el medio no mejoró la actividad del Factor IX a niveles de expresión elevados. Se observó que el requisito de vitamina K presente en el medio de cultivo celular para obtener Factor IX activo, alcanzaba la saturación en 5 µg/ml. Por debajo de este nivel, la cantidad secretada de Factor IX activo a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) era de-

pendiente de la concentración de vitamina K (Kaufman, R. J. et al. (1986), J. Biol. Chem., 261, 9622-9628).

La vitamina K y los análogos de la vitamina K comprenden un grupo de vitaminas lipófilas, hidrófobas que poseen una estructura común de 2-metil-1,4-naftoquinona, llamada menadiona.

5 Todos los miembros del grupo de vitaminas de la vitamina K comparten una estructura de anillo de naftoquinona metilada, y varían en la cadena lateral alifática fijada en la posición 3.

Las plantas y las cianobacterias, casi invariablemente, sintetizan solo una forma química llamada filoquinona (también conocida como vitamina K₁) que tiene la misma cadena lateral de fitilo que en la clorofila.

10 Las menaquinonas (también conocidas como vitaminas K₂) producidas normalmente por bacterias en el intestino, se diferencian de la filoquinona porque la cadena lateral 3 comprende, en su mayor parte, un polímero de unidades repetidas de prenilo en lugar de la cadena de fitilo. Para efectos de nomenclatura, las menaquinonas se clasifican de acuerdo con el número de unidades de prenilo, proporcionándose este número como un sufijo (es decir, menaquina-n, abreviada como Mk-n). Algunas de las unidades de prenilo también pueden estar saturadas lo que se indica por el prefijo dihidro, tetrahidro, y así sucesivamente y se abrevian como Mk-n(H2), Mk-n(H4), etc.

15 En general se acepta que la naftoquinona es el grupo funcional, de modo que el mecanismo de acción es similar para todos las vitaminas K.

También se ha observado en un sistema exento de células que la menadiona y la menadiona reducida son inactivas para favorecer la gamma carboxilación (Sadowski et al. (1976), J. Biol. Chem. Vol. 251, nº 9 págs. 2770-2776).

Además de añadir vitamina K al medio de cultivo celular, se han intentado otros medios para mejorar la expresión de la vitamina K funcional.

20 La hiperexpresión de la gamma-carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC), no ha dado lugar una secreción mejorada de proteínas en caso del Factor IX (Rehemtulla, A. et al. (1993) PNAS 90, 4611-4615).

Recientemente, algunos grupos mostraron que la coexpresión tanto de VKGC como de VKOR puede aumentar el nivel de expresión de proteínas dependientes de vitamina K funcionales (documentos WO 2005/030039, WO 2005/040367, WO 2006/089613, WO 2006/101474, WO 2007/065173 y WO 2007/075976).

25 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que complementando los medios para el cultivo celular de proteínas dependientes de vitamina K con uno o varios compuestos seleccionados a partir de una lista que comprende i) formas reducidas de la vitamina K y/o ii) formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o iii) formas reducidas de un precursor de la vitamina K, se puede aumentar significativamente el rendimiento de la expresión de la proteína dependiente de vitamina K activa, respectiva cuando se compara con el rendimiento de la expresión que se obtiene cuando se añade al medio de cultivo celular la misma cantidad de la forma no reducida de la vitamina K respectiva y/o del análogo de la vitamina K y/o del precursor de la vitamina K.

35 Una realización de la invención es el uso de una forma reducida de vitamina K y/o una forma reducida de una proteína análoga a la vitamina K, para mejorar el rendimiento de la expresión de una proteína funcional dependiente de vitamina K en células de mamífero.

Otras realizaciones de la invención se refieren a métodos para producir un producto proteico recombinante dependiente de vitamina K, biológicamente activo, que comprende utilizar una célula de mamífero con al menos un gen que codifica una proteína dependiente de vitamina K ligada funcionalmente a un promotor que expresa dicha proteína dependiente de vitamina K biológicamente activa, en un medio de cultivo celular que comprende al menos en algún momento durante el tiempo que dura la fase de expresión, una forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, y recoger el producto de la proteína dependiente de vitamina K. Opcionalmente, la línea celular de mamífero comprende además al menos un gen que codifica un factor de procesamiento ligado funcionalmente a al menos un promotor. En realizaciones preferidas, el producto de la proteína dependiente de vitamina K es el Factor II, Factor VII, Factor IX, Factor X, Proteína C o Proteína S. Más preferiblemente, la proteína dependiente de vitamina K es el Factor IX o el Factor VII.

45 En realizaciones preferidas, el factor de procesamiento es un ácido nucleico seleccionado a partir de la enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE), epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR), gamma-glutamyl carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) y combinaciones de las mismas ligadas funcionalmente a uno o varios promotores. Más preferiblemente, las proteínas del factor de procesamiento incluyen VKOR y VKGC. Preferiblemente, al menos uno de los genes se hiperexpresa.

50 Por consiguiente, la invención abarca el uso de uno o varios compuestos seleccionados a partir de una lista que comprende i) formas reducidas de la vitamina K y/o ii) formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o iii) formas reducidas de un precursor de la vitamina K, para la expresión de una o varias proteínas funcionales dependen-

tes de vitamina K en cultivo celular, así como procedimientos para la fermentación de células eucariotas que expresan una o varias proteínas dependientes de vitamina K, en donde uno o varios compuestos seleccionados a partir de una lista que comprende i) formas reducidas de la vitamina K y/o ii) formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o iii) formas reducidas de un precursor de la vitamina K, se añaden al medio de cultivo celular antes y/o durante el proceso de fermentación.

La invención también abarca el uso de formas reducidas de la vitamina K y/o un análogo de la vitamina K y/o un precursor de la vitamina K para mejorar la viabilidad de las células en fermentación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Carboxilación dependiente de vitamina K del precursor del factor IX

Figura 2: Fórmulas químicas de la vitamina K1, K2 y menadiona

Figura 3: Reducción del bisulfito sódico de menadiona

Figura 4: Gráfico del número total de células viables para el reactor A4 y B4 en el Experimento 2

Figura 5: Gráfico de la densidad celular viable de los cuatro reactores en el Experimento 3

Figura 6: Viabilidad de las células a lo largo del tiempo con una valoración creciente de BSM y BSMr

Figura 7: Datos de la densidad celular viable con una valoración creciente de BSM y BSMr

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Aunque las realizaciones descritas representan las realizaciones preferidas de la presente invención, se debe entender que los expertos en la técnica pueden realizar modificaciones sin apartarse de la esencia de la invención. Por consiguiente, el alcance de la invención se determinará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Las realizaciones preferidas de la invención se dirigen a la utilización de una forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, para aumentar el rendimiento de la expresión de una proteína funcional dependiente de vitamina K en cultivo celular. La forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K se añade al medio de cultivo celular en donde es absorbida por las células.

Se emplean preferentemente formas reducidas hidrosolubles de la vitamina K y/o formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o formas reducidas de un precursor de la vitamina K. Sin embargo por medio de endocitosis y/o receptores específicos también pueden ser absorbidas por las células, formas reducidas hidrosolubles de la vitamina K y/o formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o formas reducidas de un precursor de la vitamina K.

Una realización de la invención se dirige al uso de una forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, para la expresión de una proteína funcional dependiente de vitamina K en cultivo celular, en donde el rendimiento de la expresión de la proteína funcional dependiente de vitamina K respectiva, se incrementa en comparación con el rendimiento de la expresión que se obtiene cuando la misma cantidad de la misma forma, pero no reducida, de la vitamina K respectiva y/o del análogo de la vitamina K y/o del precursor de la vitamina K, se añade al medio del cultivo celular de la misma manera. Las realizaciones preferidas de la invención se refieren a métodos para mejorar el rendimiento de proteínas dependientes de vitamina K, biológicamente activas en células de mamífero. Preferiblemente las células están modificadas genéticamente.

Las realizaciones de la invención se describen con respecto a la producción de Factor IX y de Factor VII. Sin embargo, los métodos descritos son aplicables a todas las proteínas dependientes de vitamina K: los factores de coagulación sanguínea II (protrombina), VII, IX y X, las proteínas anticoagulantes C y S, y la proteína Z que se dirige al Factor X, así como la proteína Gla ósea osteocalcina, la proteína Gla de la matriz que inhibe la calcificación (MGP), la proteína del gen 6 específica de la detención del crecimiento (Gas6) que regula el crecimiento celular, y las cuatro proteínas Gla transmembranales (TMGPs).

En una realización preferida de la invención las proteínas dependientes de vitamina K se expresan en un medio de cultivo celular que comprende formas reducidas de la vitamina K y/o formas reducidas de análogos de la vitamina K y/o formas reducidas de precursores de la vitamina K en algún momento durante la fase de expresión.

La vitamina K y los análogos de la vitamina K comprenden un grupo de vitaminas lipófilas e hidrófobas que poseen una estructura común de 2-metil-1,4-naftoquinona, llamada menadiona.

Todos los miembros del grupo de vitaminas de la vitamina K comparten una estructura de anillo de naftoquinona metilado, y varían en la cadena lateral alifática fijada en la posición 3.

Las plantas y las cianobacterias, casi invariablemente, sintetizan solo una forma química llamada filoquinona (también conocida como vitamina K₁) que tiene la misma cadena lateral de fitilo que la clorofila.

5 Las menaquinonas (también conocidas como vitaminas K₂) producidas normalmente por bacterias en el intestino, se diferencian de la filoquinona porque la cadena lateral 3 comprende, en su mayor parte, un polímero de unidades repetidas de prenilo en lugar de la cadena de fitilo. Para efectos de nomenclatura, las menaquinonas se clasifican de acuerdo con el número de unidades de prenilo, proporcionándose este número como un sufijo (es decir, menaquina-n abreviada como MK-n), algunas de las unidades de prenilo también pueden estar saturadas lo que se indica por el prefijo dihidro, tetrahidro, y así sucesivamente y se abrevian como MK-n(H₂), MK-n(H₄), etc.

10 En general se acepta que la naftoquinona es el grupo funcional, de modo que el mecanismo de acción es similar para todos las vitaminas K.

La capacidad relativa de la filoquinona y de varias menaquinonas para actuar como cofactores de VKGC se midió en una preparación enzimática microsomal hepática, parcialmente purificada (Buitenhuis et al., *Biochim. Biophys Acta* (1990) 1034:170-175). La actividad de las menaquinonas variaba con la longitud de la cadena lateral 3 y disminuía a medida que aumentaba la longitud.

15 Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "vitamina K" comprende

a) vitamina K₁ (filoquinona, véase la Figura 2) incluyendo sus diversas sales tales como difosfato de vitamina K₁ (1,4-difosfato de 2-metil-3-fitol-1,4-naftohidroquinona), diacetato de vitamina K₁ (1,4-diacetato de 2-metil-3-fitol-1,4-naftohidroquinona) y disulfato de vitamina K₁: (1,4-disulfato de 2-metil-3-fitol-1,4-naftohidroquinona).

b) vitaminas K₂ (menaquinonas, véase la Figura 2) con números variables (n)

20 c) análogos de la vitamina K

d) precursores de la vitamina K tales como menadiona (véase la Figura 2), diacetato de menadiol (diacetato de 2-metil-1,4-naftohidroquinona), difosfato de menadiol (bis(dihidrógeno fosfato) de 2-metil-1,4-naftalendiol tetrasódico) hexahidrato, dibutirato de menadiol: (dibutirato de 2-metil-1,4-naftalendiol), disulfato de menadiol: sal disódica de bis(hidrógeno sulfato de 2-metil-1,4-naftalendiol), bisulfito de menadiona nicotinamida sal disódica de bis(hidrógeno sulfato de 2-metil-1,4-naftalendiol) y menadoxima: sal de amonio de ácido (3-metil-4-oxo-1(4H)-naftaleniliden)amino]oxi]-acético.

25 Tal y como se utiliza en esta memoria "análogo de la vitamina K" comprende cualquier otro compuesto químico, siempre y cuando el compuesto químico comprenda una estructura de anillo 2-metil-1,4-naftoquinona y pueda sustituir funcionalmente a la vitamina K₁ en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico en residuos Gla en proteínas dependientes de vitamina K.

30 Tal y como se usa en el presente documento "precursor de la vitamina K" comprende cualquier otro compuesto químico, que después de haber sido captado por una célula de mamífero puede ser transformado por dicha célula de mamífero a un compuesto químico que comprende una estructura de anillo naftoquinona metilado, y puede sustituir funcionalmente a la vitamina K₁ en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico a residuos Gla en las proteínas dependientes de vitamina K, por ejemplo, menadiona.

35 Tal y como se utiliza en esta memoria una "forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K" significa cualquier compuesto químico, incluyendo las formas hidroquinona de las diferentes formas de vitamina K, análogos de la vitamina K y precursores de la vitamina K, tal y como se han definido anteriormente, que se acepta sin necesidad de una etapa reductora adicional, como un cosustrato de VKGC en la reacción de carboxilación que transforma residuos de ácido glutámico en residuos Gla en las proteínas dependientes de vitamina K.

40 La forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, tiene que estar presente en el medio de cultivo celular en algún momento durante la fase de expresión de la proteína dependiente de vitamina K de interés. Se incluyen en la invención los métodos para expresar una proteína dependiente de vitamina K en donde el medio de cultivo celular comprende una sola forma reducida de la vitamina K o una sola forma reducida de un análogo de la vitamina K o una sola forma reducida de un precursor de la vitamina K o más de un miembro de cada una de estas clases de compuestos químicos, así como combinaciones de uno o varios miembros de cada clase de esas clases de compuestos químicos.

45 Una forma de reducir quinonas es mediante la acción de polvo de zinc y cloruro de zinc o polvo de zinc e iones de hidrógeno.

Se conoce que el ácido ascórbico a pH ácido, preferiblemente a un pH entre 2 y 4,5 (Isaacs et al. (1997) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, páginas 1465 a 1467) tiene una capacidad limitada para reducir quinonas.

Una realización de la presente invención es una nueva forma de producir BSMr mediante el uso de polvo de zinc en combinación con ácido ascórbico a un pH de aproximadamente 5,3 para la reducción del BSM con el zinc. El ácido

ascórbico actúa como una fuente de iones de hidrógeno y ayuda a mantener el BSMr en la forma reducida.

Otras realizaciones de la invención se refieren a métodos y procedimientos para la producción de un producto proteico recombinante dependiente de vitamina K biológicamente activo, que comprende utilizar una célula de mamífero con un gen que codifica la proteína dependiente de vitamina K ligada funcionalmente a un promotor que expresa dicha proteína dependiente de vitamina K, biológicamente activa en un medio de cultivo celular que comprende al menos, en algún momento durante la fase de expresión, una forma reducida de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de proteína precursora de la vitamina K, y recoger el producto de la proteína dependiente de vitamina K. Opcionalmente, además la línea celular comprende al menos un gen que codifica un factor de procesamiento ligado funcionalmente a al menos un promotor.

5 Tal y como se utiliza en esta memoria "funcional" significa que la proteína dependiente de vitamina K tiene preferiblemente al menos 10%, preferiblemente al menos 25% de actividad biológica de la proteína dependiente de vitamina K respectiva, cuando se aísla a partir del plasma. Por ejemplo, cuando se expresa el Factor IX, su funcionalidad se determina con referencia a un patrón de Factor IX obtenido a partir de plasma humano, tal como MONONINE® (CSL Behring). La actividad biológica del patrón de la proteína dependiente de vitamina K respectiva, se toma como el 100%. La proteína dependiente de vitamina K respectiva tiene preferiblemente al menos 10% de la actividad biológica del patrón de proteína dependiente de vitamina K respectiva. Preferiblemente, la proteína dependiente de vitamina K respectiva de acuerdo con realizaciones de la invención, tiene al menos 25% de la actividad biológica del patrón de proteína dependiente de vitamina K respectiva, más preferiblemente al menos 50% de la actividad biológica del patrón de proteína dependiente de vitamina K respectiva.

20 Otro aspecto de la invención es que mediante el uso de formas reducidas de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K en un método o un procedimiento de la invención, la relación entre la actividad específica de la proteína dependiente de vitamina K y el contenido en antígeno de la proteína dependiente de vitamina K, se incrementa preferiblemente al menos 15% o preferiblemente al menos 25%, o más preferiblemente al menos 50%, o incluso más preferiblemente al menos 75% o al menos 100%, en comparación con la relación entre la actividad específica de la proteína dependiente de vitamina K y el contenido en antígeno de la proteína dependiente de vitamina K de la misma proteína dependiente de vitamina K funcional que se obtiene cuando la misma cantidad de la misma forma, pero no reducida, de la vitamina K respectiva y/o del análogo de la vitamina K y/o del precursor de la vitamina K, se añade al medio de cultivo celular de la misma manera.

30 A modo de ejemplo no limitante, la proteína dependiente de vitamina K, Factor IX, expresada de acuerdo con la invención, en presencia de formas reducidas de la vitamina K y/o de una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o de una forma reducida de un precursor de la vitamina K, tiene al menos una relación entre actividad/antígeno de 0,7, o preferiblemente de al menos 1 o más preferiblemente de al menos 1,5 o incluso más preferiblemente de al menos 2.

35 Otro aspecto de la invención es que mediante el uso de formas reducidas de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K en un método o un procedimiento de la invención, la productividad de la actividad específica en densidad celular de la proteína dependiente de vitamina K se incrementa en al menos un 25% o preferiblemente en al menos un 50%, o más preferiblemente en al menos un 75%, en comparación con la productividad de la actividad específica en densidad celular de la misma proteína funcional dependiente de vitamina K que se obtiene cuando se añade la misma cantidad de la misma forma, pero no reducida, de vitamina K respectiva y/o del análogo de la vitamina K y/o del precursor de la vitamina K al medio de cultivo celular de la misma manera.

45 También a modo de ejemplo no limitante, la proteína Factor IX dependiente de vitamina K expresada de acuerdo con la invención, en presencia de formas reducidas de la vitamina K y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, tiene al menos una productividad de la actividad específica en densidad celular de 0,22 U/10⁶ células/día o preferiblemente al menos U/10⁶ células/día o al menos 0,37 U/10⁶ células/día.

50 En algunas realizaciones, la gamma carboxilación se incrementa mediante la sustitución de la secuencia de péptido natural por una secuencia de péptido que tiene una menor afinidad hacia la gamma-carboxilasa, tal y como se expone en el documento WO 00/54787, que se incorpora en esta memoria como referencia. Secuencias de péptidos útiles incluyen formas alteradas de secuencias de tipo silvestre o secuencias de péptido, o combinaciones de las mismas, para proteínas heterólogas dependientes de vitamina K. La secuencia de péptido en las proteínas dependientes de vitamina K es el elemento que reconoce la enzima que dirige la gamma carboxilación de la proteína. Las proteínas dependientes de vitamina K no son completamente funcionales a menos que comprendan un alto porcentaje de restos gamma carboxilados. Por lo tanto, es importante que al generar versiones recombinantes de estas proteínas, se pongan en marcha esos mecanismos para garantizar la gamma carboxilación completa de las mismas.

55 La alineación de secuencias de varias secuencias de péptido se muestra en la Fig. 3 del documento WO 00/54787. Por lo tanto, los péptidos que son útiles en la presente invención son aquellos que tienen las secuen-

5 cias mostradas en la Fig. 3, en la que se muestra una secuencia de 18 aminoácidos de varios propéptidos útiles junto con las afinidades relativas de estos propéptidos hacia la gamma-carboxilasa. Un propéptido de baja afinidad se puede generar mediante la modificación de uno cualquiera de los aminoácidos -9 o -13, tanto en la protrombina como en la proteína C. Las modificaciones preferidas incluyen la sustitución de un residuo Arg o His en la posición -9 y la sustitución de un residuo Pro o Ser en la posición -13. Otras proteínas quiméricas preferidas incluyen un propéptido seleccionado entre el grupo que consiste en Factor IX, Factor X, Factor VII, Proteína S, Proteína C y protrombina alterados, o un propéptido no alterado en combinación con la proteína madura dependiente de vitamina K que no es natural en relación con la secuencia de propéptido elegida.

10 La expresión "factor de procesamiento" es un término amplio que incluye cualquier proteína, péptido, cofactor no peptídico, sustrato o ácido nucleico que favorece la formación de una proteína funcional dependiente de vitamina K. Ejemplos de tales factores de procesamiento incluyen, pero no se limitan a PACE, VKOR y VKGC.

15 Tal y como se emplea en esta memoria, el término "PACE" es un acrónimo para enzima convertidora (o que corta) de aminoácidos básicos apareados. PACE, aislada originalmente a partir de una línea celular de hígado humano, es una endopeptidasa de tipo subtilisina, es decir, una enzima que corta el propéptido que muestra especificidad para escindir en los residuos básicos de una proteína, por ejemplo, -Lys-Arg-, -Arg-Arg o -Lys-Lys-. La coexpresión de PACE y una proproteína que requiere un procesamiento para la producción de la proteína madura da como resultado una expresión muy elevada de la proteína madura. Además, la coexpresión de PACE con proteínas que requieren una gamma carboxilación para la actividad biológica, permite la expresión con rendimientos incrementados de proteínas maduras funcionales, biológicamente activas en células eucariotas, preferiblemente de mamífero.

20 La epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) es importante para las proteínas dependientes de vitamina K porque la vitamina K se convierte en vitamina K epóxido durante las reacciones en las que es un cofactor. La cantidad de vitamina K en la dieta humana es limitada. Por lo tanto, la vitamina K epóxido debe ser convertida de nuevo a vitamina K a través de VKOR para evitar un agotamiento. En consecuencia, la cotransfección con VKOR proporciona suficiente vitamina K para un buen funcionamiento de las enzimas dependientes de vitamina K, tales como la gamma-glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKCG). El funcionamiento adecuado de VKCG dependiente de vitamina K es esencial para una gamma carboxilación adecuada del dominio Gla de los factores de coagulación dependientes de vitamina K.

30 La gamma-glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) es una enzima implicada en la modificación post-traduccional de proteínas dependientes de vitamina K. La VKGC incorpora grupos carboxi en ácido glutámico para modificar múltiples residuos dentro de la proteína dependiente de vitamina K, dentro de aproximadamente 40 residuos del propéptido. La secuencia de ADNc de la gamma-glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K humana, se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 5.268.275, que se incorpora en esta memoria como referencia.

35 Un vector es una estructura artificial de ADN con capacidad para replicarse en un hospedador, generalmente conferida por un origen de replicación y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. En esta memoria se emplean vectores, ya sea para amplificar el ADN que codifica las proteínas dependientes de vitamina K y/o para expresar ADN que codifica proteínas dependientes de vitamina K. Un vector de expresión es una estructura artificial de ADN replicable en la que una secuencia de ADN que codifica una proteína dependiente de vitamina K está ligada funcionalmente a secuencias de control adecuadas, capaces de efectuar la expresión de una proteína dependiente de vitamina K en un hospedador adecuado. La necesidad de tales secuencias de control variará dependiendo del hospedador seleccionado y del método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

45 Los vectores comprenden plásmidos, virus (por ejemplo, adenovirus, citomegalovirus), fagos y fragmentos de ADN que son capaces de integrarse en el genoma del hospedador mediante recombinación. El vector se replica y funciona independientemente del genoma del hospedador o, en algunos casos, se puede integrar en el propio genoma. Los vectores de expresión deben contener un promotor y sitios de unión a ARN que están ligados funcionalmente con el gen que se va a expresar y son funcionales en el organismo hospedador.

50 Las regiones de ADN están ligadas funcionalmente o asociadas de manera funcional cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, un promotor está ligado funcionalmente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está ligado funcionalmente a una secuencia codificante si está situado de manera que permita la traducción. Las células hospedadoras transformadas son células que han sido transformadas o transfectadas con uno o varios vectores que comprenden uno o varios genes que codifican uno o varios vectores de proteínas dependientes de vitamina K usando técnicas de ADN recombinante.

55 Las realizaciones de la invención se dirigen a proporcionar la célula con enzimas y cofactores necesarios para procesar proteínas dependientes de vitamina K, de manera que se consigan mayores rendimientos de proteínas biológicamente activas dependientes de vitamina K. Cuando una célula recombinante produce niveles adecuados de proteínas dependientes de vitamina K totalmente funcionales, se evitan etapas de purificación largas diseñadas para

eliminar del producto deseado la proteína dependiente de vitamina K inútil, parcialmente modificada o no modificada. Esto reduce el coste de la producción y elimina el material inactivo que puede tener efectos secundarios indeseables para el paciente.

5 En realizaciones preferidas, los métodos para la producción de proteínas dependientes de vitamina K mediante la coexpresión con PACE, VKGC y/o VKOR pueden incluir las siguientes técnicas. En primer lugar, un único vector que contiene secuencias que codifican más de una proteína tal como PACE y una proteína dependiente de vitamina K, se puede insertar en una célula hospedadora seleccionada. Alternativamente, dos o más vectores distintos que codifican una proteína dependiente de vitamina K además de una o varias proteínas distintas, se pueden insertar en un hospedador. Después de cultivar en condiciones adecuadas la célula hospedadora seleccionada, se producen dos o
10 más proteínas e interaccionan para proporcionar la escisión y la modificación de la proproteína para formar la proteína madura.

Otra alternativa es el uso de dos células hospedadoras transformadas, en donde una célula hospedadora expresa la proteína dependiente de vitamina K y la otra célula hospedadora expresa una o varias entre PACE, VKGC y/o VKOR que se secretarán en el medio. Estas células hospedadoras se pueden cocultivar en condiciones que permiten la expresión y la secreción o la liberación de la proteína recombinante dependiente de vitamina K y las proteínas re-combinantes coexpresadas, incluyendo la escisión en la forma madura mediante PACE extracelular y gamma carboxilación de glutamatos N-terminales. En este método, se prefiere que la proteína PACE carezca del dominio transmembranal de modo que se secrete en el medio.
15

En algunos casos, puede ser deseable tener una pluralidad de copias, dos o más, del gen que expresa la proteína dependiente de vitamina K en relación con los otros genes, o viceversa. Esto se puede lograr a través de varias maneras. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores o plásmidos distintos, en donde el vector que contiene el polinucleótido que codifica la proteína dependiente de vitamina K tiene un número de copias mayor que el vector que contiene las otras secuencias de polinucleótidos, o viceversa. En esta situación, sería deseable tener diferentes marcadores seleccionables en los dos plásmidos, a fin de garantizar el mantenimiento continuo de los plásmidos en el hospedador. Alternativamente, uno o ambos genes se podrían integrar en el genoma del hospedador, y uno de los genes podría estar asociado con un gen de amplificación, (por ejemplo, dhfr o uno de los genes de metalotioneína).
20

Alternativamente, se podrían emplear dos regiones reguladoras de la transcripción que tuvieran diferentes velocidades de iniciación de la transcripción, proporcionando un aumento de la expresión tanto de la proteína dependiente de vitamina K como de la expresión de cualquiera de las otras proteínas de factores de procesamiento, con respecto a la proteína dependiente de vitamina K. Como otra alternativa, se pueden utilizar diferentes promotores, en donde un promotor proporciona un bajo nivel de expresión constitutiva de la proteína dependiente de vitamina K, mientras que el segundo promotor proporciona un alto nivel de expresión o una expresión inducida de los demás productos. Se conoce una amplia variedad de promotores para las células hospedadoras seleccionadas, y un experto en la técnica los puede seleccionar fácilmente y emplear en la invención, tales como los promotores CMV, MMTV, SV 40 o SRa que son promotores de mamífero bien conocidos.
25

La producción de proteínas dependientes de vitamina K biológicamente activas, tales como el Factor IX o el Factor VII/VIIa, está opcionalmente maximizada por la hiperexpresión de una o varias entre PACE, VKOR y/o VKGC, y/o por modificación de la región Gla para maximizar la gamma carboxilación. Es decir, los componentes que limitan la velocidad se expresan en cantidad suficiente para que todo el sistema funcione para producir una cantidad comercialmente viable de proteína dependiente de vitamina K.
30

Las células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores tales como células de mamífero y células de insecto. Las células obtenidas a partir de organismos multicelulares son un anfitrión particularmente adecuado para la síntesis de proteínas recombinantes dependientes de vitamina K y se prefieren particularmente las células de mamífero. La propagación de tales células en un cultivo celular se ha convertido en un procedimiento de rutina (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, compiladores (1973)). Ejemplos de líneas de células hospedadoras útiles son las células VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y las líneas celulares WI138, HEK293, BHK, COS-7, Per.C6, HepG2, HeLa, Vero, COS, CV y MDCK. Una línea celular preferida es CHO-K1 o CHO-S.
35

Los vectores de expresión para tales células incluyen ordinariamente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor localizado aguas arriba del ADN que codifica la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K que se va a expresar y ligado funcionalmente con las mismas, junto con un sitio de unión al ribosoma, un sitio de corte y empalme de ARN (si se emplea ADN genómico que contienen intrones), un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción.
40

Se puede proporcionar un origen de replicación ya sea mediante construcción del vector para que incluya un origen exógeno, tal como puede ser un derivado de SV 40 o de otra fuente vírica (por ejemplo, polioma, adenovirus, VSV o BPV), o puede estar proporcionado por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula hospedadora. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula hospedadora, este último frecuentemente es suficiente.
45

En lugar de utilizar vectores que contienen orígenes de replicación víricos, se pueden transformar células de mamí-

fero mediante el método de cotransformación con un marcador seleccionable y el ADN de la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados son la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la timidina cinasa.

5 En general si se utilizan células distintas de las células de mamífero para la expresión de proteínas dependientes de vitamina K, puede ser necesario proporcionar también otros genes que codifican proteínas esenciales para las modificaciones postraduccionales requeridas para la función biológica de las proteínas de interés.

10 Los genes clonados de la presente invención pueden codificar cualquier especie de la que se obtienen, incluyendo ratón, rata, conejo, gato, cerdo y humano, pero preferiblemente codifican proteínas dependientes de vitamina K de origen humano. El ADN que codifica proteínas dependientes de vitamina K que se puede hibridar con ADN que codifica las proteínas descritas en este documento, también está incluido.

15 La hibridación de tales secuencias se puede llevar a cabo en condiciones con rigurosidad reducida o incluso condiciones rigurosas (por ejemplo, condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, 0,1% de SDS a 60°C o incluso 70°C, con ADN que codifica la proteína dependiente de vitamina K descrita en esta memoria, en un ensayo de hibridación *in situ* convencional. (Véase J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989 Cold Spring Harbor Laboratory)).

Los procedimientos contemplados para la expresión de proteínas dependientes de vitamina K en un cultivo celular son procedimientos de cultivo celular en suspensión de los que hay tres opciones principales: 1. procedimientos por perfusión y 2. procedimientos por lotes y 3. Procedimientos de extracción y llenado.

1. Procedimientos por perfusión:

20 En un procedimiento por perfusión de células en suspensión, las células se inoculan en un recipiente para cultivo por siembra que contiene medio de cultivo que carece preferiblemente de componentes derivados de animales y se propaga hasta que las células alcanzan una densidad mínima. Posteriormente, el cultivo propagado por siembra se transfiere a un recipiente para cultivo a gran escala que contiene medio de cultivo que carece de componentes derivados de animales y se propaga al menos hasta que se alcanza una densidad celular predeterminada.

25 En esta fase las células se cultivan en suspensión para permitir que el número de células dentro del recipiente del cultivo se incremente hasta un valor predeterminado o decisivo. El intercambio de medio se realiza mediante una perfusión continua del recipiente del cultivo con medio de nuevo aporte.

La cantidad de medio perfundido depende de la densidad celular y puede ser típicamente de 10-300%, preferiblemente de 10% a 95%, 25% a 80% del volumen del tanque por día (24 horas).

30 Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para el inicio de la fase de producción, 60-95% del medio del tanque en el tanque se cambia cada 24 horas, preferiblemente el 80%. Un intercambio de medio del 80% también se utiliza preferiblemente en la fase de producción.

En la fase de crecimiento, el cultivo se propaga hasta que las células alcanzan una cierta densidad. Cuando llegan a esta densidad, el cultivo entra en la fase de producción.

35 Los puntos de ajuste también se pueden cambiar en este momento y se fijan valores adecuados para la producción de la proteína dependiente de vitamina respectiva. La perfusión del medio se realiza preferiblemente de forma continua. El caudal del medio se puede expresar en términos de porcentaje del volumen de tanque del medio durante un periodo de tiempo definido. La perfusión del medio puede ser desde un volumen de tanque del 10-200% durante 10 a 48 horas; preferiblemente, la perfusión del medio es del 90% durante 10-48 horas, más preferiblemente del 80%
40 del volumen de tanque cada 24 horas.

La retención celular dentro del recipiente de cultivo se puede lograr usando una variedad de dispositivos para retención celular. Los siguientes equipos de aparatos se pueden usar para este proceso.

1. Cabeza de sedimentación externa.
2. Cabeza de sedimentación interna
- 45 3. Centrifuga continua
4. Filtro giratorio interno o externo.
5. Filtro externo o cartucho de fibra hueca.
6. Dispositivo de separación de células ultrasónico
7. Tramo de tubo en el interior del recipiente de cultivo.

50 **2. Procedimientos por lotes:**

2.1 Procedimiento por lotes simple:

En un procedimiento por lotes sencillo, las células se inoculan en un recipiente para el cultivo por siembra que contiene medio de cultivo que carece de componentes derivados de animales y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima. Posteriormente, el cultivo por siembra propagado se transfiere a un recipiente para cultivo a gran escala que contiene medio de cultivo que carece preferiblemente de componentes derivados de animales. El recipiente del cultivo procede a continuación hasta el agotamiento de los nutrientes en el medio.

El tiempo de la recogida se tiene que determinar. Un lote tradicional procede hasta que todos los nutrientes se agotan. Sin embargo, esto provoca típicamente una lisis celular que, o bien puede ser perjudicial para el producto o puede causar problemas en la purificación.

2.2 Procedimiento de alimentación por lotes:

Como se ha indicado previamente, un procedimiento por lotes simple consiste en inocular un recipiente de cultivo con células y dejar funcionar el tanque hasta el agotamiento de los nutrientes en el medio. Un procedimiento por lotes como éste se puede extender alimentando el tanque con una solución concentrada de nutrientes. Esto prolonga el tiempo del procedimiento y en última instancia, conduce a un aumento de la producción de proteína dependiente de vitamina K respectiva en el recipiente de cultivo.

Por lo general, el nutriente más decisivo en el recipiente de cultivo es la concentración de glucosa. El control y la iniciación de la alimentación se pueden conectar, por lo tanto, con el nivel de este nutriente. Cuando la concentración de glucosa cae por debajo de un valor decisivo, se inicia la alimentación y la cantidad de alimento añadido es suficiente para elevar la concentración de glucosa de nuevo a este valor decisivo.

Como en un procedimiento por lotes sencillo, el momento de la recogida se tiene que determinar como un equilibrio entre el funcionamiento del tanque durante el mayor tiempo posible y el riesgo de lisis celular y una disminución en la calidad del producto.

El método de adición de la alimentación es también una variable. La alimentación se puede añadir ya sea como un pulso único (una vez, dos veces, tres veces, etc., un día) o se puede alimentar gradualmente a lo largo de un período de 24 horas. El tiempo de la recogida se tiene que determinar. Un lote tradicional o simple, procede hasta que todos los nutrientes se agotan. Sin embargo, el procedimiento no se puede mantener indefinidamente debido a la acumulación de metabolitos tóxicos. Esto conduce a una disminución de la viabilidad celular y en última instancia, a una lisis celular. Esto puede causar daños en el producto o causar problemas en la posterior purificación.

3. Procedimientos de extracción y llenado:

Un procedimiento de extracción y llenado sencillo se asemeja mucho a una fermentación por lotes repetida. En la fermentación por lotes, las células crecen en el recipiente de cultivo y el medio se recoge al final de la serie. En un procedimiento de extracción y llenado, el recipiente de cultivo se recoge antes de que cualquiera de los nutrientes se agote. En lugar de eliminar todo el contenido del recipiente, solo se retira una proporción del volumen del tanque (típicamente el 80% del volumen del tanque).

Después de la recogida, se vuelve a añadir el mismo volumen de medio de nuevo aporte en el recipiente. A continuación, se permite que las células crezcan en el recipiente una vez más y se realiza otra recogida del 80% después de un número determinado de días. En los procedimientos por lotes repetidos, las células que se dejan en el recipiente después de una recogida, se pueden usar como inóculo para el siguiente lote.

El procedimiento puede funcionar en dos fases, en donde una primera fase funciona de forma idéntica a un procedimiento por lotes sencillo. Después de la primera recogida, el recipiente del cultivo se utiliza de nuevo para un procedimiento por lotes sencillo; sin embargo, la duración del lote es más corta que la del primer lote debido a la mayor densidad celular inicial. Estas "fases por lotes repetidas" cortas pueden continuar indefinidamente.

El recipiente del cultivo puede funcionar dentro de una amplia gama de tiempos de duración de los ciclos y una amplia gama de volúmenes de extracción y llenado.

En la puesta en práctica de la presente invención, las células que se cultivan son preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente una línea celular de mamífero establecida, incluyendo sin limitación, líneas celulares CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), de riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham et al, J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977).

Una línea celular CHO preferida es la línea celular CHO K1 disponible en la ATCC. Otra línea celular CHO preferida es la línea celular CHO-S disponible en Invitrogen.

Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); células DUKX (línea celular CHO) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980) (las células DUKX también se conocen como células DXB11) y DG44 (línea de células CHO) (Cell, 33:

- 405,1983, y Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555,1986). También son útiles las células 3T3, las células Namalwa, los mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En algunas realizaciones, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tales como, por ejemplo, células que expresan un espectro cualitativa o cuantitativamente diferente de enzimas que catalizan una modificación postraduccional de las proteínas (por ejemplo, enzimas de glicosilación tales como glicosil transferasas y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como propéptidos) distintas del tipo celular a partir del cual se habían obtenido.
- En algunas realizaciones, las células usadas en la puesta en práctica de la invención son capaces de crecer en cultivos en suspensión. Tal y como se emplea en la presente memoria, las células competentes en suspensión son las que pueden crecer en suspensión sin formar grandes agregados sólidos, es decir, células que se monodispersan o que crecen en agregados sueltos, con solo unas pocas células por agregado. Las células competentes en suspensión incluyen, sin limitación, células que crecen en suspensión sin una adaptación o manipulación (tales como, por ejemplo, células hematopoyéticas o células linfoides) y células que se han vuelto competentes en suspensión mediante una adaptación gradual de células dependientes de fijación (tales como, por ejemplo, células epiteliales o fibroblastos) al crecimiento en suspensión.
- En algunas realizaciones, las células empleadas en la puesta en práctica de la invención son células de adhesión (también conocidas como células dependientes de anclaje o dependientes de fijación). Tal y como se usa en el presente documento, las células de adhesión son aquellas que necesitan adherirse o anclarse a una superficie adecuada para la propagación y el crecimiento. La fermentación a base de un microvehículo es un ejemplo de tal realización.
- La presente invención incluye el cultivo de células de mamífero en medios que carecen preferentemente de componentes derivados de animales. Tal y como se usa en el presente documento, componentes "derivados de animales" son cualquier componente que es producido en un animal intacto (tales como, por ejemplo, proteínas aisladas y purificadas a partir del suero) o son componentes producidos mediante el uso de componentes producidos en un animal intacto (tales como, por ejemplo, un aminoácido preparado empleando una enzima aislada y purificada a partir de un animal para hidrolizar un material de origen vegetal). Por el contrario, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene origen genómico en un animal) pero que es producida *in vitro* en un cultivo celular (tal como, por ejemplo, en una levadura recombinante o en una célula bacteriana o en una línea celular de mamífero establecida de forma continua, recombinante o no), en medios que carecen de componentes que son producidos en un animal, y que se aísla y se purifica a partir de un animal intacto, no es un componente "derivado de un animal" (tal como, por ejemplo, insulina producida en una levadura o una célula bacteriana, o insulina producida en una línea celular de mamífero establecida, tal como, por ejemplo, células CHO, BHK o HEK, o interferón producido en células Namalwa). Por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene un origen genómico en un animal) pero que es producida en una célula recombinante en un medio que carece de componentes derivados de animales (tal como, por ejemplo, insulina producida en una levadura o una célula bacteriana) no es un componente "derivado de un animal". Por consiguiente, un medio de cultivo celular que carece de componentes derivados de animales, es uno que puede contener proteínas animales que son producidas de forma recombinante; tal medio, sin embargo, no contiene, por ejemplo, suero animal o proteínas u otros productos purificados a partir de suero animal. Un medio de este tipo puede contener, por ejemplo, uno o varios componentes derivados de plantas.
- Cualquier medio de cultivo celular que carece de componentes derivados de animales que apoya el crecimiento y el mantenimiento celular en las condiciones de la invención, se puede utilizar. Típicamente, el medio contiene agua, un regulador de la osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o varios factores de crecimiento sintéticos o recombinantes, vitaminas y cofactores. Los medios que carecen de componentes y/o proteínas de origen animal están disponibles en proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, SAFC, Invitrogen y Gibco.
- Los recipientes para el cultivo pueden ser, por ejemplo, reactores de tanque agitado convencionales (CSTR) en donde la agitación se obtiene por medio de tipos de impulsores convencionales o reactores con ventilación en donde la agitación se obtiene introduciendo aire desde el fondo del recipiente. Entre los parámetros que se controlan dentro de límites especificados están el pH, la tensión de oxígeno disuelto (DOT) y la temperatura. El pH se puede controlar, por ejemplo, variando la concentración de CO₂ en el gas del espacio libre y/o en el burbujeador y mediante la adición de una base al líquido del cultivo, cuando se requiera.
- La tensión de oxígeno disuelto se puede mantener, por ejemplo, mediante burbujeo con aire u oxígeno puro o mezclas de los mismos. El medio de control de la temperatura es agua, calentada o enfriada, según sea necesario. El agua se puede hacer pasar a través de una envoltura que rodea el recipiente o a través de una bobina de tubo sumergida en el cultivo.
- Una vez que se ha retirado el medio del recipiente de cultivo, se puede someter a una o varias etapas de procesamiento para obtener la proteína deseada, incluyendo, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), o extracción y similares. Véase, en general, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden Janson, compiladores, VCH Publishers, Nueva

York, 1989.

El cultivo puede llevarse a cabo en cualquier recipiente de fermentación adecuado, con un medio de crecimiento y en condiciones apropiadas para la expresión de la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K a través de la célula hospedadora particular, elegida tal y como se ha descrito anteriormente. En algún momento durante la fase de expresión de la proteína deseada dependiente de vitamina K de interés, una forma reducida de la vitamina K, y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K, está comprendida en el medio de cultivo celular. Preferiblemente dicha forma reducida de vitamina K, y/o una forma reducida de un análogo de la vitamina K y/o una forma reducida de un precursor de la vitamina K está presente durante todo el crecimiento y la fase de expresión. En realizaciones preferidas, la proteína dependiente de vitamina K se puede recoger directamente del medio de cultivo, o de las células hospedadoras lisadas y la proteína dependiente de vitamina K se recoge a partir de las mismas. En realizaciones preferidas, la proteína dependiente de vitamina K se puede purificar a continuación, adicionalmente de acuerdo con técnicas conocidas.

La proteína recombinante dependiente de vitamina K que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar a través de una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias en tamaño, carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad específica, etc., entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

Como proposición general, la pureza de la proteína recombinante producida de acuerdo con la presente invención será preferiblemente una pureza apropiada conocida por el trabajador experto en la técnica, para dirigir la actividad y la estabilidad óptimas de la proteína. Por ejemplo, cuando la proteína recombinante es el Factor IX, el Factor IX tiene preferiblemente una pureza muy elevada.

Preferiblemente, la proteína recombinante ha sido sometida a múltiples etapas de purificación cromatográfica, tal como cromatografía de afinidad, cromatografía por intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía de colorante, cromatografía en hidroxapatito, cromatografía de exclusión por tamaño y, preferiblemente, cromatografía por inmunoafinidad para concentrar la proteína deseada y eliminar las sustancias que causan la fragmentación, la activación y/o la degradación de la proteína recombinante durante la preparación, el almacenamiento y/o el uso. Ejemplos ilustrativos de tales sustancias que se eliminan preferentemente mediante purificación, incluyen otros contaminantes proteicos, tales como enzimas de modificación como PACE/furina, VKOR y VKGC; proteínas, tales como proteínas de las células hospedadoras que se liberan en el medio de cultivo tisular desde las células productoras durante la producción de proteína recombinante; contaminantes no proteicos, tales como lípidos; y mezclas contaminantes proteicos y no proteicos, tales como lipoproteínas. Los procedimientos de purificación para las proteínas dependientes de vitamina K son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase el documento de Patente de EE.UU. n° 5.714.583, que se incorpora en esta memoria como referencia.

Con el fin de minimizar el riesgo teórico de contaminaciones con virus, se pueden incluir etapas adicionales en el procedimiento que permiten la inactivación o la eliminación eficaz de virus. Tales etapas son, por ejemplo, el tratamiento térmico en estado líquido o sólido, el tratamiento con disolventes y/o detergentes, la radiación en el espectro visible o UV, la radiación gamma o la nanofiltración.

Secuencias de genes para FIX y para otros factores de coagulación dependientes de vitamina K son conocidas y están disponibles, por ejemplo, Factor II (n° de orden NM_000506), Factor VII (n° de orden NMJH9616), FIX (n° de orden NM_000133) y Factor X (n° de orden NM_000504).

La proteína dependiente de vitamina K tal y como se describe en esta invención se puede formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles, convencionales a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante proteica de la invención se puede formular en forma líquida o liofilizada estable. La variante proteica se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se administran al individuo a través de cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden usar para administrar la composición a través de cualquier vía conveniente. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para el uso sistémico, las proteínas de inserción de la invención se formulan para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. Las rutas de administración más preferidas son la administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones se pueden

administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

Las proteínas de inserción de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, evitando o disminuyendo la gravedad o la propagación del trastorno o la indicación que se está tratando, sin llegar a una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, la formulación, el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo agente farmacéutico.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clonación de la estructura artificial del Factor IX

El ADNc del Factor de coagulación IX humano se clonó en 5' en marco con el ADNc de albúmina humana, estando los dos ADNc separados por una secuencia enlazadora obtenida a partir de FIX. Esta secuencia enlazadora entre FIX y albúmina se obtuvo a partir de una secuencia de FIX endógena implicada en la activación de FIX, permitiendo de este modo la escisión de la proteína de fusión con las mismas enzimas (FXIa o FVIIa/TF) que activan FIX.

La secuencia de FIX utilizaba treonina en la posición 148, el fenotipo más prevalente en el sitio de un polimorfismo conocido Ala/Thr, e incluía una mutación P-3V para mejorar la escisión del propéptido (no presente en el producto secretado). El péptido señal de albúmina reemplazó al de FIX y la secuencia de ADNc resultante se mejoró con respecto a los codones para una expresión eficaz en células de mamífero. La secuencia que codificaba la proteína estaba flanqueada por un sitio de restricción HindIII y una secuencia de consenso Kozac en el extremo 5' y un sitio de restricción EcoRI en el extremo 3'. El nucleótido es SEQ ID NO: 1 [1-60 pb secuencia señal, 61-123 pb propéptido), FIX (124-1368 pb), enlazador (1369-1422 pb), albúmina (1423-3180 pb)], y las secuencias de aminoácidos de la proteína rIX-FP resultante son SEQ ID NO: 2 [secuencia de FIX (aa 1-415), secuencia enlazadora (aa 416-433); secuencia de albúmina (aa 434-1018)].

La secuencia de rIX-FP se clonó en el vector de expresión GSTM de Lonza, pEE12.4 y un ADNc de serina proteasa de PACE/Furina humana se clonó en el vector de expresión de GSTM de Lonza, pEE6.4. PACE/Furina es necesaria para una escisión eficaz de la secuencia del propéptido en líneas celulares con expresión elevada. Tanto el ADNc de rIX-FP como de PACE/Furina, bajo el control de promotores CMV individuales, se combinaron para generar una estructura artificial génica doble final.

Ejemplo 2: Transfección y selección de los clones A2 y A5

La estructura artificial rIX-FP-PACE/Furina se sometió a electroporación en células CHOK1SV y se seleccionaron colonias en placas de 96 pocillos utilizando medio comercial exento de glutamina. Las colonias resultantes se seleccionaron en busca de expresión y actividad de FIX y dos clones (A2 y A5) con los perfiles de expresión/actividad deseados se escogieron para un desarrollo adicional.

Ejemplo 3: Preparación de bisulfito de menadiona reducido (BSMr)

El procedimiento implica la reducción *in situ* de bisulfito sódico de menadiona (BSM) utilizando una solución acuosa de ácido ascórbico y la adición catalítica de polvo de zinc. La mezcla de reacción filtrada resultante contiene BSM y los dos productos isoméricos correspondientes de la reducción (que se muestran en la Figura 3 como n° 2 y n° 3, la vitamina K reducida), en presencia de ácido ascórbico y trazas de Zn. Esta mezcla filtrada se utiliza como la mezcla del producto final.

El ácido ascórbico (12,75 g) se disolvió en agua desgasificada Milli Q (100 ml) en un cilindro de medición de 200 ml con un tapón ajustado.

El bisulfito sódico de menadiona (10,00 g) se disolvió en agua Milli Q desgasificada (50 ml) en un vaso de precipitados de 100 ml y se añadió a la solución de ácido ascórbico. El vaso de precipitados se enjuagó dos veces con 2 x 20 ml de agua Milli Q desgasificada en el cilindro de medición de 200 ml. La solución resultante de ácido ascórbico/bisulfito sódico de menadiona se rellenó hasta 200 ml con agua Milli Q desgasificada y se mezcló invirtiendo el recipiente de reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El zinc activado se preparó de acuerdo con los libros de texto de Practical Organic Chemistry; Arthur Israel Vogel, A.R. Tatchell, B.S. Furnis. [año, editor]. Brevemente, a 40 g de polvo de zinc en un tubo de polipropileno de 50 ml, se añadieron 15 ml de ácido clorhídrico al 10% v/v. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 2 minutos. La mezcla se transfirió a un vaso de precipitados de Pyrex de 500 ml y se lavó varias veces con agua Milli Q. Esto también implicó una elutriación copiosa con agua Milli Q para eliminar los finos. El zinc activado lavado se suspendió en agua Milli Q y se transfirió a un aparato de filtrado en el que estaba atrapado en una membrana GV de 0,45 µm de Dura-

pore[®]. El zinc se lavó varias veces con 50 mL de acetonitrilo de calidad para HPLC antes de secar en un evaporador giratorio a 60°C durante 1,5 horas. El zinc activado seco se almacenó en un matraz de Pyrex en atmósfera de argón.

El polvo de zinc activado (4,73 g) se añadió a la solución de ácido ascórbico/bisulfito sódico de menadiona y se mezcló por inversión suave y continua del cilindro de medición durante 25-30 minutos.

- 5 Una vez completada, la solución se filtró a vacío a través de una membrana GV de 0,22 µm de Durapore[®]. El material filtrado se transfirió a continuación a un matraz estéril, se purgó con argón, se cubrió con papel de aluminio para protegerlo de la luz y se almacenó a -70°C. Este material filtrado se añadió a los biorreactores.

10 El BSM reducido se espera que sea, hasta cierto punto, inestable. Por lo tanto la concentración real de BSMr cuando se añade al biorreactor podría ser algo inferior a la concentración indicada (véanse los datos analíticos a continuación). Por lo tanto, tal como se utiliza en la presente invención, una concentración indicada de BSMr debe entenderse como una concentración nominal que se corresponde a la concentración real de BSM utilizado para generar BSMr tal y como se detalla en el Ejemplo 3

Ensayo de BSM reducido

- 15 El BSM reducido se sometió a ensayo mediante HPLC de fase inversa acoplada a espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS).

La separación mediante HPLC se logró utilizando una columna (4,0 x 75 mm) Supersher RP-Select B de Merck con tampón de acetato de amonio 10 mM como Tampón A y 95% de acetonitrilo, acetato de amonio 10 mM como Tampón B.

Se utilizó el siguiente gradiente.

Tiempo (min)	% de Tampón A	% de Tampón B
0,0	95	5
8,0	85	15
8,1	95	5
15,0	95	5

- 20 El bisulfito sódico de menadiona (Sigma, lote 087K0737, 97% por C de A) se utilizó para preparar los patrones.

El espectrómetro de masas Waters Q-ToF II se utilizó en modo de iones negativos y se extrajeron cromatogramas iónicos en m/z de 253 para que el bisulfito de menadiona se integrara y se utilizó para trazar una curva de calibración de cinco puntos ajustada a un polinomio de segundo orden (no obligado por el cero).

- 25 Los cromatogramas iónicos extraídos de bisulfito de menadiona reducido en m/z 255, se integraron y se usaron para calcular la concentración de bisulfito de menadiona reducido frente a la curva de calibración obtenida con el BSM patrón.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla (50 mg/ml de concentración nominal de BSMr).

Número de Lote	BSM red. (mg/mL)
CSL 080508	47,7
CSL 211008	47,9
Epichem 1	49,9

30 Ejemplo 4

Una línea celular CHO que expresaba la proteína de fusión recombinante de Factor IX con albúmina humana se generó tal y como se ha detallado en los Ejemplos 1 y 2. Para investigar un método para aumentar la expresión de la molécula activa, se realizaron una serie de experimentos para determinar el efecto de la adición de bisulfito sódico de menadiona (BSM) y BSM reducido (BSMr) a los cultivos. El objetivo de esta investigación era identificar si cualquiera de las adiciones de BSM o BSMr era capaz de incrementar la expresión de molécula activa o de disminuir la cantidad de material antigénico expresado. La actividad de la molécula se evaluó mediante un kit de ensayo específico de factor IX, suponiendo que un aumento de la actividad sería debido a un incremento de la gamma carboxilación de los residuos de ácido glutámico en la molécula, impulsada por la disponibilidad de vitamina K3.

40 El medio utilizado en todos los casos para la propagación de las células y durante las evaluaciones de la productividad era un medio definido químicamente, denominado en esta memoria Medio A, tal y como se detalla a continua-

ción. En casos en los que se utilizaron otros tipos de medios para fines comparativos, estos se describen en el texto. Los parámetros clave medidos durante esta investigación eran la expresión antigénica de factor IX recombinante fusionado con albúmina humana (rIX-FP), la actividad de FIX resultante de esta expresión y el crecimiento celular medido como la densidad de células viables. Los detalles de la medición de estos resultados celulares clave se describen a continuación.

5

Métodos y materiales:

Composición del medio

10

El medio utilizado para la propagación era un medio exento de suero obtenible comercialmente, definido químicamente, diseñado específicamente para la producción de proteínas recombinantes en células CHO: "Medio A". Los clones utilizaron el sistema de glutamina sintetasa de Lonza (GS) y se sometieron a pases en ausencia de glutamina con una selección mantenida con metionina sulfoximina (MSX) 25 µM. En la última etapa del cultivo, utilizada para la medición de la productividad, no se añadieron al medio ni glutamina ni MSX.

Adiciones de bolo

15

Se hicieron adiciones de bolo de 100 g/l de glucosa al cultivo cuando las concentraciones de glucosa alcanzaron un límite inferior de 2 g/l, una vez que se llegó a la concentración límite inferior, se indujo una alimentación para aumentar la concentración media residual hasta una cantidad superior a 4 g/l.

20

La vitamina K es esencial en la célula para la producción de Factor IX recombinante activo, debido a la gamma carboxilación de la molécula dependiente de vitamina K. En experimentos que describen la presente invención, la vitamina K3 en forma de bisulfato sódico de menadiona (BSM, Sigma) fue elegida como fuente de vitamina K, ya que esta forma es soluble en agua y por lo tanto accesible para la célula. La adición de BSM se produjo diariamente a una concentración de 50 ng/ml.

25

El BSM reducido (BSMr) se preparó tal y como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3. El BSMr se almacenó a -70°C y se descongeló inmediatamente antes de su uso. Debido a la naturaleza inestable inherente del BSM reducido, la cuantificación de concentraciones exactas de BSM reducido no estaba disponible en el momento de la experimentación. Por lo tanto todas las concentraciones indicadas de BSM reducido son valores calculados obtenidos a partir de la concentración de partida de BSM al comienzo del proceso de reducción. Se prevé que la concentración real de BSM reducido sea menor que la cantidad calculada debido a algunas pequeñas pérdidas que se producen por el proceso de reducción.

Parámetros de la fermentación.

30

Los reactores eran reactores de vidrio con fondo cóncavo Sartorius/Braun de 5 L, con un solo impulsor Rushton para la agitación y un rociador de anillo. Todos los cultivos del reactor se llevaron a cabo con las siguientes condiciones, a menos que se indique lo contrario.

Volumen: A partir de 4 litros de contenido total (3,2 litros de medio y 0,8 litros de inóculo);

Temperatura: 37°C, desde la inoculación hasta la recogida;

35

Aireación: Aire en el espacio de cabeza a 0,0375 volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto vvm durante el proceso, se roció como respuesta al valor de referencia de oxígeno disuelto (O. D.) a una velocidad máxima de 0,025 vvm;

O. D.: Valor de referencia de 40% de saturación;

Oxígeno: Rociado en respuesta al valor de referencia O. D. con un caudal máximo de 0,075 vvm;

40

Agitación: A una velocidad constante de 100 rpm;

pH: Valor de referencia aislado de 7,00 ± 0,05;

Base: NaOH 2 M;

Ácido: 100% de CO₂;

Inóculo: A partir de una densidad celular de 3 x 10⁵ - 5 x 10⁵ células/mL

45

Ensayos de cultivos celulares:

Los recuentos de células se realizaron utilizando el contador de células automatizado de Innovartix Cedex de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron ensayos con glucosa, lactato, amoníaco y glutamina utilizando el analizador 7100 de Yellow Springs Instruments (YSI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La determinación sin conexión de las concentraciones de dióxido de carbono disuelto se realizó utilizando el analizador de ga-

ses en sangre Rapidlab 248 de Siemens (anteriormente Bayer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo de antígenos se realizó usando un procedimiento interno de ELISA para la cuantificación del antígeno del Factor IX. El ensayo de la actividad del Factor IX se realizó utilizando la prueba cromogénica de FIX "BIOPHEN FIX". El muestreo se realizó diariamente desde el momento de inoculación para todos los ensayos.

5 Ensayo de productividad en matraz

El ensayo de productividad en matraz se realizó tal y como se describe a continuación.

Se utilizó una línea celular CHO-S que expresaba rIX-FP y se cultivó en un medio alternativo definido químicamente, exento de suero, obtenible comercialmente, diseñado específicamente para la producción de proteínas recombinantes en células CHO ("Medio B") con L-glutamina 8 mM. En el pase N-1 y N (en donde N es el último número de pases) se añadieron 50 ng/ml de BSM. Otra adición se realizó 48 horas después de la inoculación. Los cultivos se inocularon con 2×10^5 células viables/ml en un volumen de 30 ml en un matraz de agitación de 125 ml, se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂, 125 rpm en una incubadora humidificada (Multitron, Infors HT). Las muestras se sometieron a ensayo para determinar la densidad celular, la viabilidad celular, la actividad de rIX-FP y el contenido en antígeno.

RESULTADOS:

15 **Experimento 1: Comparación de la expresión de FIX en matraces de agitación**

El experimento 1 se realizó para evaluar el efecto de BSM reducido sobre el rendimiento del cultivo en comparación con adiciones de BSM en un formato de matraz. Un resumen de las condiciones del ensayo investigadas en este experimento se presenta en la Tabla 1. Las células se sometieron al ensayo de productividad en matraz convencional, y se realizaron ensayos para analizar la densidad celular, el antígeno del Factor IX y la actividad del Factor IX. Un resumen de los resultados obtenidos a partir de este ensayo de la productividad en matraz se presenta en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Tabla 1: Condiciones del ensayo en matraz utilizadas en el Experimento 1

BSM reducido o no reducido	Número de adiciones	Número de matraz
No reducido	1	C1.0
No reducido	1	C1.1
No reducido	2	C2.0
No reducido	2	C2.1
Reducido	1	D1.0
Reducido	1	D1.1
Reducido	2	D2.0
Reducido	2	D2.1

Los resultados de la actividad durante 72 horas y 96 horas se presentan a continuación. Se muestran unos resultados muy similares obtenidos a las 72 h para todas las condiciones del ensayo. Hay un ligero aumento de la actividad, obtenido en las dos adiciones de BSM, y todos los resultados utilizando BSM reducido son ligeramente más elevados que las adiciones de BSM no reducido. Curiosamente, no hay un aumento con dos adiciones para la condición de BSM reducido. Sin embargo, la interpretación de los resultados a las 72 horas está limitada, debido al bajo número de replicados y a las pequeñas diferencias en los resultados de la actividad entre las condiciones.

Un aumento más definido de la actividad resultante se obtuvo para la muestra a las 96 h. En este caso la condición de BSM reducido proporcionó resultados con actividades superiores a las obtenidas con la adición de BSM. Todos los valores registrados son medias de matraces por duplicado.

Tabla 2: Resultados experimentales de la productividad de los matraces durante 72 horas

Condición experimental	Matraces	Actividad	Antígeno	Relación
Adición simple de BSM	C1.0, C1.1	357,5	625,5	0,57
Adición doble de BSM	C2.0, C2.1	431,5	451,5	0,96
Adición simple de BSM reducido	D1.0, D1.1	500	516	0,97
Adición doble de BSM reducido	D2.0, D2.1	477	514,5	0,93

Tabla 3: Resultados experimentales de la productividad de los matraces durante 96 horas

Condición experimental	Matraces	Actividad	Antígeno	Relación
Adición simple de BSM	C1.0, C1.1	629,5	2573	0,24
Adición doble de BSM	C2.0, C2.1	649	1155,5	0,56
Adición simple de BSM reducido	D1.0, D1.1	1070,5	1249	0,86
Adición doble de BSM reducido	D2.0, D2.1	902	1271	0,71

5 De los resultados presentados en la Tabla 2 y 3, se observó un efecto positivo sobre la producción de FIX activo y un aumento en la molécula de FIX activo en proporción con el antígeno de FIX (Relación) con la adición de BSM reducido en comparación con la adición de BSM.

Los resultados preliminares obtenidos a partir de la productividad en el matraz indicaban que puede haber diferencias en la secreción de la molécula activa en la célula debido a la presencia de una forma reducida de BSM. Para someter a ensayo los efectos de BSM reducido sobre la producción de rIX-FP en células CHO, se realizaron experimentos basados en reactores.

10 **Experimento 2: Comparación de la expresión de FIX en condiciones de alimentación por lotes**

En condiciones de reactor con alimentación por lotes, un clon de rIX-FP CHO-K1 se cultivó en condiciones estándar. Este experimento evaluaba el crecimiento celular, la producción de antígeno y la producción de rIX-FP activo a partir de la célula tanto con adición de BSM como de BSM reducido. La alimentación utilizada en este experimento se basaba en glucosa (100 g/l) complementada con los aminoácidos siguientes:

- 15 ↳ Asparagina a 21,4 g/l;
- ↳ Cisteína a 5,6 g/l;
- ↳ Ácido aspártico a 5 g/l.

Las condiciones del ensayo en reactor eran Reactor A4 utilizando una adición de BSM no reducido y Reactor B4 utilizando una adición de BSM reducido. En ambos reactores se utilizó Medio A tal y como se describe en el Ejemplo 4.

20 Los resultados del crecimiento celular obtenidos a partir del cultivo se muestran en la Figura 4.

Los datos anteriores muestran que las densidades de células viables con las dos condiciones (BSM reducido y no reducido) obtuvieron perfiles de crecimiento muy similares y densidades celulares máximas. Con estas dos condiciones, la única diferencia era la comparación prevista entre BSM reducido y no reducido. Los resultados del ensayo del antígeno, molécula activa y la relación correspondiente se presentan en la Tabla 4. Una relación superior a uno de molécula activa frente a antígeno es posible ya que cada una de las UI se mide frente a diferentes referencias normalizadas para plasma.

Tabla 4: Comparación de la actividad total y el antígeno producido en el reactor A4 y BSM y en el reactor B4 con BSM reducido (datos obtenidos para ambos reactores hasta 192 horas después de la inoculación).

Parámetro	Reactor A4 con BSM	Reactor B4 con BSMr
Volumen aproximado (L)	4	4
Actividad (U)	22357	35444
Antígeno (U)	49479	38197
Relación	0,45	0,93

30 La relación más alta producida en este caso con las condiciones de adición de BSM reducido era debida a un aumento de la molécula producida de FIX activo, y una disminución en el nivel producido de antígeno de FIX en comparación con la condición de adición de BSM.

Experimento 3: Comparación de la expresión de FIX en condiciones extendidas de extracción y llenado

35 El clon A5 de CHO-K1 se cultivó en condiciones extendidas de extracción y llenado con dos medios, Medio A y aún otro medio comercialmente obtenible, exento de suero, definido químicamente, diseñado específicamente para la producción de proteínas recombinantes en células CHO: Medio C. Al comparar la capacidad de los medios, se evaluó el efecto de la adición de BSM o de BSM reducido (Tabla 5). Al igual que con los experimentos previos, los resul-

tados de esta investigación eran parámetros de crecimiento de la célula y de producción de molécula rIX-FP activa y antígeno de rFIX-FP.

Tabla 5: Condiciones en la prueba del reactor utilizadas en el Experimento 3

Reactor	Medio	Vitamina K
A2	Medio A	Reducida
A4	Medio A	No reducida
B2	Medio C	Reducida
B4	Medio C	No reducida

5 En esta investigación se observó una diferencia en términos de crecimiento celular. Esta diferencia era que se pudieron lograr mayores cantidades de células con el Medio A. Había muy poca diferencia en relación con el crecimiento celular entre los reactores comparando BSM reducido y no reducido a esa concentración de BSM/BSMr (50 ng/ml por día).

10 Se analizó la producción de antígeno de FIX y de molécula FIX activa de las células, con diferentes condiciones de la prueba. Un resumen de estos resultados se presenta en Tabla 6. Existen diferencias sustanciales evidentes bajo la combinación de extracción y llenado extendido. El Medio A producía 20% - 30% más de antígeno y 22% - 27% más de actividad que el Medio C, partiendo de volúmenes de cultivo similares.

Tabla 6: Comparación de los resultados del ensayo de antígeno y de la actividad para el Experimento 3

Parámetro	Reactor A2 con BSMr	Reactor A4 con BSM	Reactor B2 con BSMr	Reactor B4 con BSM
Volumen aproximado (L)	7	7	7	7
Actividad (U)	30580	28864	24052	23570
Antígeno (U)	46254	58987	38528	45443
Relación	0,66	0,49	0,62	0,52

15 **Experimento 4: Efecto de BSM y BSMr sobre el crecimiento celular y la viabilidad**

20 Para someter a ensayo el efecto de concentraciones crecientes de BSM y BSM reducido sobre el crecimiento celular y la viabilidad, se llevó a cabo una investigación adicional. Ocho reactores se cultivaron con parámetros idénticos, con la excepción de la adición de BSM o la adición de BSM reducido. Al igual que en los experimentos anteriores, la concentración de BSM reducido era un valor calculado, y la concentración real podía ser menor que el valor calculado. El medio utilizado era Medio A tal y como se ha descrito en el Experimento 1. Las adiciones se incrementaron cada día sobre una base celular (Tabla 7), y se vigiló el efecto sobre el crecimiento celular. Los reactores procedieron en el modo de extracción y llenado teniendo el primer ciclo una duración de 6 días, y el segundo ciclo una duración de 4 días.

Tabla 7: Condiciones del ensayo en el reactor utilizado en el Experimento 4

Reactor	[BSM]	Vitamina K
A1	50 ng/mL \equiv 200 μ g/día	No reducida
A2	240 μ g/10 ⁹ células/día	No reducida
A3	720 μ g/10 ⁹ células/día	No reducida
A4	2160 μ g/10 ⁹ células/día	No reducida
B2	240 μ g/10 ⁹ células/día nominal	Reducida
B3	720 μ g/10 ⁹ células/día nominal	Reducida
B4	2160 μ g/10 ⁹ células/día nominal	Reducida

25 Los datos de la densidad de células viables y de la viabilidad celular se presentan en las Figuras 6 y 7, respectivamente.

30 Los reactores A3 y A4 se detuvieron antes de la finalización del experimento, y esto se refleja en los gráficos de los datos. Los reactores se detuvieron pronto ya que la concentración creciente de BSM estaba causando muerte celular dentro del reactor. La muerte celular observada en el reactor se reflejó en una disminución de la demanda de

oxígeno. El Reactor A4 contenía la mayor concentración de BSM y comenzó su declive primero, seguido por el Reactor A3 con la segunda concentración más alta de BSM. La muerte celular del reactor A4 comenzó 10 horas después del inicio de la muerte celular en el reactor A3.

Experimento 5: Datos de la viabilidad celular bajo una creciente valoración de BSM y BSM reducido.

5 Este trabajo se realizó para evaluar los logros de las adiciones de BSM y BSM reducido sobre el crecimiento celular y la productividad de la molécula de la proteína de fusión activa de Factor IX. Los experimentos iniciales en matraz se realizaron con un clon de CHO-S para obtener datos para sostener una investigación adicional. En este experimento, los datos se recogieron tanto a las 72 horas como a las 96 horas. A las 72 horas, se logró un aumento del rendimiento de la actividad con las adiciones de BSM reducido. El rendimiento antigénico también aumentó en comparación con las adiciones de BSM; sin embargo la mayor proporción se mantuvo con las adiciones de BSM reducido. En este caso, una sola adición de BSM reducido proporcionó un aumento de los rendimientos de la actividad pero comparables con una adición doble de BSM. Los datos recogidos a las 96 horas mostraron solo ligeros incrementos en la actividad debido a las adiciones de BSM reducido. Sin embargo todos los matraces con adición de BSM reducido conservaron una relación equivalente o superior en comparación con las adiciones de BSM. En general, se obtuvo una relación incrementada y una expresión de la actividad equivalente o aumentada por la adición de BSM reducido, en comparación con la adición de BSM.

20 Cuando se expresa una proteína inherentemente inestable, son deseables formatos de cultivo tales como perfusión o extracción y llenado, ya que permiten la eliminación del medio gastado y una purificación y estabilización posteriores de la proteína deseada. Para aumentar aún más la capacidad de las células y resaltar los posibles efectos de la adición de BSM reducido en comparación con adiciones de BSM, se realizó un cultivo con alimentación por lotes. Los resultados de esta investigación se presentan en el Experimento Dos. En condiciones de alimentación por lotes, se alcanzó un crecimiento similar al obtenido con adiciones de BSM o de BSM reducido (Consultar la Figura 4). Los datos muestran que con condiciones de adición de BSM reducido, se aumentó la cantidad de rIX-FP activo desde 22357 UI a 35444 UI, lo que representa un aumento del 59%. Curiosamente de forma simultánea al aumento observado en molécula activa, había una disminución en el rendimiento antigénico hasta 38197 UI, que representa el 77% del valor de BSM. El aumento de material activo y la disminución de material antigénico dieron como resultado un gran incremento en la relación debido a la adición de BSM reducido.

30 Para someter a ensayo la respuesta celular en el modo de extracción y llenado, un clon de CHO-K1 se cultivó en dos medios, y se evaluó de nuevo el efecto de BSM y de BSM reducido. El crecimiento de las células difería en relación con el medio del ensayo (Consultar la Figura 5). El crecimiento hasta densidades celulares elevadas se obtuvo con el Medio A. Los duplicados dentro de cada prueba del medio, eran sin embargo muy reproducibles, mostrando de nuevo que había poca diferencia o ninguna en las características del crecimiento debido a la adición de BSM o de BSM reducido a las concentraciones que se sometieron a ensayo. Al igual que con los experimentos previos, se sometió a ensayo la cantidad de molécula activa y de molécula antigénica. Para ambos tipos de medios, se obtuvieron valores de actividad más altos con BSM reducido, aunque en este caso el aumento fue muy reducido con los valores de adición de BSM en el intervalo de 94-98% de los valores de adición de BSM reducido. La mayor diferencia se observó en la cantidad de material antigénico producido con las condiciones del ensayo. En ambos medios A y C, los reactores con adición de BSM reducido producían menos material antigénico que con las adiciones de BSM. Cuando se cultivaba en el Medio A, el BSM reducido producía 78% de material antigénico, y en el Medio C producía 84% de material antigénico en comparación con adiciones de BSM. Esto dio lugar a un aumento en la relación de 19-35% dependiendo del tipo de medio, administrado con las adiciones de BSM reducido.

45 El último experimento se diseñó para someter a ensayo los niveles de BSM y de BSM reducido que sería tolerable para la célula. El resultado de esta investigación fueron la viabilidad celular y una densidad celular viable logradas durante estos cultivos (consultar la Figura Seis y la Figura Siete, respectivamente). La condición testigo utilizada era 50 ng/ml de BSM añadidos a diario, y el número de células y la viabilidad en estas condiciones fueron tal y como se esperaban, y en consonancia con los resultados anteriores. Con el aumento de la adición de BSM hasta $210 \mu\text{g}/10^6$ células/día, se observó una disminución sustancial de la viabilidad celular y del número de células. Una disminución adicional de la viabilidad celular y del número de células observada tanto con 720 como con $2160 \mu\text{g}/10^6$ células/día, indica que las adiciones de BSM eran cada vez más tóxicas para la célula a concentraciones crecientes.

50 El efecto tóxico de las adiciones también se observó con BSM reducido, aunque en menor medida. Las concentraciones utilizadas para las adiciones de BSM reducido eran valores nominales calculados tal y como se ha indicado anteriormente. El crecimiento celular era comparable al testigo tanto para adiciones de 240 como de $720 \mu\text{g}/10^6$ células/día. La toxicidad observada no dio lugar a muerte celular, pero redujo el crecimiento celular para la adición de BSM reducido de $2160 \mu\text{g}/10^6$ células/día, en marcado contraste con la condición equivalente de BSM. Estos resultados indican que a las concentraciones empleadas, el BSM reducido tenía un efecto mucho menos tóxico sobre las células que la adición de BSM.

60 El efecto de las adiciones de BSM y de BSM reducido se ha evaluado en una variedad de formatos de cultivo. Un resultado consistente logrado a partir de estas investigaciones, en condiciones comparables, era que la adición de BSM reducido devolvía los rendimientos de la actividad, equivalentes o incrementados y los rendimientos antigénicos disminuidos, en comparación con la adición de BSM. La toxicidad del BSM reducido parece ser menor, como se

5 ha demostrado por la tolerancia en la célula a concentraciones más elevadas; el mecanismo de acción exacto del efecto de BSM reducido no se ha elucidado completamente. El efecto podría ser a través de una mayor entrada en la célula, un aumento de la estabilidad de BSM reducido en cultivo, o dentro del citoplasma de la célula, o un mecanismo directo sobre la ruta de la gamma carboxilación de la célula. Aunque el mecanismo exacto no está claro, el resultado final de la adición de BSM reducido a los cultivos, es una mayor proporción de material activo expresado en relación con el material antigénico total. En el contexto de la producción de rIX-FP recombinante, esto representa una ventaja significativa.

Experimento 6:

10 Un Factor VII fusionado con albúmina se clonó y expresó en células CHO-S tal y como se describe en Thromb. Haemost. 2008 Abr; 99(4):659-67.

15 El cultivo de células de mamífero se realizó en condiciones por lotes o de alimentación por lotes con un volumen de partida de 3 litros en un sistema de biorreactor de 5 litros. Los parámetros controlados fueron la temperatura (37°C), el pH (7,2), la agitación (250 rpm) y el oxígeno disuelto. El medio usado era un medio disponible comercialmente, definido químicamente (CD-CHO, Invitrogen) que se complementó con BSM o BSMr con una concentración de partida de 50 ng/ml. La concentración se incrementó cada día con 50 ng/ml hasta el día 5 en el que se alcanzó una concentración máxima de 250 ng/ml, que después se mantuvo durante el resto del período de cultivo. La duración del cultivo no excedió los 12 días.

La actividad de FVII se determinó empleando un ensayo cromogénico (kit de ensayo de FVII COASET® (Chromogenix, 82190063)). La cantidad de proteína se determinó a través de HPLC de fase inversa.

Efecto sobre la Actividad Específica (UI/mg)			
Presentación de Vitamina K	Media	Intervalo de confianza menor del 95%	Intervalo de confianza mayor del 95%
Bisulfito sódico de menadiona (BSM; n=4)	313,5	266,3	360,7
Bisulfito sódico de menadiona reducido (BSMr; n=25)	392,6	373,7	411,5

20 El cambio a BSMr desde BSM tenía la ventaja de aumentar la cantidad de producto activo expresado, tanto en el caso de Factor IX como de Factor VII. En cada caso también había un aumento correspondiente de la actividad específica observada.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL Ltd
 CSL Ltd

5 <120> MÉTODO PARA INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDIENTES DE VITAMINA K

<130> 2009_P001_A143

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
 <211> 3180
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión: Factor IX humano - Albúmina humana

15 <400> 1

atgaagtggg	tgaccttcat	cagcctgctg	tttctgttca	gcagcgccta	cagcagaggc	60
gccgagtgta	ccgtgttccct	ggaccacgag	aacgcccaaca	agatcctgaa	caggggtgaag	120
aggtacaaca	gcggaagct	ggaagaattt	gtgcagggca	acctggaacg	ggagtgcattg	180
gaagaaaagt	gcagcttcca	ggaagccaga	gaggtgttcg	agaacaccga	gaggaccacc	240
gagttctgga	agcagtagct	ggacggcgac	cagtgcgaga	gcaaccctg	cctgaacggc	300
ggcagctgca	aggacgacat	caacagctac	gagtgcctgt	gccccttcg	cttcgagggc	360
aagaactgcg	agctggagct	gacctgcaac	atcaagaacg	gcagatgcga	gcagttctgc	420
aagaacagcg	ccgacaacaa	ggtggtgtgc	tctgcaccg	agggttacag	gctggccgag	480
aaccagaaga	gctgcgagcc	cgccgtgccc	ttcccttgcg	gaaggggtgc	cgtgagccag	540
accagcaagc	tgaccagggc	cgagacagtg	ttccccgacg	tggactacgt	gaacagcacc	600
gagggccgaga	caatcctgga	caacatcacc	cagagcacc	agtccttcaa	cgacttcacc	660
aggggtggtg	gcgccgagga	cgccaagccc	ggccagttcc	catggcaggt	ggtgctgaac	720
ggcaaggtgg	acgccttctg	cgccggcagc	atcgtgaacg	agaagtggat	cgtgacagcc	780
gcccactgcg	tggagacagg	cgtgaagatc	accgtggtgg	ccggggagca	caacatcgag	840
gaaacagagc	acaccgagca	gaagaggaac	gtcatcagga	tcatcccca	ccacaactac	900
aacgccgcca	tcaacaagta	caaccacgac	atcgccctgc	tggactgga	cgagccactg	960
gtgctgaaca	gctacgtgac	ccccatctgt	atcgccgaca	aggaatacac	caacatcttt	1020
ctgaagtctg	gcagcggcta	cgtgagcggc	tggggcaggg	tgttcacaa	gggcaggtcc	1080
gctctggtgc	tgcaagctct	gaggggtgcc	ctgggtggaca	gggccacctg	cctgaggtcc	1140
accaagtcca	ccatctacaa	caacatgttc	tgcgcccggct	tccacgaggg	cggcagggac	1200
agctgccagg	gcgacagcgg	cgacacctcac	gtgacagaag	tggaggggac	cagcttctctg	1260

ES 2 475 718 T3

accggcatca tcagctgggg cgaggaatgc gccatgaagg gcaagtacgg catctacacc 1320
aaggtgtcca gatacgtgaa ctggatcaaa gaaaagacca agctgacccc cgtgtcccag 1380
acctccaagc tgacacgcgc cgagacagtg tttccagacg tggacgcca caagagcgag 1440
gtggcccaca ggttcaagga cctgggcgag gaaaacttca aggccctggt cctgatcgcc 1500
ttcgcccagt acctgcagca gtgccattc gaggaccacg tgaagctggt gaacgaggtg 1560
accgagttcg ccaagacctg cgtggccgac gagagcgccg agaactgcca caagagcctg 1620
cacacctgt tcggcgacaa getgtgcacc gtggccaacc tgggggagac atacggcgag 1680
atggccgact gctgcgcaa gcaggaacct gagaggaacg agtgcttctt gcagcacaag 1740
gacgacaacc ccaacctgcc caggctggtg cggcccagg tggacgtgat gtgcaccgcc 1800
ttccacgaca acgaggaaac attcctgaag aagtacctgt acgagatcgc cagaaggcac 1860
ccctacttct acgccccga gctgctgttc ttcgccaaga gatacaaggc cgccttcacc 1920
gagtgtgccc aggccgctga caaagctgcc tgccgtgctc caaaactgga cgagctgagg 1980
gacgaggcca aggcctcttc cgctaaacag aggctgaagt gcgccagcct gcagaagttc 2040
ggcgagaggg cctttaaggc ctgggcccgtg gccaggctgt cccagaggtt cccaaggcc 2100
gagtttgccc aggtgtccaa gctggtgacc gatctgacaa aggtgcacac cgagtgttgt 2160
cacggcgacc tgctggaatg cgccgacgac agagccgacc tggccaagta catctgcgag 2220
aaccaggaca gcattctctc taagctgaag gaatgctgcg agaagccact gctggaaaag 2280
agccactgta tcgccgaggt ggagaacgac gagatgcccg ccgacctgcc ttctctggcc 2340
gccgacttcc tggagtccaa ggacgtgtgc aagaactacg ccgaggctaa ggatgtgttc 2400
ctgggcatgt tctgtacga gtacgcccgc agacacccc actacagcgt ggtgctgctg 2460
ctgaggctgg ccaagacctg cgagacaaca ctggaaaagt gctgcgcccg ccccgacccc 2520
cacgagtgtc acgccaaggt gttcgacgag ttcaagcctc tgggtgagga accccagaac 2580
ctgatcaagc agaactgtga gctgttcgag cagctgggcg agtacaagtt ccagaacgcc 2640
ctgctggtgc ggtacaccaa gaaggtgccc caggctctca caccaaccct ggtggaggtg 2700
tccaggaacc tgggcaaagt cggagcaag tgctgcaagc acccagaggc caagaggatg 2760
ccctgcgccc aggactacct gtccgctcgtc ctgaaccagc tgtgcgtgct gcacgaaaag 2820
acccccgtga ggcacagggt gaccaagtgc tgtaccgaga gcctggtgaa cagaaggccc 2880
tgcttcagcg ccctggaagt ggacgagaca tacgtgccca aagagttaa ccccgagaca 2940
ttcaccttcc acgcccacat ctgcacctg agcgagaagg aaaggcagat caagaagcag 3000
accgccctgg togagctggt gaagcacaag cccaaggcca ccaaggaaca gctgaaggcc 3060
gtcatggacg acttcgcccg ctttgtggag aaatgttgta aggctgatga caaggaaaca 3120
tgcttcgccc aggaagghaa gaaactggtc gccgcctctc aggctgctct gggcctgtga 3180

<210> 2

<211> 1018

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Proteína de fusión: Factor IX humano - Albúmina humana

ES 2 475 718 T3

<400> 2

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15

 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30

 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 35 40 45

 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50 55 60

 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 65 70 75 80

 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95

 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110

 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125

 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160

 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175

 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190

 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205

 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220

ES 2 475 718 T3

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Pro
 405 410 415

Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
 420 425 430

Val Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
 435 440 445

Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
 450 455 460

Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
 465 470 475 480

ES 2 475 718 T3

Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
 485 490 495

Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
 500 505 510

Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
 515 520 525

Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
 530 535 540

Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
 545 550 555 560

His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
 565 570 575

Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
 580 585 590

Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
 595 600 605

Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
 610 615 620

Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
 625 630 635 640

Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
 645 650 655

Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
 660 665 670

Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
 675 680 685

Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
 690 695 700

Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
 705 710 715 720

His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
 725 730 735

Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fermentación de células eucariotas que expresan una o varias proteínas dependientes de vitamina K, en el que uno o varios compuestos seleccionados a partir de una lista que comprende
 - i) formas reducidas de la vitamina K y/o
 - 5 ii) formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o
 - iii) formas reducidas de un precursor de la vitamina K
- se añaden al medio de cultivo celular antes y/o durante el proceso de fermentación, en donde el análogo de la vitamina K comprende una estructura de anillo 2-metil-1,4-naftoquinona y se puede sustituir funcionalmente por vitamina K1 en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico por residuos Gla en proteínas dependientes de vitamina K.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los factores de coagulación dependientes de vitamina K se seleccionan a partir de una lista que consiste en FIX, FVII, FX, FII, Proteína C, Proteína S, Proteína Z, osteocalcina, la proteína Gla de la matriz que inhibe la calcificación (MGP) o la proteína del gen 6 específica de la detención del crecimiento (Gas6) que regula el crecimiento celular.
 - 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que los factores de coagulación dependientes de vitamina K son FIX o FVII.
 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el análogo de la vitamina K reducida es bisulfito de menadiona reducido.
 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la expresión se realiza en un biorreactor.
 - 20 6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la fermentación se efectúa en un modo de extracción y relleno, un modo por lotes o un modo por perfusión.
 7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fermentación se realiza utilizando células en suspensión o con células adherentes.
 8. Uso de uno o varios compuestos seleccionados a partir de una lista que comprende
 - i) formas reducidas de la vitamina K y/o
 - ii) formas reducidas de un análogo de la vitamina K y/o
 - iii) formas reducidas de un precursor de la vitamina K
 - 25 para la expresión de una o varias proteínas funcionales dependientes de vitamina K en cultivo celular mediante la adición de dichos compuestos al medio de cultivo celular, en donde el análogo de la vitamina K comprende una estructura de anillo 2-metil-1,4-naftoquinona y se puede sustituir funcionalmente por vitamina K1 en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico por residuos Gla en proteínas dependientes de vitamina K.
 - 30 9. Uso según la reivindicación 8, en el que la relación de la actividad frente al nivel de expresión de antígeno de la proteína dependiente de vitamina K se incrementa.
 - 35 10. Uso según las reivindicaciones 8 a 9, en el que el análogo de la vitamina K reducida es bisulfito de menadiona reducido.
 11. Uso según las reivindicaciones 8 a 10, en donde la expresión se realiza en un biorreactor.
 12. Uso según las reivindicaciones 8 a 11, en donde la fermentación se efectúa en un modo de extracción y relleno.
 - 40 13. Medio para la fermentación de proteínas dependientes de vitamina K complementadas con una forma reducida de la vitamina K y/o un análogo de la vitamina K y/o un precursor de la vitamina K, en donde el análogo de la vitamina K comprende una estructura de anillo 2-metil-1,4-naftoquinona y se puede sustituir funcionalmente por vitamina K1 en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico por residuos Gla en proteínas dependientes de vitamina K.
 - 45 14. Medio según la reivindicación 13, complementado con bisulfito de menadiona reducido.
 15. Uso de formas reducidas de la vitamina K y/o un análogo de la vitamina K y/o un precursor de la vitamina K en el medio de cultivo celular para mejorar la viabilidad de las células en fermentación, en donde el análogo de la vi-

vitamina K comprende una estructura de anillo 2-metil-1,4-naftoquinona y se puede sustituir funcionalmente por vitamina K1 en la gamma carboxilación dependiente del ciclo de la vitamina K, de residuos de ácido glutámico por residuos Gla en proteínas dependientes de vitamina K.

Figura 1: Carboxilación dependiente de vitamina K del precursor del factor IX

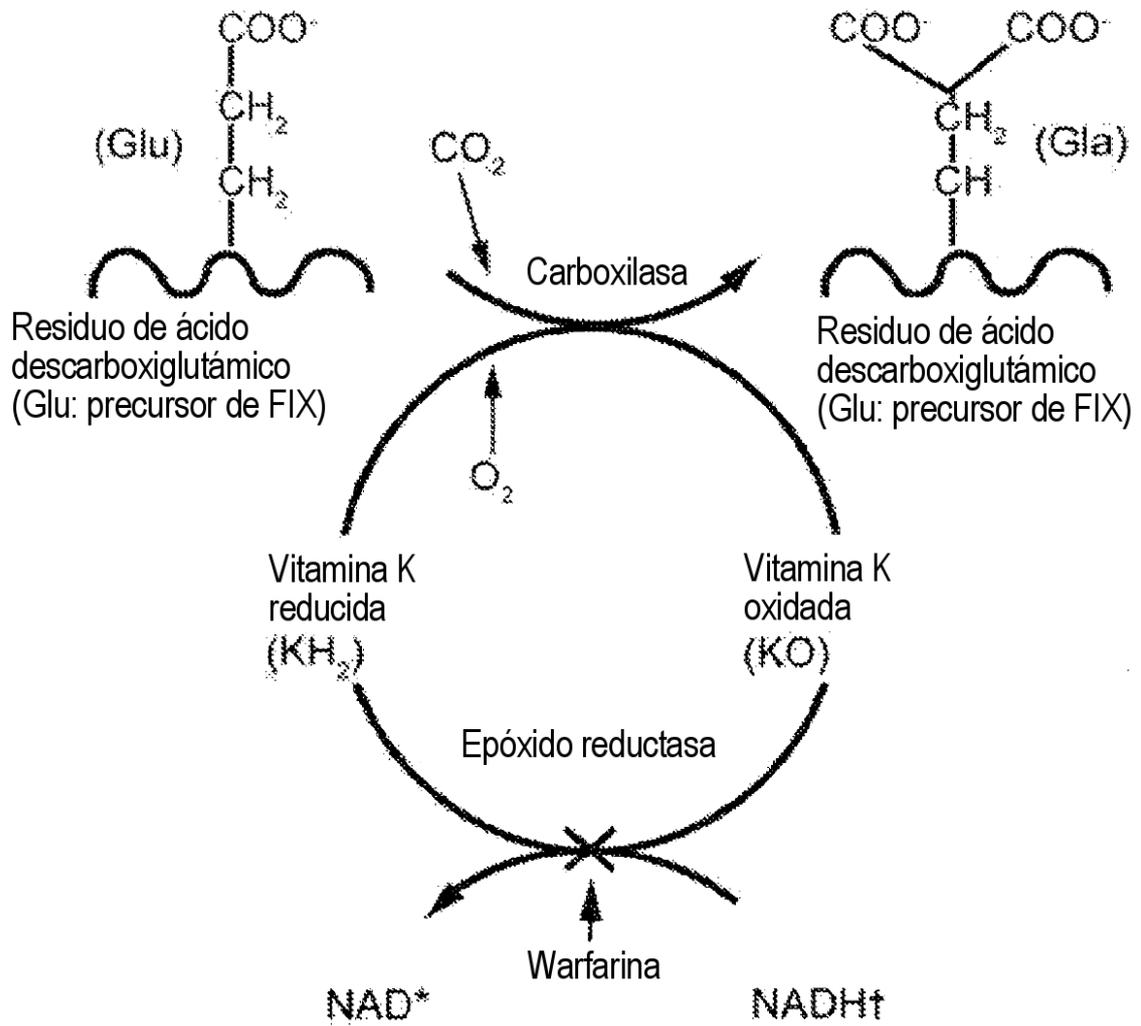
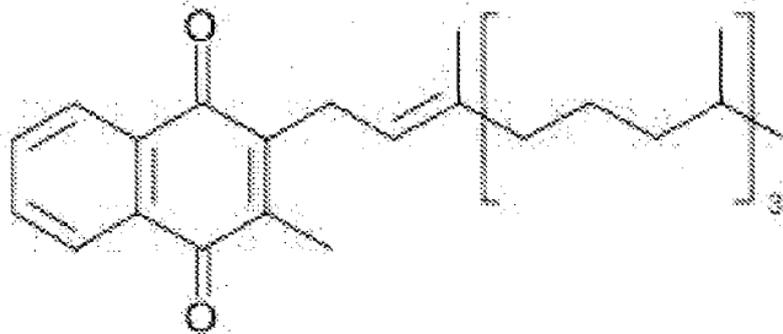
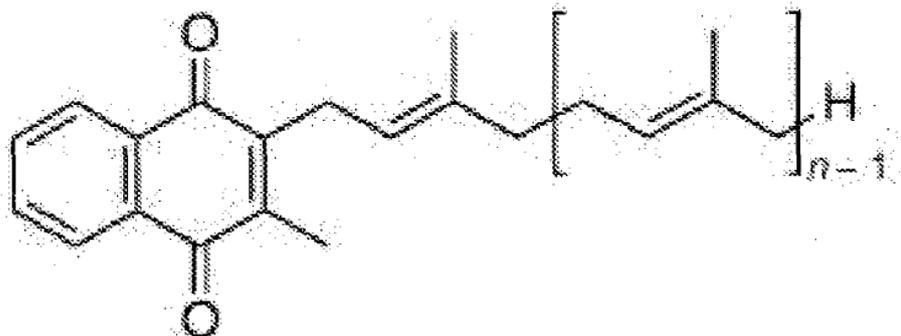


Figura 2: Fórmulas químicas de la vitamina K1, K2 y menadiona

Vitamina K1 (Filoquinona)



Vitaminas K2 (menaquinonas) con números variables (n)



Menadiona

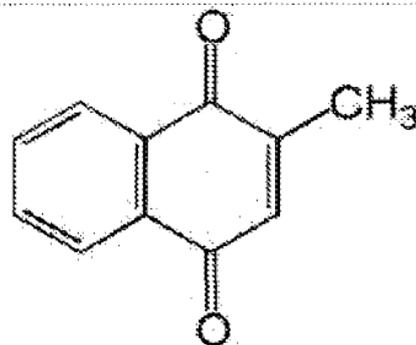


Figura 3: Reducción del bisulfito sódico de menadiona

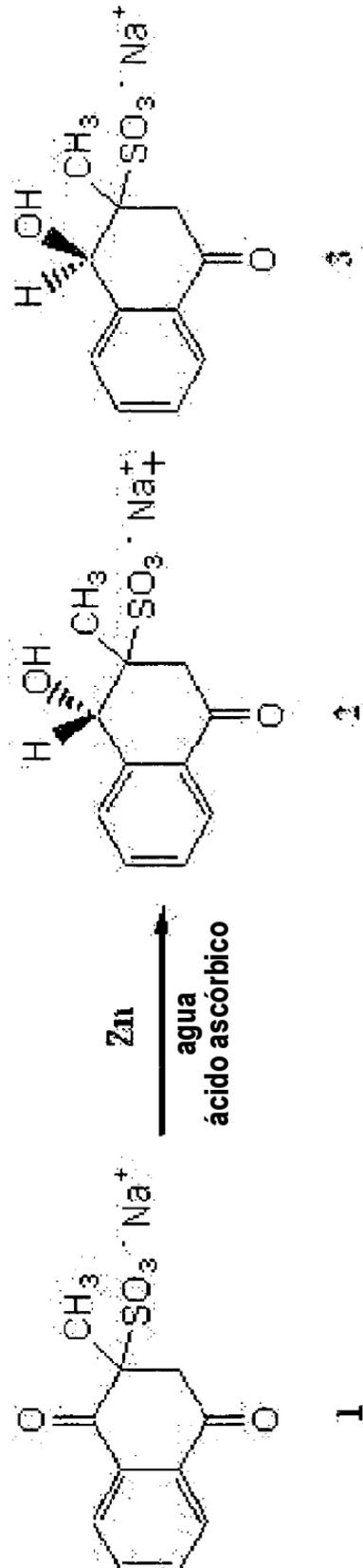


Figura 4: Gráfico del número total de células viables para el reactor A4 y B4 en el Experimento 2

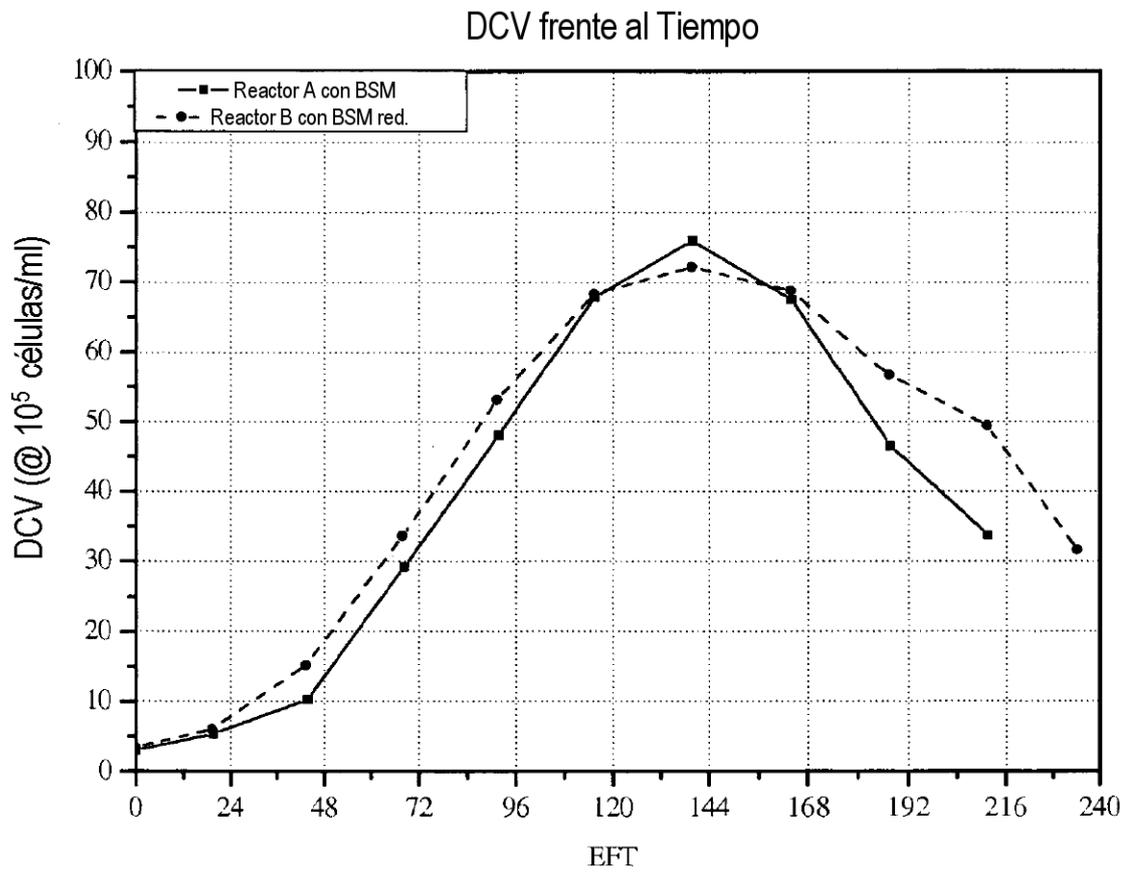


Figura 5: Gráfico de la densidad celular viable (DCV) de los cuatro reactores en el Experimento 3

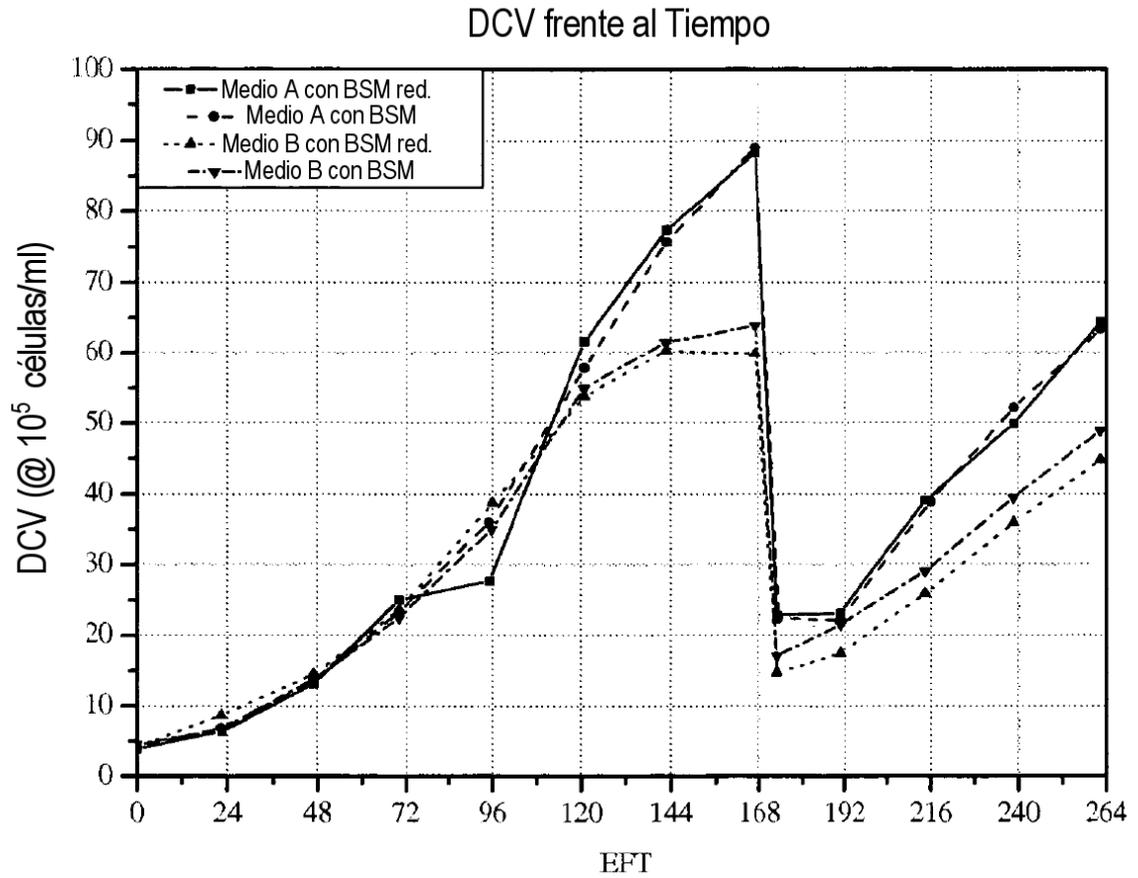


Figura 6: Viabilidad de las células a lo largo del tiempo con una valoración creciente de BSM y BSMr

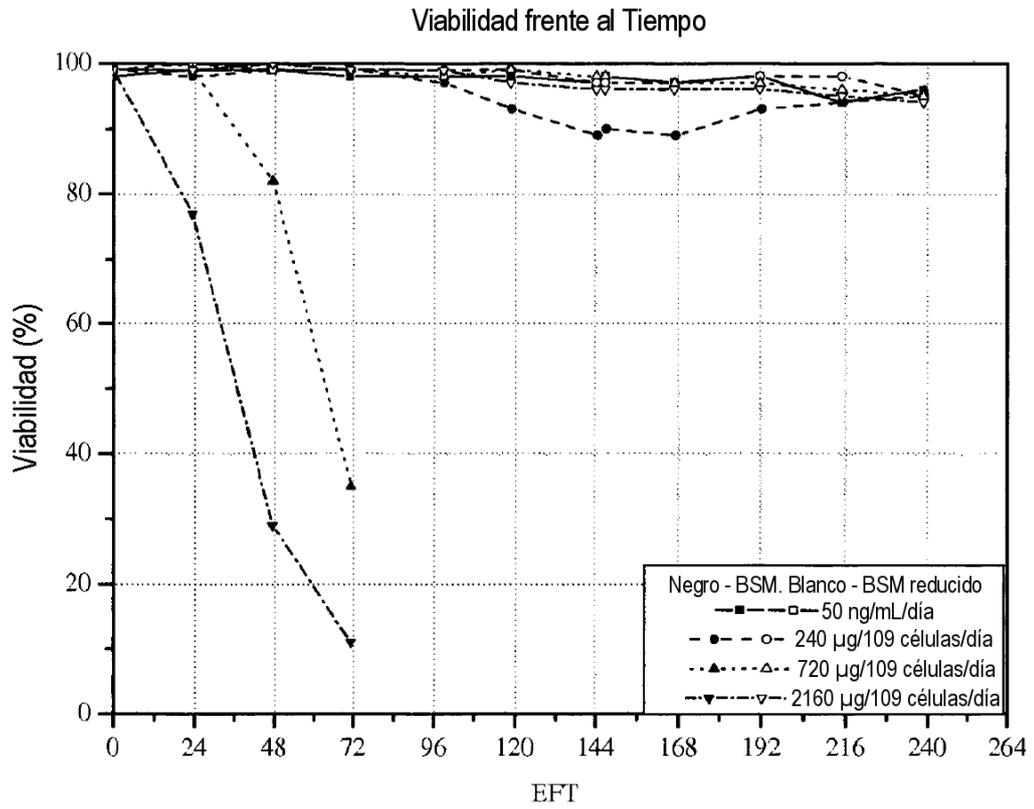


Figura 7: Datos de la densidad celular viable con una valoración creciente de BSM y BSM reducido

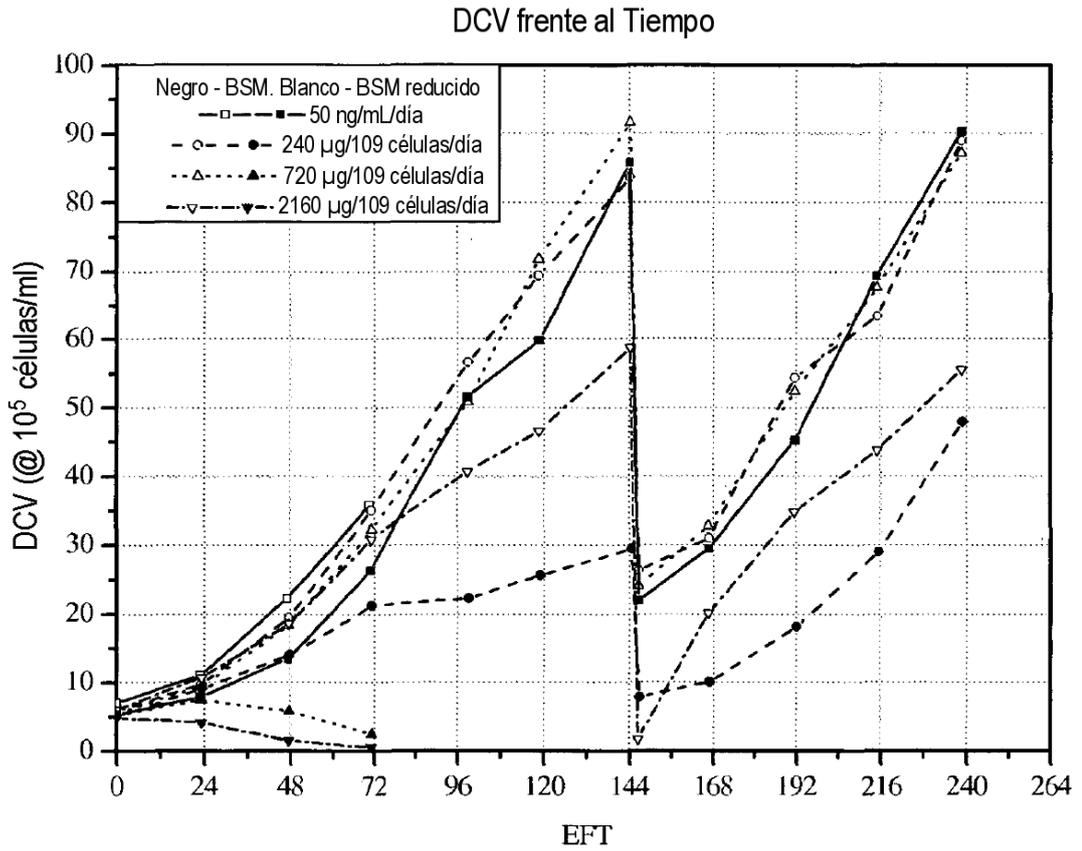
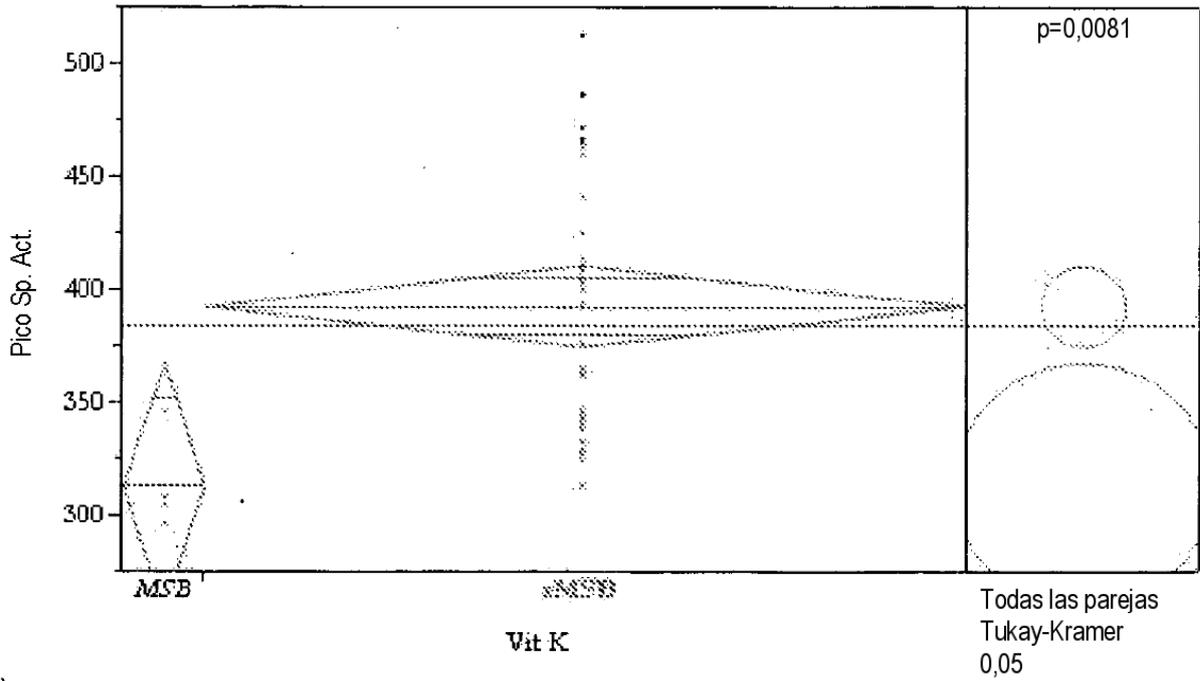


Figura 8:

a)



b)

