

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 365**

51 Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006** **E 06848864 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 1969127**

54 Título: **Método para producir proteínas dependientes de vitamina K biológicamente activas por métodos recombinantes**

30 Prioridad:

21.12.2005 US 752642 P

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

06.10.2014

73 Titular/es:

CNJ HOLDINGS, INC (50.0%)

155 Innovation Drive

Winnipeg, MB R3T 5Y3, CA y

UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (50.0%)

72 Inventor/es:

DROHAN, WILLIAM N.;

GRIFFITH, MICHAEL J.;

TAYLOR, JOHN R. y

STAFFORD, DARREL W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 503 365 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 producir proteínas dependientes de vitamina K biológicamente activas por métodos recombinantes

Fundamento de la invención

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la invención se refieren generalmente a la producción de proteínas dependientes de vitamina K recombinantes, particularmente Factor IX, que son totalmente funcionales por co-expresión de una o más proteínas implicadas en el procesamiento de las proteínas dependientes de vitamina K. Estas proteínas de procesamiento incluyen, epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) y γ -glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC).
10 Adicionalmente, el propéptido de la proteína dependiente de vitamina K puede modificarse para mejorar la γ -carboxilación.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los trastornos de sangrado pueden resultar de una deficiencia en los niveles funcionales de una o más de las proteínas de la sangre, conocidas en conjunto como factores de coagulación de la sangre, que se necesitan para la hemostasia normal, es decir, coagulación de la sangre. La gravedad de un trastorno de sangrado dado es dependiente del nivel en sangre de factores de coagulación funcionales. Los trastornos de sangrado suaves se observan generalmente cuando el nivel funcional de un factor de coagulación dado alcanza aproximadamente el 5% de lo normal, aunque si el nivel funcional cae por debajo de 1%, es probable que ocurra sangrado grave con cualquier daño de la vasculatura.

20 La experiencia médica ha mostrado que la hemostasia esencialmente normal puede restaurarse temporalmente por infusión intravenosa de preparados biológicos que contienen uno o más de los factores de coagulación de la sangre. La denominada terapia de sustitución, en donde un preparado biológico que contiene el factor de coagulación de la sangre deficiente se infunde cuando se da el sangrado (bajo demanda) o para evitar el sangrado (profilácticamente), se ha mostrado que es efectivo en el manejo de pacientes con una amplia variedad de trastornos de sangrado. En general, para que la terapia de sustitución sea efectiva, las infusiones intravenosas del factor de coagulación ausente están dirigidas a alcanzar niveles que estén bien por encima de 5% de lo normal durante un periodo de dos a tres días.

25 Históricamente, los pacientes que sufren de hemofilia, un trastorno del sangrado adquirido genéticamente que resulta de una deficiencia o bien del Factor VIII de coagulación de la sangre (hemofilia A) o del Factor IX (hemofilia B), se trataban con éxito mediante infusión periódica de toda la sangre o fracciones de plasma sanguíneo de grados variables de pureza.

30 Más recientemente, con el advenimiento de la biotecnología, los preparados biológicamente activos de factores de coagulación de la sangre sintéticos (recombinante) se han convertido en disponibles comercialmente para el tratamiento de trastornos de coagulación de la sangre. Las proteínas de coagulación de la sangre recombinantes están esencialmente libres de riesgos de la contaminación patógena humana que continua siendo una preocupación que se asocia con preparados comerciales incluso de alta pureza que se derivan de la sangre humana.

35 El tratamiento adecuado de los trastornos de sangrado está muy limitado a las regiones económicamente desarrolladas del mundo. En el caso de hemofilia se estima que más del 75% de la población mundial de pacientes recibe tratamiento inadecuado o, peor, ningún tratamiento, para su enfermedad. Para muchas regiones del mundo, el coste de preparados comerciales seguros y efectivos de factores de coagulación es prohibitivo para el manejo rutinario de los trastornos de sangrado y, en algunos casos, solo el tratamiento de emergencia con productos donados está disponible.

40 En regiones del mundo donde el tratamiento adecuado de trastornos de sangrado está potencialmente disponible, el coste es muy alto y los pacientes son casi siempre dependientes de pagadores de tercera parte, por ejemplo, seguro de salud o programas subsidiarios del gobierno, para adquirir los productos comerciales necesarios. En promedio, el tratamiento de hemofilia en los Estados Unidos se estima que cuesta aproximadamente \$50.000 por paciente por año por el producto comercial necesario para cuidado rutinario, bajo demanda. Sin embargo, este coste podría ser mucho mayor en tanto que el Comité Consultivo Médico y Científico para la Fundación Nacional de la Hemofilia ha recomendado que los pacientes deberían recibir tratamiento profiláctico que, en el caso de un hemofílico adulto, podría llevar al coste anual muy por encima de \$250.000 por año. Dado que los límites de seguros de vida de aproximadamente \$1 millón están asociados generalmente con la mayoría de políticas en los Estados Unidos, los hemofílicos se reducen gravemente en términos de la cantidad de producto comercial que pueden permitirse para el cuidado que, al menos, afecta a su calidad de vida durante la edad adulta y, a lo peor, eleva el riesgo de sangrado que amenaza la vida.

45 Durante los pasados 25 años o así, la biotecnología ha ofrecido la promesa de producir productos biofarmacéuticos a bajo coste. Desafortunadamente, esta promesa no se ha cumplido debido en mayor parte a la inherente complejidad de las moléculas biológicas que se dan de forma natural y una variedad de limitaciones asociadas con

la síntesis de sus contrapartes de proteína recombinante en células diseñadas genéticamente. A pesar del tipo de célula, por ejemplo, animal, bacteria, levadura, insecto, planta, etc., que se elige para la síntesis, las proteínas deben alcanzar ciertas propiedades estructurales mínimas para el uso terapéutico seguro y efectivo. En algunos casos, las proteínas recombinantes deben simplemente doblarse correctamente después de la síntesis para obtener la estructura tridimensional necesaria para la función apropiada. En otros casos, las proteínas recombinantes deben sufrir modificación post-traducciona, dirigida por enzima, extensiva, después de que la proteína del núcleo se ha sintetizado en la célula. Deficiencias en cualquiera de un número de actividades enzimáticas intracelular pueden dar por resultado la formación de un gran porcentaje de proteína no funcional y limitar la utilidad de un sistema celular diseñado genéticamente para la producción económica de un producto biofarmacéutico previsto para uso comercial.

Varias de las proteínas necesarias para la coagulación normal de la sangre son muy complejas en término de tener dominios estructurales múltiples estando cada uno asociado con una propiedad funcional muy específica que es esencial para la efectividad total de la proteína en el control de la hemostasia y/o prevención de la trombosis. En particular, las denominadas proteínas de coagulación de la sangre "dependientes de vitamina K", por ejemplo, Factores II, VII, IX, X, Proteína C y Proteína S, son proteínas muy complejas y deben sufrir modificación post-traducciona extensiva para la función normal. Alcanzar altos niveles de proteínas dependientes de vitamina K funcionales por tecnología recombinante se ha limitado por la complejidad estructural de estas proteínas y la incapacidad de crear sistemas celulares diseñados genéticamente que vencen las deficiencias inherentes en las actividades enzimáticas necesarias para que ocurra la modificación post-traducciona eficiente y completa.

Problema a resolver

La primera proteína de coagulación de la sangre dependiente de vitamina K sintética en llegar a estar disponible comercialmente fue el Factor IX que se fabrica aún hoy en día a partir de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) diseñadas genéticamente (BeneFix, Injerto Direccional del Factor IX de Coagulación (Recombinante), Weyth Pharmaceuticals, Inc. Filadelfia, PA 19101 CI 8020-3 W10483C007, Rev 10/05). Aunque el Factor IX recombinante puede producirse usando células CHO, no es óptimo como un tratamiento para la Hemofilia B porque no se ha procesado de forma apropiada y por consiguiente su biodisponibilidad a los pacientes es variable. Mientras que niveles razonables de proteína de Factor IX recombinante pueden expresarse mediante células CHO diseñadas genéticamente, por ejemplo, hasta 188 mg/L, los niveles de Factor IX totalmente funcional que se producen están en el orden de solo 0,5 mg/L debido a la capacidad limitada de las células CHO para gamma-carboxilar totalmente los primeros 12 residuos de ácido glutámico en la región amino terminal de la proteína denominada como el dominio gla. Además de esta deficiencia en la modificación post-traducciona del Factor IX, el trabajo posterior demostró que el pro-Factor IX, una forma de Factor IX que contiene un dominio de propéptido que se necesita para la gamma-carboxilación intracelular eficiente de la proteína, no se procesa completamente antes de la secreción desde la célula CHO. Como consecuencia, se encontró que muy por encima de la mitad del Factor IX secretado desde células CHO diseñadas genéticamente aún contiene la región propéptido y no es funcional (Bond, M., Jankowski, M., Patel, H., Karnik, S., Strand, A., Xu, B., et al. [1998] Biochemical characterization of recombinant factor IX. *Semin. Hematol*, 35 [2 Supl. 2], 11-17).

La presente solicitud aborda una necesidad de un método para producir proteínas dependientes de vitamina K tal como Factor IX que se hayan procesado apropiadamente de manera que sean activas y en rendimiento suficiente para la producción comercial. Para aumentar la disponibilidad de proteínas de coagulación de la sangre dependientes de vitamina K para cumplir con la necesidad médica mundial para el tratamiento de trastornos de sangrado tales como hemofilia B, se necesitan mejoras en la producción de proteína totalmente funcional, Factor IX en este ejemplo, a partir de células diseñadas genéticamente. De forma específica, se necesitan la identificación y suplemento de deficiencias en las actividades enzimáticas necesarias para obtener modificación post-traducciona esencialmente completa.

45 **Compendio de la invención**

Según la presente invención se proporciona un método para producir producto de proteína de Factor IX recombinante biológicamente activo como se presenta en la reivindicación 1.

Las realizaciones de la invención se dirigen a métodos para producir un producto de Factor IX recombinante biológicamente activo, que incluye transfectar una célula CHO con un gen que codifica la proteína de Factor IX unido de forma operable a un promotor y al menos dos genes que codifican un(os) factor(es) de procesado unido(s) de forma operable a al menos un promotor, o bien de forma simultánea o secuencial, y cosechar el producto de proteína de Factor IX. Preferiblemente, la célula produce producto de proteína dependiente de vitamina K biológicamente activa en una cantidad de al menos aproximadamente 15 mg/L.

El factor de procesado es un ácido nucleico seleccionado de, epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) y γ -glutamyl carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) unido de forma operable a uno o más promotores. Preferiblemente, la una o más proteínas de factor de procesado se produce(n) en una cantidad suficiente para facilitar la producción de al menos aproximadamente 15 mg/L del producto de proteína dependiente de vitamina K recombinante biológicamente activo. Preferiblemente, al menos uno de los genes se sobre-expresa. Más

preferiblemente, el gen sobre-expresado se une de forma operable a un promotor del factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF1).

En realizaciones preferidas, al menos aproximadamente el 75% de los residuos de ácido glutámico en el dominio gla del producto de proteína de Factor IX biológicamente activo están gamma-carboxilados.

- 5 En algunas realizaciones preferidas, el producto de proteína de Factor IX tiene una supresión en un propéptido del producto de proteína de Factor IX.

En algunas realizaciones preferidas, el producto de proteína de Factor IX incluye una región de propéptido heteróloga que es de una proteína de Factor IX que es diferente del producto de proteína de Factor IX.

- 10 Preferiblemente, al menos el 10% de la proteína de Factor IX recombinante es biológicamente activa. Más preferiblemente, al menos el 20% de la proteína de Factor IX es biológicamente activa. Aún más preferiblemente, al menos el 50% de la proteína de Factor IX es biológicamente activa. Aún más preferiblemente, al menos el 80% de la proteína de Factor IX es biológicamente activa.

- 15 En realizaciones preferidas, la proteína de Factor IX biológicamente activa se produce en una cantidad de al menos aproximadamente 20 mg/L. Más preferiblemente, la proteína de Factor IX biológicamente activa se produce en una cantidad de al menos aproximadamente 30 mg/L. Más preferiblemente, la proteína de Factor IX biológicamente activa se produce en una cantidad de al menos aproximadamente 50 mg/L.

- 20 En algunas realizaciones preferidas, la transfección es secuencial y transfectar la célula de mamífero incluye además seleccionar las células que expresan altos niveles del producto de proteína de Factor IX o el(los) factor(es) de procesado, clonar las células seleccionadas y amplificar las células clonadas. En algunas realizaciones preferidas, las etapas de transfección con el(los) gen(es) que codifica(n) el(los) factor(es) de procesado se realizan antes de las etapas de transfección con el gen que codifica la proteína de Factor IX. En realizaciones preferidas alternativas, las etapas de transfección con el gen que codifica la proteína de Factor IX se realizan antes de las etapas de transfección con el(los) gen(es) que codifica(n) el(los) factor(es) de procesado.

- 25 En realizaciones preferidas, la célula CHO se selecciona para la expresión de niveles endógenos de uno o más factores de procesado antes de la transfección.

- 30 Las realizaciones de la invención se dirigen a una célula CHO recombinante que incluye un gen para la proteína de Factor IX unido de forma operable a un promotor y un gen para al menos un factor de procesado unido de forma operable a al menos un promotor. La expresión de la(s) proteína(s) codificada(s) por el gen para al menos un(os) factor(es) de procesado en la célula facilita la producción de proteína de Factor IX biológicamente activo en una cantidad de preferiblemente al menos aproximadamente 15 mg/L.

- 35 El factor de procesado es un gen que produce un producto génico de procesado seleccionado de VKOR y VKGC, unido de forma operable a uno o más promotores para la expresión en dicha célula. Preferiblemente, el al menos un producto génico de procesado se expresa a un mayor nivel que el observado en las células normales no transfectadas de la misma línea. Más preferiblemente, el producto génico sobre-expresado está unido de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF1).

En realizaciones preferidas, el gen que codifica la proteína de Factor IX se modifica para aumentar el porcentaje de residuos de ácido glutámico que se carboxilan cuando se compara al porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado presentes en la proteína de Factor IX producida a partir de células que expresan una proteína de Factor IX codificada por un gen que codifica la proteína de Factor IX no modificada.

- 40 En algunas realizaciones preferidas, la modificación incluye una supresión en la región propéptido del gen que codifica la proteína de Factor IX.

En algunas realizaciones preferidas, la modificación incluye sustitución de una región propéptido de la proteína de Factor IX con una región propéptido heteróloga procedente de una proteína de Factor IX heteróloga.

- 45 En algunas realizaciones preferidas, la célula usada para la transfección de un gen para una proteína de Factor IX se preselecciona seleccionando variantes de una línea celular de cultivo tisular específica que contienen enzimas de modificación que se dan de forma natural capaces de producir una proteína de Factor IX compuesta de aminoácidos que se modifican post-traduccionalmente para contener al menos 25% de la sulfatación y al menos 25% de los niveles de fosforilación presentes en la proteína de Factor IX derivada de plasma correspondiente.

- 50 En realizaciones preferidas, una proteína de Factor IX recombinante se produce mediante una o más de las etapas del método descrito en esta memoria. La proteína de Factor IX recombinante producida por los métodos descritos pueden incluirse en una composición farmacéutica, o un estuche. La proteína de Factor IX recombinante puede usarse en un método para tratar hemofilia administrando una cantidad efectiva de la proteína de Factor IX recombinante a un paciente que lo necesita.

Las realizaciones preferidas se dirigen a métodos para producir productos de proteína de Factor IX recombinante biológicamente activos, mediante un procedimiento que implica una o más de las siguientes etapas:

- (a) transfectar una célula de mamífero con un gen que codifica la proteína de Factor IX unida de forma operable a un promotor;
- 5 (b) seleccionar células que expresan altos niveles del producto de proteína de Factor IX;
- (c) transfectar las células seleccionadas con uno o más factores de procesamiento unidos de forma operable a un promotor;
- (d) repetir la etapa (b);
- (e) opcionalmente, repetir las etapas (a) y/o (c) seguido de (b);
- 10 (f) clonar las células seleccionadas; y
- (g) amplificar las células clonadas; y
- (h) cosechar el producto de las células clonadas en una cantidad de al menos 15 mg/L de proteína de Factor IX recombinante biológicamente activa.

15 Aspectos, características y ventajas adicionales de esta invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas que siguen.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de esta invención se describirán ahora con referencia a los dibujos de realizaciones preferidas que se pretende que ilustren y no que limiten la invención.

20 La Figura muestra la cantidad total de Factor IX producido por clon después de la transfección de un gen de Factor IX tipo salvaje en células CHO. El gen del Factor IX estaba bajo el control del promotor CHEF-1. Las células se dejaron crecer en suero al 5% durante 14 días. El medio de cultivo celular se cosechó y la cantidad total de antígeno de Factor IX en µg por mL se cuantificó por un método ELISA de Factor IX.

Descripción detallada

25 Las realizaciones preferidas de la invención se dirigen a métodos para crear una célula diseñada genéticamente que produzca un alto porcentaje de proteína de Factor IX biológicamente activa en cantidades adecuadas para la comercialización mundial. Las realizaciones de la invención se describen con respecto a la producción de Factor IX. Sin embargo, los métodos descritos son aplicables a todas las proteínas dependientes de vitamina K.

30 Para producir compuestos bioterapéuticos de proteína dependiente de vitamina K de bajo coste para uso comercial en una base mundial, una célula diseñada genéticamente debe crearse para la producción que (1) produce grandes cantidades de la cadena polipeptídica que tiene la estructura primaria deseada y (2) es capaz de realizar de forma eficiente todas las modificaciones post-traduccionales esenciales que se necesitan para producir un producto biofarmacéutico sintético totalmente funcional.

35 Como se usa en esta memoria, el término "uso comercial" significa un Factor IX u otra proteína dependiente de vitamina K que, cuando se produce a partir de células de cultivo tisular, es al menos activo biológicamente al 10% y es capaz de producción a un nivel de al menos aproximadamente 30 mg/L.

40 Como se usa en esta memoria "actividad biológica" se determina con referencia a un patrón de Factor IX derivado del plasma humano, tal como MONONINE® (ZLB Behring). La actividad biológica del patrón de Factor IX se toma como que es 100%. Preferiblemente, el Factor IX según las realizaciones de la invención tiene al menos 20% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 25% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 30% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 35% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 40% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 45% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 50% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 55% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 60% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 65% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 70% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 75% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 80% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 85% de la actividad del patrón de Factor IX, más preferiblemente al menos 90% de la actividad del patrón de Factor IX.

50 La Factor IX según la invención es capaz de la producción a un nivel de al menos aproximadamente 20 mg/L, preferiblemente al menos aproximadamente 30 mg/L, más preferiblemente al menos aproximadamente 40 mg/L, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 60

5 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 70 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 80 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 100 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 110 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 120 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 130 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 140 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 150 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 160 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 170 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 180 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 190 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 200 mg/L, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 210 mg/L de proteína dependiente de vitamina K biológicamente activa.

10 El término "factor de procesado" es un término amplio que incluye cualquier proteína, péptido, cofactor no peptídico, sustrato o ácido nucleico que promueva la formación de una proteína dependiente de vitamina K funcional. Ejemplos de dichos factores de procesado incluyen, aunque no están limitados a PACE, VKOR y VKGC.

15 "Clonación de dilución límite" tiene su significado normal y habitual y se refiere a un procedimiento para obtener una población de célula monoclonal partiendo de una masa de células policlonales. El cultivo de partida (policlonal) se diluye en serie hasta que se obtiene un cultivo monoclonal.

20 El Instituto de Genética ha mostrado que la producción de grandes cantidades de proteínas dependientes de vitamina K es posible en células CHO diseñadas genéticamente (Patente de EE.UU. núm. 4.770.999), aunque el porcentaje de proteína totalmente funcional es muy bajo. Un objeto de la presente invención es una célula CHO diseñada genéticamente que produce grandes cantidades de proteínas dependientes de vitamina K por la que el porcentaje de proteína totalmente funcional es adecuada para producir un producto biofarmacéutico de bajo coste para uso comercial en una base mundial.

25 Stafford (Patente de EE.UU. núm. 5.268.275) ha mostrado que la producción de un alto porcentaje de proteínas dependientes de vitamina K gamma-carboxiladas es posible en células HEK 293 diseñadas genéticamente que se crean para co-expresar enzimas que mejoran la carboxilación de proteína dependientes de vitamina K, aunque la cantidad total de proteína gamma-carboxilada que se produce es muy baja. Como se describe en esta memoria es una célula HEK 293, CHO u otra, diseñada genéticamente, que produce grandes cantidades de proteínas dependientes de vitamina K por las que el porcentaje de proteína totalmente funcional es adecuado para producir un producto biofarmacéutico de bajo coste para uso comercial en una base mundial.

30 Muchos métodos de transfección para crear células diseñadas genéticamente que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes se conocen bien. Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, se fabrican de forma rutinaria a partir de células diseñadas genéticamente que expresan niveles de proteína en exceso de 1000 mg/L. La presente invención no es dependiente de ningún método de transfección específico que pudiera usarse para crear una célula diseñada genéticamente.

35 Muchos vectores de expresión pueden usarse para crear células diseñadas genéticamente. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes después de la amplificación de células transfectadas bajo una variedad de condiciones que favorecen las células seleccionadas, de alta expresión. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes sin la necesidad de amplificación bajo presión de selección. La presente invención no es dependiente del uso de ningún vector de expresión específico.

40 Para crear una célula diseñada genéticamente para producir grandes cantidades de una proteína dependiente de vitamina K dada, las células se transfectan con un vector de expresión que contiene el ADNc que codifica la proteína. La presente invención necesita que se cree una célula transfectada que sea capaz, bajo condiciones de crecimiento optimizadas, de producir un mínimo de 20 mg/L de la proteína dependiente de vitamina K diana. Pueden alcanzarse mayores niveles de producción de la proteína dependiente de vitamina K diana y podrían ser útiles en la presente invención. Sin embargo, el nivel óptimo de producción de la proteína dependiente de vitamina K diana es un nivel a o por encima de 20 mg/L que puede obtenerse en una forma funcional significativamente mejorada cuando la proteína diana se expresa con enzimas co-transfectadas seleccionadas que provocan la apropiada modificación post-traducciona

45 Para crear una célula diseñada genéticamente que sea capaz de realizar eficientemente todas las modificaciones post-traduccionales esenciales que se necesitan para producir un producto biofarmacéutico sintético totalmente funcional, las enzimas seleccionadas se co-transfectan junto con la proteína dependiente de vitamina K. El Instituto de Genética ha mostrado que las células CHO diseñadas genéticamente que producen grandes cantidades de proteína dependiente de vitamina K (Factor IX) no se han procesado apropiadamente para eliminar la región propéptido antes de la secreción. En este caso, el Instituto de Genética ha encontrado que la co-expresión de una enzima (PACE), conocida por eliminar la región de propéptido de las proteínas dependientes de vitamina K, elimina esencialmente la deficiencia en los niveles celulares intrínsecos de la enzima. Sin embargo, el Instituto de Genética ha mostrado también que las deficiencias en los niveles intrínsecos de otras enzimas dan por resultado que la mayoría de la proteína dependiente de vitamina K producida por células CHO diseñadas genéticamente no sean

funcionales debido al bajo porcentaje de gamma-carboxilación post-traducciona del dominio gla (Bond, M., Jankowski, M., Patel, H., Karnik, S., Strand, A., Xu, B., et al. [1998] Biochemical characterization of recombinant factor IX. Semin. Hematol. 35 [2 Supl. 2], 11-17).

5 El método de la presente invención implica la primera selección de una célula que puede diseñarse genéticamente para producir grandes cantidades de una proteína dependiente de vitamina K tal como Factor IX.

La célula puede seleccionarse de una variedad de fuentes, aunque es por otro lado una célula que puede transfectarse con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico, preferiblemente un ADNc de una proteína dependiente de vitamina K.

10 A partir de un estanque de células transfectadas, se seleccionan clones que producen cantidades de la proteína de Factor IX sobre un intervalo (Intervalo Diana) que se extiende desde el mayor nivel al menor nivel que es mínimamente aceptable para la producción de un producto comercial. Los clones celulares que producen cantidades de proteína de Factor IX en el Intervalo Diana pueden combinarse para obtener un único estanque o múltiples sub-estanques que dividen los clones en poblaciones de clones que producen niveles alto, medio o bajo de la proteína dependiente de vitamina K en el Intervalo Diana.

15 Se considera que está dentro del alcance de la presente invención el que las células transfectadas que producen una proteína de Factor IX en el Intervalo Diana pueden analizarse para determinar la extensión a la que se produce la proteína totalmente funcional. Dicho análisis proporcionará conocimiento en las deficiencias específicas de enzima que limitan la producción de proteína totalmente funcional. Además, se anticipa que el análisis de sub-estanques que consisten en clones celulares que producen niveles alto, medio o bajo de la proteína dependiente de vitamina K en el Intervalo Diana proporcionarán conocimiento en las deficiencias de enzima específicas que limitan la producción de proteína totalmente funcional a niveles variables de producción de la proteína dependiente de vitamina K. Dicho análisis, si se hace en un único estanque de clones celulares o en sub-estanques, revelarían las deficiencias enzimáticas específicas que deben eliminarse para producir proteína totalmente funcional.

20 Para eliminar las deficiencias enzimáticas en un estanque de clones transfectados que limita la producción de proteína dependiente de vitamina K totalmente funcional en el Intervalo Diana, las realizaciones de la presente invención proporcionan la transfección del estanque de células con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico, preferiblemente un ADNc para una proteína que, cuando se expresa por un clon celular, mitigará la deficiencia enzimática en total o en parte. En realizaciones preferidas, se contempla además que más de una deficiencia enzimática puede mitigarse o esa mitigación de una deficiencia en modificación post-traducciona de la proteína dependiente de vitamina K necesita la presencia de las actividades de más de una enzima o proteína u otro factor de procesado que puede proporcionarse en el método de la presente invención mediante la transfección simultánea o posterior (secuencial) de los clones celulares con vectores de expresión adicionales que contienen ADNc para proteínas dadas.

35 La célula huésped puede transfectarse primero con gen(es) que codifica(n) uno o más factores de procesado y posteriormente transfectarse con un gen que codifica una proteína de Factor IX. En algunas realizaciones, la célula huésped se transfecta primero con un gen que codifica una proteína de Factor IX y posteriormente se transfecta con uno o más factores de procesado. Opcionalmente, la célula huésped puede transfectarse con el(los) gen(es) para el(los) factor(es) de procesado o con el gen para la proteína de Factor IX que es igual o esencialmente igual que un transgen temprano. Después de cada ronda de transfección, se seleccionan clones que expresan niveles óptimos del transgen.

Una proteína tal tendría la actividad enzimática de epóxido reductasa de vitamina K (VKOR). Otra de tal enzima tendría la actividad enzimática de gamma-glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC).

45 Se describe en esta memoria un método para identificar las necesidades de transfección de proteína mínimas para obtener un alto porcentaje de proteína de Factor IX totalmente funcional a partir de un clon celular que produce la proteína de Factor IX en una cantidad en el Intervalo Diana.

50 En realizaciones preferidas de la presente invención, estanques de clones celulares que producen una proteína de Factor IX en el Intervalo Diana se transfectan posteriormente para proporcionar una proteína específica o proteínas múltiples en varias combinaciones. Los estanques transfectados de clones celulares se analizan entonces para determinar los porcentajes relativos de proteína de Factor IX totalmente funcional que se producen actualmente por estanques transfectantes que co-expresan las proteínas varias. El estanque transfectante que produce el mayor porcentaje de proteína de Factor IX totalmente funcional con el número mínimo de proteínas co-expresadas, se selecciona para clonaje posterior.

55 En realizaciones preferidas de la presente invención, el estanque transfectante seleccionado se clona para determinar el nivel óptimo de producción de proteína de Factor IX totalmente funcional que se alcanza por co-expresión de proteína(s) adicional(es). Se contempla que porcentajes superiores de proteína de Factor IX totalmente funcional se producirá por clones celulares que producen cantidades totales menores de la proteína de Factor IX en el Intervalo Diana. En algunas realizaciones, algunos clones celulares pueden ser superproductores de proteína de

Factor IX sin mejoras significativas en el procesado post-traduccional. Sin embargo, dichas líneas superproductoras producen cantidades usables de proteína funcional cuando el nivel de producción total es alto. En realizaciones preferidas, el nivel óptimo de producción será el nivel mayor de proteína de Factor IX funcional.

5 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 2ª ed (1989); "DNA Cloning", Vols. I y II (D. N Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); "Transcription and Translation" (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney ed. 1986); "Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); la serie, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), particularmente los Vols. 154 y 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. H. Miller y M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology", Mayer y Walker, eds. (Academic Press, Londres, 1987); Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", 2ª ed. 1987 (Springer-Verlag, N.Y.); y
10 "Handbook of Experimental Immunology" Vols I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds. 1986).

Modificación del propéptido

En algunas realizaciones, la γ -carboxilación se aumenta sustituyendo la secuencia de propéptido nativo con una secuencia de propéptido que tiene una menor afinidad por la gamma-carboxilasa como se trata en la Solicitud de EE.UU. núm. 2003/0220247. Las secuencias de propéptido útil incluyen formas alteradas de secuencias tipo salvaje o secuencias de propéptido, o combinaciones de los mismos, para proteínas dependientes de vitamina K heterólogas. La secuencia de propéptido en proteínas dependientes de vitamina K es el elemento de reconocimiento para la enzima que dirige la gamma-carboxilación de la proteína. Las proteínas dependientes de vitamina K no son totalmente funcionales a menos que comprendan un alto porcentaje de restos gamma-carboxilados. Así, es importante cuando se generan versiones recombinantes de estas proteínas que los mecanismos se ponen en el sitio para asegurar gamma-carboxilación total de los mismos.
20

El alineamiento secuencial de varias secuencias de propéptido se muestra en la FIG. 3 del documento US 2003/0220247. Así, los propéptidos que son útiles en la presente invención son aquellos que tienen las secuencias mostradas en la FIG. 3 en donde una secuencia de 18 aminoácidos de varios propéptidos útiles se muestra junto con las afinidades relativas de estos propéptidos para gamma carboxilasa. Un propéptido de baja afinidad puede generarse modificando cualquiera de aminoácidos -9 o -13 en o bien protrombina o proteína C. Las modificaciones preferidas incluyen la sustitución de un residuo de 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 del grupo que consiste en Factor IX alterado, o un propéptido inalterado en combinación con la proteína de Factor IX maduro que no es nativo a la secuencia de propéptido elegido.
30

El término "proteína totalmente gamma-carboxilada" se usa en esta memoria para referirse a una proteína en donde al menos aproximadamente 80% de los aminoácidos que deberían gamma-carboxilarse están carboxilados. Preferiblemente, al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 99% de los aminoácidos que se gamma-carboxilarían están gamma-carboxilados.
35

40 Enzima que convierte aminoácidos básicos pareados (PACE)

Como se usa en esta memoria, el término "PACE" es un acrónimo para enzima que convierte (o escinde) aminoácidos básicos pareados. PACE, originalmente aislado de una línea celular de hígado humano, es una endopeptidasa tipo subtilisina, es decir, una enzima que escinde propéptido que muestra especificidad para la escisión en residuos básicos de un polipéptido, por ejemplo, -Lys-Arg-, -Arg-Arg, o -Lys-Lys-. PACE se estimula por iones de calcio; y se inhibe por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Una secuencia de ADN que codifica PACE (o furina) aparece en la FIG. 1 [SEQ ID NO:1] de la Patente de EE.UU. núm. 5.460.950, que se incorpora en esta memoria por referencia.
45

La co-expresión de PACE y una proproteína que necesita el procesado para la producción de la proteína madura da por resultado expresión de alto nivel de la proteína madura. Adicionalmente, la co-expresión de PACE con proteínas que necesitan γ -carboxilación para actividad biológica permite la expresión de rendimientos aumentados de proteínas maduras funcionales, biológicamente activas, en células eucariotas, preferiblemente de mamífero.
50

Epóxido reductasa dependiente de vitamina K

La epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) es importante para las proteínas dependientes de vitamina K porque la vitamina K se convierte a epóxido de vitamina K durante las reacciones en que es un cofactor. La cantidad de vitamina K en la dieta humana está limitada. Por lo tanto, el epóxido de vitamina K debe convertirse de nuevo a vitamina K por VKOR para evitar la disminución. Consecuentemente, la co-transfección con VKOR proporciona suficiente vitamina K para el apropiado funcionamiento de las enzimas dependientes de vitamina K tal
55

como la γ -glutamyl-carboxilasa dependiente de vitamina K (VKCG). El apropiado funcionamiento de VKCG dependiente de vitamina K es esencial para la apropiada γ -carboxilación del dominio gla de los factores de coagulación dependientes de vitamina K.

Gamma carboxilasa dependiente de vitamina K

- 5 La γ -glutamyl-carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) es una enzima ER implicada en la modificación de post-traducción de proteínas dependientes de vitamina K. La VKGC incorpora CO₂ en el ácido glutámico para modificar múltiples residuos en la proteína dependiente de vitamina K en aproximadamente 40 residuos del propéptido. La pérdida de tres carboxilaciones disminuye marcadamente la actividad de proteínas dependientes de vitamina K tal como los factores de coagulación dependientes de vitamina K. La secuencia de ADNc para la γ -glutamyl-carboxilasa dependiente de vitamina K humana se describe por la Patente de EE.UU. núm. 5.268.275. La secuencia se proporciona en SEQ ID NO: 15 de la Patente de EE.UU. núm. 5.268.275.

Técnicas de ingeniería genética

- 15 La producción de genes clonados, ADN recombinante, vectores, célula huésped transformadas, proteínas y fragmentos de proteína por ingeniería genética se conoce bien. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 4.761.371 de Bell et al. en Col. 6 línea 3 a Col. 9 línea 65; Patente de EE.UU. núm. 4.877.729 de Clark et al. en Col. 4 línea 38 a Col. 7 línea 6; Patente de EE.UU. núm. 4.912.038 de Schilling en Col. 3 línea 26 a col. 14 línea 12; y la Patente de EE.UU. núm. 4.879.224 de Wallner en Col. 6 línea 8 a Col. 8 línea 59.

- 20 Un vector es una construcción de ADN replicable. Los vectores se usan en esta memoria para amplificar el ADN que codifica el Factor IX y/o para expresar el ADN que codifica el Factor IX. Un vector de expresión es una construcción de ADN replicable en que una secuencia de ADN que codifica el Factor IX está unida de forma operable a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la proteína de Factor IX en un huésped adecuado. La necesidad de dichas secuencias de control variará dependiendo del huésped seleccionado y el método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión ribosómica de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de transcripción y traducción.

- 25 Los vectores de amplificación no necesitan dominios de control de expresión. Todo lo que se necesita es la capacidad de replicar en un huésped, normalmente otorgada por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

- 30 Los vectores comprenden plásmidos, virus (por ejemplo, adenovirus, citomegalovirus), fagos y fragmentos de ADN integrables (es decir, fragmentos integrables en el genoma del huésped por recombinación). El vector replica y funciona independientemente del genoma huésped, o puede, en algunos ejemplos, integrarse en el genoma en sí mismo. Los vectores de expresión contendrían un promotor y sitios de unión al ARN que se unen de forma operable al gen a expresar y son operables en el organismo huésped.

- 35 Las regiones de ADN se unen de forma operable o se asocian de forma operable cuando se relacionan de forma funcional las unas a las otras. Por ejemplo, un promotor se une de forma operable a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une de forma operable a una secuencia de codificación si se coloca de manera que permita la traducción.

Las células huésped transformadas son células que se han transformado o transfectado con uno o más vectores de proteína dependiente de vitamina K construidos usando técnicas de ADN recombinante.

- 40 Expresión de proteínas múltiples

- Las realizaciones de la invención están dirigidas a proveer a la célula con las enzimas y cofactores necesarios para procesar proteínas de Factor IX de manera que se alcancen mayores rendimientos de proteínas biológicamente activas. Cuando se producen niveles adecuados de proteínas totalmente funcionales por una célula recombinante, las largas etapas de purificación diseñadas para eliminar la proteína inútil, parcialmente modificada, o no modificada, del producto deseado se evitan. Esto disminuye el coste de producción y elimina el material inactivo que puede tener efectos secundarios indeseados para el paciente.

- 50 En realizaciones preferidas, los métodos para producir proteínas de Factor IX por co-expresión con VKGC y VKOR pueden incluir las siguientes técnicas. Primero, un único vector que contiene secuencias de codificación para más de una proteína y una proteína de Factor IX pueden insertarse en una célula huésped seleccionada. PACE y una proteína de Factor IX pueden insertarse en una célula huésped seleccionada. De forma alternativa, dos o más vectores separados que codifican una proteína de Factor IX más una o más proteínas distintas, pueden insertarse en un huésped. En el cultivo bajo condiciones adecuadas para la célula huésped seleccionada, los dos o más polipéptidos se producen e interactúan para proporcionar la escisión y modificación de la pro-proteína en la proteína madura.

Otra alternativa es el uso de dos células huésped transformadas en donde una célula huésped expresa la proteína de Factor IX y la otra célula huésped expresa uno o más de VKGC y VKOR que se secretarán en el medio. Estas células huésped pueden co-cultivarse en condiciones que permiten la expresión y secreción o liberación de la proteína de Factor IX recombinante y los polipéptidos recombinantes co-expresados, la gamma-carboxilación de glutamatos N-terminales.

En algunos ejemplos, puede ser deseable tener una pluralidad de copias, dos o más, del gen que expresa la proteína de Factor IX en relación a los demás genes, o viceversa. Esto puede conseguirse en una variedad de formas. Por ejemplo, una puede usar vectores o plásmidos separados, donde el vector que contiene la proteína de Factor IX que codifica el polinucleótido tiene un mayor número de copias que el vector que contiene las demás secuencias de polinucleótido, o viceversa. En esta situación, sería deseable tener diferentes marcadores seleccionables en los dos plásmidos, para así asegurar el mantenimiento continuado de los plásmidos en el huésped. De forma alternativa, uno o ambos genes podrían integrarse en el genoma huésped, y uno de los genes podría asociarse con un gen de amplificación (por ejemplo, dhfr o uno de los genes de metalotioneína).

De forma alternativa, uno podría emplear dos regiones reguladoras transcripcionales que tienen diferentes velocidades de iniciación transcripcional, proporcionando la expresión mejorada de la proteína de Factor IX o la expresión de cualquiera de los demás polipéptidos del factor de procesado, respecto a la proteína de Factor IX. Como otra alternativa, uno puede usar diferentes promotores, donde un promotor proporciona un bajo nivel de expresión constitutiva de la proteína de Factor IX, mientras el segundo promotor proporciona un alto nivel de expresión inducida de los demás productos. Una amplia variedad de promotores se conocen para las células huésped seleccionadas, y pueden seleccionarse fácilmente y emplearse en la invención por un experto en la técnica tal como promotores CMV, MMTV, SV 40 o SR α que son promotores de mamíferos bien conocidos.

En una realización preferida, se usa un promotor para el factor de alargamiento - 1 α de hámster chino (CHEF1) para proporcionar alto nivel de expresión de un factor de coagulación de Factor IX y/o factor(es) de procesado. El vector CHEF1 se usa como se describe en Deer, et al. (2004) "High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese Hamster EF-1 α gene" Biotechnol. Prog. 20:880-889 y en la Patente de EE.UU. núm. 5.888.809. El vector CHEF1 utiliza las secuencias de flaqueo 5' y 3' del EF-1 α de hámster chino. La secuencia promotora CHEF1 incluye aproximadamente 3,7 kb de ADN que se extiende desde un sitio de restricción Spel al codón de metionina de inicio (ATG) de la proteína EF-1 α . La secuencia de ADN se presenta en SEQ ID NO: 1 de la Patente de EE.UU. núm. 5.888.809.

La producción de Factor IX biológicamente activo, se maximiza mediante sobreexpresión de uno o más de VKOR y VKGC y/o por modificación de la región gla para maximizar la γ -carboxilación. Esto es, los componentes que limitan la velocidad se expresan en cantidad suficiente para que el sistema entero opere para producir una cantidad viable comercialmente de proteína de Factor IX.

Células huésped

Células huésped adecuadas incluyen células procariotas, levadura o eucariotas superiores tales como células de mamífero y células de insecto. Las células derivadas de organismos multicelulares son un huésped particularmente adecuado para la síntesis de proteína dependiente de vitamina K recombinante, y se prefieren particularmente las células de mamífero. La propagación de dichas células en cultivo celular se ha vuelto un procedimiento rutinario (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores (1973)). Ejemplos de líneas celulares huésped útiles son células VERO y HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y líneas celulares WI138, HEK 293, BHK, COS-7, CV y MDCK. Los vectores de expresión para dichas células incluyen normalmente (si fuera necesario) un origen de replicación, un promotor situado corriente arriba del ADN que codifica la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K para expresarse y asociado de forma operativa con eso, junto con un sitio de unión de ribosoma, un sitio de empalme de ARN (si se usa ADN genómico que contiene un intrón), un sitio de poliadenilación, y una secuencia de terminación transcripcional. En una realización preferida, la expresión se lleva a cabo en células de ovario de hámster chino (CHO) usando el sistema de expresión de la Patente de EE.UU. núm. 5.888.809.

Las secuencias de control transcripcional y traduccional en vectores de expresión a usar en la transformación de células de vertebrados se proporcionan habitualmente por fuentes virales. Por ejemplo, promotores usados normalmente se derivan de polioma, Adenovirus 2 y Virus de simio 40 (SV40). Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 4.599.308.

Un origen de replicación puede proporcionarse mediante la construcción del vector para incluir un origen exógeno, tal como puede derivarse de SV 40 u otra fuente viral (por ejemplo, Polioma, Adenovirus, VSV o BPV), o puede proporcionarse mediante el mecanismo de replicación cromosómica de la célula huésped. Si el vector se integra en el cromosoma de célula huésped, lo último es a menudo suficiente.

Más que usar vectores que contienen orígenes virales de replicación, se puede transformar células de mamífero mediante el método de cotransformación con un marcador seleccionable y el ADN para la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados son dihidrofolato reductasa (DHFR) o timidina quinasa. Este método se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. núm. 4.399.216.

Otros métodos adecuados para la adaptación a la síntesis de proteína(s) dependiente(s) de vitamina K en cultivo de células de vertebrados recombinante incluyen los descritos en M-J. Gething et al., *Nature* 293, 620 (1981); N. Mantei et al., *Nature* 281, 40; A. Levinson et al., Solicitudes EPO núms. 117.060A y 117.058A.

5 Las células huésped tales como células de insecto (por ejemplo, células cultivadas de *Spodoptera frugiperda*) y los vectores de expresión tales como el vector de expresión de baculovirus (por ejemplo, vectores derivados de *Autographa californica* MNPV, *Trichoplusia ni* MNPV, *Rachiplusia ou* MNPV o *Galleria ou* MNPV) pueden emplearse en la realización de la presente invención, como se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 4.745.051 y 4.879.236 de Smith et al. En general, un vector de expresión de baculovirus comprende un genoma de baculovirus que contiene el gen a expresar insertado en el gen de polihedrina en una posición que oscila de la señal de partida transcripcional de polihedrina al sitio de partida ATG y bajo el control transcripcional de un promotor de polihedrina de baculovirus.

10 Las células huésped procariotas incluyen organismos gram negativo o gram positivo, por ejemplo *Escherichia coli* (*E. coli*) o Bacilos. Células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. Células huésped ejemplares son *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E. coli* 294 (ATCC 31.446). Una amplia variedad de vectores procariotas y microbianos adecuados están disponibles. La *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322. Los promotores más normalmente usados en vectores de expresión microbiana recombinantes incluyen los sistemas promotores betalactamasa (penicilinasa) y lactosa (Chang et al., *Nature* 275, 615 (1978); y Goeddel et al., *Nature* 281, 544 (1979)), un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980) y Solicitud de publicación EPO núm. 36.776) y el promotor *tac* (H. De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21 (1983)). El promotor y la secuencia Shine-Dalgarno (para la expresión de huésped procariota) se unen de forma operable al ADN que codifica la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K, es decir, se colocan de manera que promueven la transcripción del ARN mensajero de proteína(s) dependiente(s) de vitamina K a partir del ADN.

25 Los microbios eucariotas tales como cultivos de levadura pueden transformarse también con vectores que codifican proteína dependiente de vitamina K, véase por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 4.745.057. El *Saccharomyces cerevisiae* es el usado más normalmente entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores, aunque un número de otras cepas están normalmente disponibles. Los vectores de levadura pueden contener un origen de replicación a partir del plásmido de levadura de 2 micras o una secuencia de replicado de forma autónoma (ARS), un promotor, ADN que codifica una o más proteínas dependientes de vitamina K, secuencias de poliadenilación y terminación de transcripción, y un gen de selección. Un plásmido ejemplar es YRp7, (Stinchcomb et al., *Nature* 282, 39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7, 141 (1979); Tschemper et al., *Gene* 10, 157 (1980)). Secuencias de promoción adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968); y Holland et al., *Biochemistry* 17, 4900 (1978)). Vectores y promotores adecuados para usar en la expresión de levadura se describen adicionalmente en R Hitzeman et al., Publicación EPO núm. 73.657.

30 Los genes clonados empleados en la presente invención pueden codificar cualquier especie de origen, que incluye ratón, rata, conejo, gato, porcina y humana, aunque preferiblemente codifican proteínas de Factor IX de origen humano. El ADN que codifica las proteínas de Factor IX que es hibridable con ADN que codifica proteínas descritas en esta memoria se abarca también. La hibridación de dichas secuencias puede llevarse a cabo en condiciones de severidad reducida o incluso condiciones severas (por ejemplo, condiciones representadas por una severidad de lavado de NaCl 0,3M, citrato sódico 0,03M, SDS al 0,1% a 60°C o incluso 70°C a ADN que codifica la proteína dependiente de vitamina K descrita en esta memoria en un ensayo de hibridación in situ estándar. Véase J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)).

45 Como se anota anteriormente, realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan métodos para proporcionar proteínas dependientes de vitamina K funcionales por métodos que incluye carboxilación de los residuos glu N terminales. La estrategia puede incluir co-expresar proteína dependiente de vitamina K junto con VKOR y VKGC en una única célula huésped. En general, el método comprende cultivar una célula huésped que expresa una proteína dependiente de vitamina K y proteínas de soporte; y después cosechar las proteínas del cultivo. Mientras algunas células huésped pueden proporcionar alguna proteína dependiente de vitamina K, VKOR y VKGC a niveles basales, en realizaciones preferidas, el vector de ADN que codifica VKGC y VKOR se incluye para mejorar la carboxilación. El cultivo puede llevarse a cabo en un recipiente de fermentación adecuado, con un medio de crecimiento y bajo condiciones apropiadas para la expresión de la(s) proteína(s) dependiente(s) de vitamina K por la célula huésped particular elegida. La proteína dependiente de vitamina K cosechada del cultivo se encuentra que se carboxila debido a la expresión de las proteínas de soporte en la células huésped. En realizaciones preferidas, la proteína dependiente de vitamina K puede recogerse directamente del medio de cultivo, o las células huésped se lisan y la proteína dependiente de vitamina K se recoge de las mismas. En realizaciones preferidas, la proteína dependiente de vitamina K puede entonces purificarse adicionalmente de acuerdo con técnicas conocidas.

60 Como una proposición general, la pureza de la proteína recombinante producida según la presente invención será preferiblemente una pureza apropiada conocida por el trabajador experto en la técnica para llevar a la actividad y estabilidad óptima de la proteína. Por ejemplo, cuando la proteína recombinante es Factor IX, el Factor IX es preferiblemente de pureza ultra-alta. Preferiblemente, la proteína recombinante se ha sometido a múltiples etapas de

purificación cromatográfica, tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y preferiblemente cromatografía de inmunoafinidad para eliminar sustancias que provocan fragmentación, activación y/o degradación de la proteína recombinante durante la fabricación, almacenaje y/o uso. Ejemplos ilustrativos de dichas sustancias que se eliminan preferiblemente por purificación incluyen trombina y Factor IXa; otros contaminantes de proteína, tales como enzimas de modificación tipo PACE/furina, VKOR y VKGC; proteínas, tales como proteínas de hámster, que se liberan en el medio de cultivo tisular a partir de las células de producción durante la producción de proteína recombinante, contaminantes que no son proteína, tales como lípidos; y mezclas de contaminantes de proteína y que no son proteína, tales como lipoproteínas. Los procedimientos de purificación para las proteínas dependientes de vitamina K se conocen en la técnica. Por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. núm. 5.714.583.

Las secuencias de codificación de ADN de Factor IX, junto con vectores y células huésped para la expresión de las mismas, se describen en la Solicitud de Patente Europea 373012, Solicitud de Patente Europea 251874, Solicitud de Patente PCT 8505376, Solicitud de Patente PCT 8505125, Solicitud de Patente Europea 162782 y Solicitud de Patente PCT 8400560. Los genes para otros factores de coagulación se conocen también y están disponibles, por ejemplo, Factor II (Núm. de Acceso NM_000506), Factor VII (Núm. de Acceso NM_019616) y Factor X (Núm. de Acceso NM_000504).

Ejemplos

Ejemplo 1. Transfección primaria de células CHO con gen de Factor IX

Un gen de Factor IX tipo salvaje se transfectó en células CHO por dilución límite en platos de 96 pocillos. El gen de Factor IX estaba bajo el control del promotor CHEF-1. Las células se dejaron crecer en suero al 5% durante 14 días. El medio de cultivo celular se cosechó y la cantidad total de antígeno de Factor IX en µg por mL se cuantificó por un método ELISA de Factor IX. Más de 150 clones se evaluaron y la cantidad total de Factor IX producido por clon se presenta en la Figura 1.

Las células CHO transfectadas con el gen de Factor IX produjeron antígeno de Factor IX que se detectó por ELISA de Factor IX. La cantidad varió significativamente entre clones. El intervalo de la producción total de proteína después de 14 días en cultivo fue entre 0 y mayor que 1,6 µg/mL de medio de cultivo. Aunque no determinado en este experimento, el Factor IX producido en transfectantes primarios fue aproximadamente biológicamente activo al 20% (no se muestran datos) como se determina en un ensayo de coagulación APTT usando plasma deficiente en Factor IX. El antígeno de Factor IX puede producirse por lo tanto en células CHO después de la transfección de las células con Factor IX de tipo salvaje.

Ejemplo 2. Supertransfección de células CHO que producen Factor IX con genes VKGC y VKOR

Para aumentar el porcentaje de Factor IX activo producido en células CHO transfectadas con Factor IX, los transfectantes primarios se acumularon, se expandieron en cultivo tisular, y se supertransfectaron con vectores que contienen ADNc por enzimas enseñadas generalmente por ser importantes para la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K eficiente del Factor IX. Los clones que producen Factor IX se acumularon en un matraz de agitación y se supertransfectaron con ADNc por gamma-carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) y epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR). Las células supertransfectadas individualmente se hicieron crecer por dilución límite en platos de 96 pocillos en suero al 5% durante 14 días. La cantidad total de antígeno de Factor IX producido por mL se midió por ELISA de Factor IX. La cantidad de Factor IX activo se midió por un ensayo de coagulación APTT usando plasma deficiente en Factor IX como sustrato y Factor IX derivado de plasma como patrón.

Tabla 1. Supertransfección de clones de células CHO que producen Factor IX con VKGC y VKOR

Clon	Título (µg/mL)	Actividad FIX (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	FIX activo (µg/mL)	% de FIX activo
1	1,560	0,15	97	0,549	35
2	1,283	0,10	76	0,356	28
3	0,469	0,09	198	0,338	72
4	1,628	0,09	56	0,331	20
5	2,205	0,09	41	0,331	15
6	0,604	0,09	144	0,316	52
7	1,274	0,09	68	0,316	25

Clon	Título (µg/mL)	Actividad FIX (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	FIX activo (µg/mL)	% de FIX activo
8	0,811	0,09	105	0,309	38
9	0,827	0,08	100	0,302	36
10	0,954	0,07	77	0,265	28
11	0,177	0,03	186	0,120	68
12	0,340	0,06	171	0,211	62
13	0,121	0,02	165	0,073	60
14	0,272	0,04	143	0,142	52
15	0,169	0,02	142	0,087	52

5 Como se ve en la Tabla 1, se analizaron los resultados de 15 clones individuales. El antígeno de Factor IX varió entre 0,12 y 2,2 µg/mL. El porcentaje de Factor IX activo osciló entre 15 y 72%. Consecuentemente, la supertransfección de células que producen Factor IX con VKGC y VKOR aumenta significativamente el porcentaje de Factor IX activo que se produce por clones de células CHO específicos.

Notar que más antígeno se produce mientras la producción se aumenta. Por ejemplo, para platos de 6 pocillos, se produce aproximadamente 25 veces más de antígeno cuando se compara con platos de 96 pocillos. Consecuentemente, en platos de 6 pocillos los niveles de antígeno de Factor IX podrían esperarse que oscilen de 3-55 µg/ml.

10 Ejemplo 3. Producción a gran escala de grandes cantidades de Factor IX recombinante biológicamente activo

15 Para demostrar que las células CHO que producen Factor IX supertransfectadas con VKGC y VKOR pueden producir grandes cantidades de Factor IX biológicamente activo, dos clones aislados independientemente se hicieron crecer en biorreactores y la cantidad y calidad del producto de Factor IX se evaluaron después de purificar el material. Los biorreactores que contienen medio libre de suero se usaron para hacer crecer Clon 130 (biorreactor de 12 L) y Clon 44 (biorreactor de 10 L). Ambos de estos clones expresaron Factor IX humano, VKGC y VKOR. Los biorreactores se dejaron crecer durante 12 días sin cambio de medio. El fluido de cultivo tisular se separó de las células y el Factor IX se purificó por un conjunto estándar de columnas de cromatografía, dando por resultado proteína de Factor IX con más del 90% de pureza.

Tabla 2. Producción a gran escala de Factor IX recombinante biológicamente activo

Clon hecho crecer en biorreactor	Título total (mg/L)	% activo	Título activo (mg/L)
130	44	61	27
44	28	35	10

20 Como se presenta en la Tabla 2, grandes cantidades de antígeno de Factor IX se produjeron en ambos biorreactores. El Clon 130 produjo 44 mg de Factor IX por L de medio de cultivo y el Clon 44 produjo 28 mg de Factor IX por L. Consistente con los datos presentados anteriormente, el % de Factor IX activo se vio que estaba entre 35 y 61%. Consecuentemente, las células CHO que producen Factor IX, cuando se supertransfectan con las enzimas de modificación post-traducciona VKGC y VKOR, producen grandes cantidades de antígeno de Factor IX que contiene una cantidad significativa de Factor IX biológicamente activo.

Ejemplo 4. Re-transfección con VKOR de clones que producen Factor IX, VKGC y VKOR

30 Para determinar si es posible producir Factor IX recombinante biológicamente activo en células CHO transfectadas, los dos clones, 130 y 44; que produjeron Factor IX después de supertransfectarse con VKGC y VKOR, se volvieron a transfectar con VKOR. Los aislados individuales de Clones 130 y 44 se clonaron por dilución límite y se volvieron a transfectar con el ADNc para VKOR. Los clones se hicieron crecer en platos de 6 pocillos y las células se dejaron crecer durante 9 días hasta que fueron confluentes. El antígeno total de Factor IX (µg por mL) se midió por ELISA de Factor IX, y la actividad (U por mL) se determinó por un ensayo de coagulación APTT usando plasma deficiente en Factor IX.

35

ES 2 503 365 T3

Tabla 3. Re-transfección con VKOR de clones CHO que producen Factor IX, VKGC y VKOR

Clon	Título F-IX (Ug/mL)	Actividad de F-IX (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	% activo
130-1	2,7	0,55	199	80%
130-2	2,6	0,48	186	74%
130-3	2,6	0,55	209	84%
130-4	1,3	0,23	172	69%
130-5	1,7	0,38	229	91%
130-6	1,1	0,16	145	58%
130-7	1,7	0,29	172	69%
130-8	2,0	0,46	229	92%
130-9	2,4	0,49	206	82%
130-10	1,9	0,42	222	89%
130-11	1,9	0,40	212	85%
130-12	2,1	0,50	237	95%
130-13	2,2	0,48	223	89%
130-14	2,4	0,63	265	106%
130-15	2,2	0,44	196	78%
130-16	1,4	0,31	214	86%
130-17	1,8	0,34	185	74%
130-18	1,5	0,27	176	70%
44-1	3,0	0,45	147	59%
44-2	0,9	0,22	235	94%
44-3	2,2	0,21	92	37%
44-4	1,3	0,26	210	84%
44-5	1,6	0,36	230	92%
44-6	1,1	0,22	194	78%
44-7	1,4	0,23	165	66%
44-8	0,9	0,15	163	65%
44-9	1,7	0,33	197	79%
44-10	1,6	0,25	156	62%
44-11	2,3	0,45	199	80%
44-12	1,4	0,34	240	96%
44-13	1,6	0,21	132	53%
44-14	1,9	0,26	136	55%
44-15	1,8	0,45	250	100%
44-16	2,1	0,42	194	77%

5 Los resultados en la Tabla 3 muestran que los subclones tanto del Clon 130 como del Clon 44 produjeron cantidades significativas de antígeno de Factor IX, que oscilan de 0,9 a 3,0 µg/mL. Además, como una consecuencia de la re-transfección con VKOR, ambos clones dieron al menos un subclon que produjo 100% del Factor IX como proteína biológicamente activa, además de varios subclones con más del 90% de Factor IX activo. Estos datos sugieren que la adecuada co-expresión de VKGC y VKOR pueden facilitar la producción de Factor IX totalmente altamente activo o incluso totalmente activo en células CHO transfectadas con un ADNc de Factor IX tipo salvaje.

Ejemplo 5. Producción a gran escala de Factor IX biológicamente activo en células diseñadas genéticamente re-transfectadas con la enzima de modificación post-traduccional VKOR

10 Este experimento se diseñó para demostrar que las células CHO que producen Factor IX recombinante después de la transfección con VKGC y VKOR y se vuelven a transfectar con VKOR pueden producir grandes cantidades de Factor IX a escala de producción. Los aislados individuales de Clon 130 vueltos a transfectar con VKOR se hicieron crecer en matraces de agitación de 1,5 L (para representar la producción comercial) y se midieron el antígeno de Factor IX y la actividad biológica. Los subclones individuales del clon 130 descritos en el Ejemplo 4 anterior (clon CHO transfectado con Factor IX, VKGC y VKOR y posteriormente vuelto a transfectar con VKOR) se aislaron por dilución límite en platos de microtítulo de 6 pocillos y después se sembraron en matraces agitadores de 1,5 L. La producción de Factor IX en matraces agitadores de 1,5 L se conoce por reflejar las condiciones de producción de biorreactores de 15 L y más grandes (no se muestran datos). Las células se dejaron crecer en medio libre de suero durante 18 días, en cuyo punto se tomaron muestras y se evaluaron para antígeno de Factor IX por ELISA de Factor IX y para actividad biológica por ensayo de coagulación APTT usando plasma deficiente en Factor IX.

20 Tabla 4. Producción de grandes cantidades de Factor IX activo en células CHO transfectadas con Factor IX, VKGC y VKOR, y vueltas a transfectar con VKOR

Clon	Matraz	Título total (mg/L)	% activo	Título activo (mg/L)
130	A	42,0	46,0	19,3
	B	41,8	46,8	19,6
	Promedio	41,9 ± 0,1	46,4 ± 0,4	19,4 ± 0,1
130-6	A	45,1	49,5	22,3
	B	42,8	52,2	22,4
	Promedio	43,9 ± 1,1	50,9 ± 1,3	22,3 ± 0,1
130-16	A	41,5	48,7	20,2
	B	37,1	51,3	19,0
	Promedio	39,3 ± 2,2	50,0 ± 1,3	19,6 ± 0,6
130-17	A	52,0	57,9	30,1
	B	45,0	70,8	31,9
	Promedio	48,5 ± 3,5	64,3 ± 6,4	31,0 ± 0,9
130-19	A	53,8	52,6	28,3
	B	50,6	59,0	29,8
	Promedio	52,2 ± 1,6	55,8 ± 3,2	29,1 ± 0,8
130-31	A	45,7	47,9	21,9
	B	44,1	49,3	21,7
	Promedio	44,9 ± 0,8	48,6 ± 10,7	21,8 ± 0,1

25 Los datos para el Clon 130 en sí mismo y para cinco subclones se presentan en la Tabla 4. Grandes cantidades de antígeno de Factor IX se produjeron por todos los clones, oscilando de 39,3 a 52,2 mg de antígeno de Factor IX por litro de fluido de cultivo. El porcentaje de Factor IX activo fue también bastante alto, oscilando de 46,4% a 64,3%. La cantidad de Factor IX biológicamente activo producido fue también sorprendentemente alto oscilando de 19,4 a 31,0

mg/L. Consecuentemente, en sistemas de matraz agitador, que reflejan la producción de Factor IX en biorreactores a nivel comercial, pueden producirse grandes cantidades de antígeno de Factor IX y Factor IX activo en células que se han transfectado con Factor IX, VKGC, VKOR y posteriormente se han vuelto a transfectar con VKOR.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de proteína de Factor IX recombinante biológicamente activo, que comprende las etapas de:
 - 5 transfectar una célula CHO, con un gen que codifica el producto de proteína de Factor IX unido de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF-1), y al menos dos genes o bien de forma simultánea o secuencial; y
 - cosechar el producto de proteína de Factor IX,
 - 10 por lo que la célula produce producto de proteína de Factor IX biológicamente activo, como se mide con referencia al Factor IX estándar Mononine, en una cantidad de al menos 15 mg/L; y en donde los al menos dos genes comprenden un gen que codifica epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR), y un gen que codifica γ -glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC).
2. El método según la reivindicación 1, en donde al menos uno de los genes se sobre-expresa.
3. El método según la reivindicación 2, en donde el gen sobre-expresado se une de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1-a de hámster chino (CHEF1).
- 15 4. El método según la reivindicación 1, en donde al menos aproximadamente 75% de los residuos de ácido glutámico en el dominio gla del producto de proteína de Factor IX biológicamente activo están gamma carboxilados.
5. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde al menos 50%, al menos 70% o al menos 80% de la proteína de Factor IX es biológicamente activa.
- 20 6. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína de Factor IX biológicamente activa se produce en una cantidad de al menos 20 mg/L.
7. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la transfección es secuencial y en donde transfectar la célula de mamífero comprende además:
 - seleccionar células que expresan altos niveles del producto de proteína de Factor IX, VKOR O VKGC;
 - clonar las células seleccionadas; y
 - 25 amplificar las células clonadas.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la etapa de transfección con los al menos dos genes se realiza antes de la etapa de transfección con el gen que codifica la proteína de Factor IX.
9. El método según la reivindicación 7, en donde la etapa de transfección con el gen que codifica la proteína de Factor IX se realiza antes de la etapa de transfección con los al menos dos genes.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la célula CHO se selecciona para expresión de niveles endógenos de uno o más factores de procesado antes de la transfección.
11. Una célula CHO recombinante, que comprende un gen que codifica una proteína de Factor IX unida de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF-1) y al menos dos genes,
 - 35 en donde la célula produce proteína FIX biológicamente activa en una cantidad de al menos 15 mg/L, como se mide con referencia al Factor IX estándar Mononine,
 - en donde los al menos dos genes comprenden un gen que codifica epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) y un gen que codifica γ -glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC).
12. La célula recombinante según la reivindicación 11, en donde al menos un gen se sobre-expresa.
13. La célula recombinante según la reivindicación 12, en donde el producto génico sobre-expresado está unido de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF1).
- 40 14. Un método para producir un producto de proteína de Factor IX recombinante biológicamente activo, que comprende las etapas de:
 - (a) transfectar una célula CHO, con un gen que codifica la proteína de Factor IX unida de forma operable a un promotor de factor de alargamiento 1- α de hámster chino (CHEF1);
 - 45 (b) seleccionar células que expresan altos niveles del producto de proteína de Factor IX;

(c) transfectar las células seleccionadas con al menos dos genes, en donde los al menos dos genes comprenden un gen que codifica epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR), y un gen que codifica γ -glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC);

(d) repetir la etapa (b);

5 (e) opcionalmente, repetir las etapas (a) y/o (c) seguido por (b);

(f) clonar las células seleccionadas;

(g) hacer crecer las células clonadas; y

(h) cosechar el producto de proteína de Factor IX a partir de las células clonadas en una cantidad de al menos 15 mg/L.

Figura. Transfección de Factor IX primario de células CHO

