

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 246**

51 Int. Cl.:

C07K 14/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009** **E 09793957 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2310411**

54 Título: **Fibrinógeno recombinante**

30 Prioridad:

09.07.2008 EP 08159999

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

04.10.2016

73 Titular/es:

**PROFIBRIX BV (100.0%)
Zernikedreef 9
2333 CK Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**BOUT, ABRAHAM;
GRIMBERGEN, JOSEPH y
KOOPMAN, JACOB**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 585 246 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

Fibrinógeno recombinante

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al fibrinógeno recombinante, a los métodos para producirlo a altos niveles en células de mamíferos y a sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

10 El fibrinógeno es una glicoproteína soluble del plasma que se sintetiza en el cuerpo humano principalmente por las células del parénquima del hígado. Es una molécula dímera, que consta de dos pares de tres cadenas polipeptídicas denominadas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ , que están unidas por puentes disulfuro. Las tres cadenas polipeptídicas están codificadas por tres genes separados. La cadena de tipo nativo $\text{A}\alpha$ se sintetiza como un precursor de 625 aminoácidos y está presente en el plasma como una proteína de 610 aminoácidos, la $\text{B}\beta$ contiene 461 y la cadena γ 411 aminoácidos. Los tres polipéptidos se sintetizan individualmente a partir de 3 mRNAs. El conjunto de las tres cadenas componentes ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ) en su forma final como un dímero de seis cadenas ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, γ)₂ se produce en el lumen del retículo endoplásmico (ER).

15 El fibrinógeno circula en sangre a elevadas concentraciones (1-2 g/L) y manifiesta un alto grado de heterogeneidad. Se originan variantes debido a polimorfismos genéticos, diferencias en glicosilación y fosforilaciones, proteólisis (parcial) de la parte carboxi-terminal de la cadena $\text{A}\alpha$ y empalmes alternativos (para revisiones véase De Maat y Verschuur (2005) Curr. Opin. Hematol. 12, 377; Laurens y colaboradores (2006) J. Thromb Haemost. 4, 932; Henschen-Edman (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 936, 580). Se estima que en cada individuo circulan alrededor de un millón de diferentes moléculas de fibrinógeno. La mayoría de estas variantes, que representan sólo una pequeña porción del fibrinógeno total (en la mayoría de los casos no más de un pequeño porcentaje), difieren en función y estructura. La proteólisis de la parte carboxi-terminal de la cadena $\text{A}\alpha$ da lugar a las tres principales formas circulantes del fibrinógeno que tienen claramente diferentes pesos moleculares. El fibrinógeno es sintetizado en la forma de alto peso molecular (HMW; peso molecular 340 kDa); la forma predominante de las cadenas $\text{A}\alpha$ en la circulación contiene 610 aminoácidos). La degradación de una de las cadenas $\text{A}\alpha$ da formas de bajo peso molecular (LMW; MW= 305 kDa); la forma LMW' (270 kDa) es la variante donde ambas cadenas $\text{A}\alpha$ están parcialmente degradadas en el extremo carboxi. En sangre normal, 50 – 70% del fibrinógeno es HMW, 20 – 50% es fibrinógeno con una o dos cadenas $\text{A}\alpha$ degradadas (de Maat y Verschuur (2005) Curr. Opin. Hematol. 12, 377). Las variantes HMW y LMW' muestran claras diferencias en el tiempo de coagulación y en la estructura del polímero de fibrina (Hasegawa N, Sasaki S. (1990) Thromb. Res. 57, 183).

20 Variantes bien conocidas que son el resultado de empalmes alternativos son la variante llamada γ' y la variante Fib420.

35 La variante γ' representa aproximadamente el 8% del total de las cadenas γ . Consta de 427 aminoácidos en lugar de los 411 de la cadena γ más abundante; los cuatro aminoácidos C-terminales (AGDV) son remplazados por 20 aminoácidos que contienen 2 tirosinas sulfatadas. La cadena de fibrinógeno γ' no es capaz de unirse al receptor de fibrinógeno de plaquetas IIb β 3, que es crítico en la regulación de la agregación plaquetaria.

40 La variante Fib420, que tiene un peso molecular de 420 kDa, representa el 1-3% del fibrinógeno total circulante (de Maat y Verschuur (2005) Curr. Opin. Hematol. 12, 377). Mediante empalmes alternativos, un marco de lectura abierto adicional es incluido en el extremo C de la cadena $\text{A}\alpha$, alargándolo así con 237 aminoácidos. Los aminoácidos adicionales forman una estructura nodular.

45 El fibrinógeno de origen plasmático es un importante componente de los selladores de fibrina comercializados que son aplicados clínicamente durante intervenciones quirúrgicas para detener el sangrado y disminuir la pérdida de sangre y fluidos. Además se usa para facilitar la adherencia del tejido usando la propiedad de aglutinación de la fibrina y mejorar la cicatrización de las heridas. El fibrinógeno es también utilizado clínicamente para suplir la deficiencia de fibrinógeno en pacientes con fibrinogenemia hereditaria y en pacientes con una deficiencia de fibrinógeno adquirida. La administración intravenosa de altas dosis de fibrinógeno (3 – 10 gramos) ha demostrado normalizar la coagulación de la sangre y detener o evitar graves hemorragias en diferentes situaciones clínicas.

50 La producción de fibrinógeno humano recombinante, ya sea en el formato de tipo nativo (HMW) o como una variante (por ejemplo como Fib420), tiene muchas ventajas sobre el uso de materiales de origen plasmático. Estos incluyen su perfil de seguridad preferido, la posibilidad de hacer variantes en una forma pura y suministros ilimitados.

La solicitud de patente US 6,037,457 expone la producción de fibrinógeno recombinante en células adherentes usando un combinado de inhibidores de proteasa. Los niveles de expresión están alrededor de 1 – 15 $\mu\text{g/ml}$.

Sin embargo, para producirlo de una manera económicamente viable, se necesitan altos niveles de expresión de fibrinógeno intacto, funcional. Además, para aplicaciones específicas (por ejemplo uso de fibrinógeno como pinza

hemostática intravenosa (IV)) se requieren modificaciones post-traduccionales apropiadas (por ejemplo glicosilación).

En la solicitud de patente US 2003/221223 se producen proteínas transgénicas en plantas, incluyendo fibrinógeno. El fibrinógeno producido comprende grupos glicosilo vegetales.

5 Debido a las modificaciones post-traduccionales, se prefiere la expresión en sistemas de mamíferos. Por consiguiente, el fibrinógeno recombinante biológicamente activo ha sido expresado en varias células, tales como riñón de cría de hámster (BHK) (por ejemplo Farrel y colaboradores (1991) *Biochemistry* 30, 9414), células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo Lord, (US6037457), Binnie y colaboradores (1993) *Biochemistry* 32, 107),
 10 células COS derivadas del mono verde africano (por ejemplo Roy y colaboradores (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4758). Sin embargo, los niveles de expresión son solo alrededor de 1 – 25 µg/ml y se consideran inadecuados para reponer las grandes cantidades de fibrinógeno en plasma en la práctica clínica. Además, la expresión del fibrinógeno humano en levadura *P. pastoris* produjo 8 µg/ml, que no es tampoco adecuado para la producción comercial (Tojo y colaboradores (2008) *Prot. Expr. and Purif.* 59, 289).

15 El documento de patente WO2006/122822 describe la expresión de anticuerpos usando vectores de expresión de genes dobles que comprenden genes gen-optimizados. Los niveles de producción de anticuerpos aumentan de este modo de 37,8 microgramos/ml a 51,3 microgramo/ml.

20 En la solicitud de patente EP 1 661 989 se informa que son necesarios rendimientos de al menos 100 mg/ml para una producción comercial viable. La doctrina de la solicitud de patente EP 1 661 989 es que se alcanzan niveles tan altos usando vectores de expresión mixtos de genes para expresión combinada de cadenas alfa y gamma o cadenas beta y gamma, que conduce a un exceso de expresión de la cadena gamma. En esta solicitud, se presentan niveles de hasta 631,5 mg/ml para células CHO en un matraz con agitación. Sin embargo, para alcanzar tales niveles, las células tienen que co-exresar la proteína anti-apoptosis del baculovirus P35, y tiene que usarse metotrexato, un anti-metabolito, para la amplificación de los vectores. Las densidades celulares son relativamente bajas (máximo en un matraz con agitación $9,4 \times 10^5$ células/ml en 15 días) si se compara con lo que es estándar en la industria por ejemplo Wurm (*Nature Biotechnol.* (2004) 22, 1393) informa de densidades celulares de rutina de 2×10^6 células/ml en 3-4 días de subcultivación).

La cuestión más importante para la producción exitosa de fibrinógeno recombinante es cómo hacer un producto lo suficientemente intacto, correctamente ensamblado, biológicamente activo con alta pureza.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención está definida en su sentido más amplio por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de fibrinógeno alfa, beta o gamma que es optimizada para su expresión en un sistema de cultivo de células eucarióticas. Una secuencia de nucleótidos optimizada de acuerdo con la invención permite la expresión eficaz de fibrinógeno recombinante en forma intacta en un sistema de cultivo de células eucarióticas. La secuencia de la proteína codificada por la
 35 secuencia de nucleótidos optimizada es idéntica a la secuencia de la proteína codificada por la correspondiente secuencia de nucleótidos no optimizada.

40 En el contexto de la presente invención, el término "fibrinógeno" puede referirse a cualquiera de las formas del fibrinógeno e incluye variantes que se han originado a partir de polimorfismos genéticos, diferencias en glicosilación y fosforilación, proteolisis (parcial) de la parte carboxi-terminal de la cadena A α y empalmes alternativos. En el contexto de la presente invención, los términos 'cadena alfa' y 'cadena A α ' se usan indistintamente. Ellos pueden referirse tanto al tipo nativo como a variantes de la cadena alfa, incluyendo una cadena alfa del fibrinógeno de 644 aminoácidos que contiene una secuencia señal (SEQ ID NO.8), un precursor de la cadena alfa del fibrinógeno de 625 aminoácidos sin secuencia señal (aminoácidos 20 a 644 de SEQ ID NO. 8), una cadena alfa truncada de fibrinógeno de 610 aminoácidos (aminoácidos 20 a 629 de SEQ ID NO. 8) como se encuentra en circulación y la
 45 variante Fib420 de la cadena alfa de 866 aminoácidos que contiene una secuencia señal (SEQ ID NO.11) o sin secuencia señal (aminoácidos 20-866 de SEQ ID NO. 11).

50 En el contexto de la presente invención, los términos 'cadena beta' y 'cadena B β ' son utilizados indistintamente. Ellos se refieren tanto al tipo nativo como a variantes de la cadena beta, que incluyen una cadena beta de fibrinógeno de 491 aminoácidos que contiene una secuencia señal (SEQ ID No. 9) y una cadena beta de fibrinógeno de 461 aminoácidos sin secuencia señal (aminoácidos 31 a 491 de SEQ ID NO. 9).

55 En el contexto de la presente invención, el término 'cadena gamma' y 'cadena γ ' se utilizan indistintamente. Ellos se refieren tanto al tipo nativo como a variantes de la cadena gamma, que incluyen una cadena gamma de fibrinógeno de 437 aminoácidos que contiene una secuencia señal (SEQ ID No. 10), una cadena gamma del fibrinógeno de 411 aminoácidos sin secuencia señal (aminoácidos 27 a 437 de SEQ ID NO. 10), una cadena gamma del fibrinógeno de 453 aminoácidos, que es la cadena gamma principal con secuencia señal (SEQ ID No. 13) y una cadena gamma del

fibrinógeno de 427 aminoácidos, que es la cadena gamma principal sin secuencia señal (aminoácidos 27 a 453 de SEQ ID NO. 13).

5 En el contexto de la presente invención, fibrinógeno o una cadena de fibrinógeno está 'en forma intacta' cuando la secuencia de aminoácidos contiene todos los aminoácidos que estaban codificados por la secuencia de nucleótidos, opcionalmente sin los aminoácidos que son separados durante el procesamiento (secreción) normal de las células. Por lo tanto, las cadenas alfa que tienen 644, 625 o 610 aminoácidos son ejemplos de una cadena alfa en forma intacta.

10 La secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención tiene un contenido GC de al menos 55%, preferiblemente de al menos 58%, más preferiblemente de al menos 60 o 65%. En una realización, las secuencias optimizadas de nucleótidos de acuerdo con la invención tienen un contenido GC en el intervalo de 55 a 70%. En otra realización, las secuencias optimizadas de nucleótidos de acuerdo con la invención tienen un contenido GC en el intervalo de 60 a 65%.

15 Las secuencias optimizadas de nucleótidos de la invención que codifican una cadena de fibrinógeno alfa, beta y gamma son optimizadas para su expresión en un sistema de cultivo de células de mamífero, como para su expresión en un sistema de cultivo de una célula COS, célula BHK, célula NS0, célula Sp2/0, célula CHO, célula PER.C6 o célula HEK293. Más preferiblemente, las secuencias de nucleótidos son optimizadas para su expresión en un sistema de cultivo de células humanas, tal como un sistema de cultivo para una célula PER.C6 o una célula HEK293.

20 La optimización de acuerdo con la invención tiene un índice de adaptación de codones de al menos 0,90, preferiblemente de al menos 0,95, más preferiblemente de al menos 0,97. En una realización, una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención se optimiza por adaptación del uso de codones a células CHO con un índice de adaptación de codones de al menos 0,95.

25 Las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención codifican cadenas de fibrinógeno de mamíferos, más preferiblemente codifican cadenas de fibrinógeno de primates, lo más preferible codifican cadenas de fibrinógeno humano. También son posibles combinaciones, tal como por ejemplo una o dos cadenas de fibrinógeno de mamíferos combinadas con dos o una cadenas de fibrinógeno de roedor. La secuencia de nucleótidos que está optimizada puede ser DNA o RNA. Preferiblemente, es cDNA.

30 Una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena de fibrinógeno alfa, beta o gamma muestra al menos 70% de identidad con sus respectivos homólogos no optimizados. En una realización, una secuencia optimizada de nucleótidos de la invención que codifica una cadena de fibrinógeno alfa, beta y gamma muestra un 70-80% de identidad con sus respectivas secuencias no optimizadas. Preferiblemente, las secuencias optimizadas de nucleótidos de la invención que codifican una cadena de fibrinógeno alfa, beta o gamma no contienen sitios con actuación cis, tal como sitios de empalme y señales poli(A).

35 Una secuencia de nucleótidos optimizada de acuerdo con la invención que codifica una cadena de fibrinógeno alfa no contiene secuencias de repetición directa de 39 pares de bases que están normalmente presentes en el gen que codifica la cadena alfa del fibrinógeno humano. En una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena alfa, la secuencia de repetición es cambiada sin cambiar la secuencia de la proteína codificada.

40 Una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención codifica una cadena alfa que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 4 o 7. Las secuencias de nucleótidos que codifican una cadena alfa de fibrinógeno y que comprenden parte de estas secuencias son también abarcadas por la presente invención y están así definidas en las siguientes realizaciones. En una realización, una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención comprende los nucleótidos 60-1932 de SEQ ID NO.4. En otra realización, una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención comprende los nucleótidos 60-1887 de SEQ ID NO. 4. En otra realización, una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención comprende los nucleótidos 60-2598 de SEQ ID NO.7. También una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que es al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, al menos 94%, 96%, la más preferible al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO. 4 o 7 y que codifica una cadena alfa de fibrinógeno, por ejemplo una cadena alfa de fibrinógeno con una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 8 o 11 o parte de estas secuencias que comprenden los aminoácidos 20-644 de SEQ ID NO. 8, los aminoácidos 20-629 de SEQ ID NO. 8 o los aminoácidos 20-866 de SEQ ID NO.11, es abarcada por la presente invención.

55 Una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena beta comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 5. Secuencias de nucleótidos que codifican una cadena beta de fibrinógeno y que comprenden la parte de esta secuencia que comprende los nucleótidos 93-1473 de SEQ ID NO. 5 son también abarcadas por la presente invención. También una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, al menos 94%, 96%, lo más preferiblemente al menos 98% o al menos 99% idéntica al SEQ ID NO. 5 y que codifica una cadena beta de fibrinógeno, por ejemplo una cadena beta

de fibrinógeno con una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 9 o parte de esta secuencia, tal como por ejemplo los aminoácidos 31 a 491 de SEQ ID NO.9, es abarcada por la presente invención.

Una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena gamma de fibrinógeno comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 6. Las secuencias de nucleótidos que codifican una cadena gamma de fibrinógeno y que comprenden la parte de esta secuencia que comprende los nucleótidos 81-1311 de SEQ ID NO. 6 son también abarcadas por la presente invención. También una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que es al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, al menos 94%, 96%, lo más preferible al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO. 6 y que codifica una cadena gamma de fibrinógeno, por ejemplo una cadena gamma de fibrinógeno con una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 10 o parte de esta secuencia, tal como por ejemplo los aminoácidos 27 a 437 de SEQ ID NO. 10, es abarcada por la presente invención.

Una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena gamma de fibrinógeno comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 12. Secuencias de nucleótidos que codifican una cadena gamma de fibrinógeno y que comprende la parte de esta secuencia que comprende los nucleótidos 81-1359 de SEQ ID NO. 12 son también abarcados por la presente invención. También una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que es al menos 90%, mas preferiblemente al menos 92%, al menos 94%, 96%, lo más preferible al menos 98% o al menos 99% idéntica al SEQ ID NO. 12 y que codifica una cadena gamma de fibrinógeno, por ejemplo una cadena gamma de fibrinógeno con una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 13 o parte de esta secuencia, tal como por ejemplo los aminoácidos 27 a 453 de SEQ ID NO. 13, es abarcado por la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena de fibrinógeno alfa, beta o gamma. La construcción de nucleótidos puede comprender secuencias reguladoras que influyen en la expresión de las cadenas de fibrinógeno, incluyendo promotores, terminadores y potenciadores. En una realización, la construcción de nucleótidos es un vector, tal como por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión. La construcción de nucleótidos puede también comprender un marcador de selección.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a células mamíferas que comprenden una secuencia optimizada de nucleótidos de acuerdo con la invención que codifica una cadena de fibrinógeno alfa, beta o gamma. En la célula, los nucleótidos de acuerdo con la invención pueden estar presentes como tales o en una construcción, tal como en un vector de expresión o un vector de clonación. La célula es típicamente una célula huésped que se utiliza para la producción de fibrinógeno. La célula que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención es una célula de mamíferos. Ejemplos adecuados de células de mamíferos incluyen células de insectos, células COS, células BHK, células NS0, células Sp2/0, células CHO, células PER.C6 y células HEK293.

Las células de acuerdo con la invención producen elevadas cantidades de fibrinógeno intacto, biológicamente activo. La célula es típicamente parte de una línea celular. En el presente contexto, la frase 'una célula o línea celular que produce elevadas cantidades de fibrinógeno intacto' se refiere a una célula o línea celular que produce más de 90%, 95% o 99% de productos intactos. Preferiblemente, esto se mide a lo largo de un periodo de 10, 20 o 30, más preferiblemente a lo largo de 40 o 50, duplicaciones de la población. En el contexto de la presente invención, fibrinógeno 'biológicamente activo' se refiere a fibrinógeno que se polimeriza en fibrina en presencia de trombina. Tales células o líneas celulares son también abarcadas por la presente invención. En una realización preferida, una línea celular de acuerdo con la invención produce fibrinógeno recombinante intacto en niveles de al menos 3 picogramos por célula por día, más preferiblemente al menos 4 o 5 picogramos por célula por día, incluso más preferiblemente al menos 7 o 10 picogramos por célula por día. En un reactor con una densidad celular de 30×10^6 células/ml, 3 picogramos por célula por día corresponde a 90 mg de fibrinógeno por volumen de reactor de litro por día, 5 picogramos por célula por día corresponde a 150 mg de fibrinógeno por litro por día y 7 picogramos por célula por día corresponde a 210 mg de fibrinógeno por litro por día. Preferiblemente al menos 50% de la población celular, más preferiblemente al menos 60%, 70% o 80% de la población celular, lo más preferible al menos 90%, 95% o 99% de la población celular produce al menos 3 picogramos por célula por día, más preferiblemente al menos 5 picogramos por célula por día, incluso más preferiblemente al menos 7 picogramos por célula por día.

La selección de células o líneas celulares que producen elevadas cantidades de fibrinógeno intacto se lleva a cabo preferiblemente sin la expresión de inhibidores de proteasa. En una realización, la selección es realizada utilizando anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales que se unen al extremo N intacto de la cadena alfa y al extremo C intacto de la cadena alfa. Ejemplos adecuados comercialmente disponibles de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo Y18 descrito por Koppert y colaboradores (1985) Blood 66, 503 y el anticuerpo G8 descrito por Hoegee-de Nobel y colaboradores (1988) Thromb. Haemost. 60(3) 415. Preferiblemente, esta selección es realizada en un ambiente libre de suero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir fibrinógeno en un sistema de cultivo de células de mamíferos. El método comprende cultivar una célula o línea celular huésped de acuerdo con la invención bajo condiciones en las que el fibrinógeno es producido. Opcionalmente, el fibrinógeno producido es recuperado. Todas las tres cadenas del fibrinógeno son codificadas por las secuencias optimizadas de nucleótidos. En contraste

con el fibrinógeno de origen plasmático, la preparación de fibrinógeno producido por este método será bastante homogénea porque se producen cadenas específicas de fibrinógeno. El método permite la producción de preparaciones de fibrinógeno que constan de más de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, preferiblemente más de 95%, 98% o 99% de variantes, que están presentes en el plasma tan solo en pequeñas cantidades.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención para la preparación de fibrinógeno para varias aplicaciones médicas. En una aplicación, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención son usadas para preparar fibrinógeno para uso en selladores de fibrina que son clínicamente aplicados durante intervenciones quirúrgicas para detener el sangrado y disminuir la pérdida de sangre y líquidos. En otra aplicación, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser utilizadas para preparar fibrinógeno para facilitar la adherencia del tejido mediante el uso de la propiedad de aglutinación de la fibrina y mejorar la cicatrización de la herida. En otra aplicación, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser usadas para preparar fibrinógeno que es usado clínicamente para el tratamiento de episodios de hemorragias agudas en pacientes con deficiencias de fibrinógeno congénitas o adquiridas (por ejemplo a través de la hemorragia después de un traumatismo o durante la cirugía) por administración intravenosa de fibrinógeno. Preparaciones de fibrinógeno de origen plasmático comercializadas son Riastap (CSL Behring LLC; comercializado en Estados Unidos) y Haemocomplettan (CSL Behring AG; comercializado en Europa). Las preparaciones de fibrinógeno recombinante tendrían varias ventajas sobre las preparaciones de origen plasmático, incluyendo un perfil preferido de seguridad, suministro ilimitado y la posibilidad de fabricación de la variante de fibrinógeno con el perfil de actividad preferido para esta indicación específica de una manera pura.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Niveles de expresión de fibrinógeno recombinante humano a 1, 2, 3 y 6 días después de la transfección de células CHO con construcciones de tipo nativo y con condones optimizados que codifican las cadenas A α , B β y γ . El experimento fue hecho por duplicado. (opt) secuencias optimizadas; (wt) secuencias tipo nativo.

Figura 2 Niveles de expresión de fibrinógeno recombinante humano a 1, 2, 3 y 6 días después de la transfección de células CHO con construcciones con codones optimizados que codifican las cadenas A α , B β y γ y construcciones con codones optimizados (marcadas como A α (opt) + B β (opt) + γ (opt)) con la cadena A α -extendida, B β y γ (marcadas como A α -ext.(opt) + B β (opt) + γ (opt)). El experimento fue hecho por duplicado.

Figura 3 Análisis de Western Blot del sobrenadante de cultivos de lotes de clones M21, M25 y M57, que expresan fibrinógeno recombinante humano. El carril de control (contr) contiene fibrinógeno tipo nativo de origen plasmático (FIB3, Enzyme Research Laboratories). Las flechas indican los productos de ruptura de la cadena A α .

Figura 4 Análisis de Western Blot del sobrenadante de cultivos de un lote del clon P40 que expresa la variante de fibrinógeno humano (Fib420), que tiene una cadena A α extendida. El carril 1 es un control que contiene fibrinógeno tipo nativo de origen plasmático (FIB3, Enzyme Research Laboratories). Los carriles 2 y 3 contienen sobrenadante de cultivo del clon P40 A α -extendida, tomado el día 4 y 7 de un lote, respectivamente.

Figura 5 Análisis Western Blot del sobrenadante de cultivo de células PER.C6 que fueron transfectadas transitoriamente con fibrinógeno humano que contiene γ' (los detalles están descritos en el ejemplo 9). El carril 1 contiene sobrenadante de cultivo de células PER.C6 que expresan el fibrinógeno recombinante γ' . El carril 2 es un control, que contiene fibrinógeno tipo nativo de origen plasmático (FIB3, Enzyme Research Laboratories).

Figura 6 Análisis de fibrinógeno para N-glicosilación por tratamiento PNGase F seguido por análisis SDS-PAGE.

Los carriles son cargados como sigue:

MW: el marcador de peso molecular (Benchmark, Invitrogen)

ERLFIB3: fibrinógeno de origen plasmático (ERL), o tratado con PNGase F (+) o no tratado (-) con PNGase F.

PER.C6 fbg: fibrinógeno derivado PER.C6, o tratado con PNGase F (+) o no tratado (-) con PNGase F.

2 μ g de fibrinógeno fue cargado por carril; la tinción fue hecha usando azul de Coomassie. El análisis fue realizado usando gel BisTris reducido un 10% (NuPage, Invitrogen).

Figura 7 Análisis ROTEM: tiempo de coagulación.

El tiempo de coagulación fue determinado por el análisis ROTEM. 200 μ l de plasma normal mezclado (citrato) o 100 μ l de plasma normal mezclado mixto 1:1 con Haemocomplettan (CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania) o fibrinógeno PER.C6 (ambos 2 mg/ml en TBS). CaCl₂ fue añadido a una concentración final de 17 mM. Para empezar la coagulación α -trombina fue añadida a una concentración final de 1IU/ml. El volumen total de reacción fue 240 μ l. La figura muestra el tiempo de coagulación (segundos) para el plasma mezclado 1:1 con fibrinógeno:

1. Fibrinógeno de origen plasmático (CSL Behring, Marburg, Alemania)
2. Fibrinógeno derivado de PER.C6

Todas las medidas fueron hechas por duplicado.

5 **Figura 8** Análisis ROTEM: firmeza del coágulo. La firmeza del coágulo fue determinada por el análisis ROTEM. La figura expresa el valor A10 (mm), que es la firmeza del coágulo a un tiempo de 10 minutos, para plasma mezclado 1:1 con fibrinógeno. Los detalles experimentales son los mismos que se describen en la leyenda de la figura 7.

1. Fibrinógeno de origen plasmático (CSL Behring, Marburg, Alemania)
2. Fibrinógeno derivado de PER.C6

10 Todas las medidas fueron hechas por duplicado.

Figura 9 Análisis ROTEM: tiempo de formación del coágulo. Sangre citrada de un individuo sano fue si o no diluida con lactato de Ringer (Baxter, Utrecht, Países Bajos). Después, la sangre diluida con lactato de Ringer fue si o no repuesta (control) con fibrinógeno de origen plasmático o recombinante.

La figura muestra lo siguiente:

- 15 1. 300 µl de sangre
2. 150 µl de sangre, 100 µl de lactato de Ringer (RL), 50 µl TBS
3. 150 µl de sangre, 100 µl (RL), 50 µl Haemocomplettan 6,5 mg/ml (1,1 mg/ml concentración final)
4. 150 µl de sangre, 100 µl (RL), 50 µl hFbg recombinante 6,5 mg/ml (1,1 mg/ml concentración final)

20 En todas las condiciones 20 µl del reactivo star-TEM y 20 µl del reactivo ex-TEM (Pentapharm GMBH, Munich, Alemania) fueron usados para comenzar la coagulación.

Intervalo normal (35 – 160 segundos) son los valores encontrados para individuos sanos. Valores CFT de 160 – 220 segundos son encontrados en pacientes con hemostasia normalmente intacta pero con reserva reducida.

Figura 10 Análisis ROTEM: firmeza del coágulo. La sangre citrada de un individuo sano fue si o no diluida con lactato de Ringer (Baxter, Utrecht, Países Bajos).

25 Después, la sangre diluida con el lactado de Ringer fue si o no repuesta (control) con fibrinógeno de origen plasmático o recombinante.

Las condiciones de medida fueron las siguientes:

1. 300 µl de sangre
2. 150 µl de sangre, 100 µl de lactato de Ringer (RL), 50 µl TBS
- 30 3. 150 µl de sangre, 100 µl (RL), 50 µl Haemocomplettan 6,5 mg/ml (1,1 mg/ml concentración final)
4. 150 µl de sangre, 100 µl (RL), 50 µl hFbg recombinante 6,5 mg/ml (1,1 mg/ml concentración final)

En todas las condiciones 20 µl del reactivo star-TEM y 20 µl del reactivo ex-TEM (Pentapharm GMBH, Munich, Alemania) fueron usados para comenzar la coagulación.

35 Intervalos normales (53 – 72 mm) son valores encontrados para pacientes sanos sin trastornos de coagulación. Valores MCF de 45 – 40 mm encontrados en pacientes indican un riesgo de hemorragia.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de construcciones optimizadas de cDNA.

40 Los cDNAs que codifican las cadenas polipeptídicas Aα, Bβ, γ, Aα-extendida (Fib420) y γ' del fibrinógeno humano fueron sintetizados tanto en tipo nativo (en este ejemplo se refiere al formato no optimizado) y en formato con codones optimizados por GeneArt (Regensburg, Alemania): (i) los sitios de actuación en cis (sitios de empalme, señales poli(A)) fueron eliminados; (ii) la secuencia repetitiva de la cadena Aα fue modificada; (iii) el contenido GC fue incrementado para prolongar la vida media del mRNA; (iv) El uso de codones fue adaptado a CHO (índice de adaptación de codones – CAI- > 0,95). La referencia del tipo nativo utilizado fue NM_021871 para la cadena alfa, NM_005141 para la cadena beta y NM_000509 para la cadena gamma.

Se compraron los cDNAs que codifican la cadena A α (SEQ ID NO. 1), B β (SEQ ID NO. 2) y γ (SEQ ID NO. 3) en formato tipo nativo y cDNAs para A α optimizada (SEQ ID NO. 4), B β (SEQ ID NO. 5) y γ (SEQ ID NO. 6) y los resultados se muestran en la Tabla 1. Las secuencias A α -extendida (Fib420) (SEQ ID NO. 7) y secuencias γ' optimizadas también se muestran en la Tabla 1.

5 cDNA de cadena alfa (SEQ ID no. 1), beta (SEQ ID NO.2) y gamma (SEQ ID NO. 3) de tipo nativo y cDNA de cadena alfa (SEQ ID no. 4), beta (SEQ ID NO. 5), y gamma (SEQ ID no. 6) optimizado, fueron subclonados en derivados pcDNA3.1. Ambas cadenas A α –tipo nativo y optimizada-, y A α -extendida (Fib420) en pcDNA3.1 (+) neo, ambas cadenas B β en pcDNA3.1 (+) higo y ambas cadenas γ en pcDNA3.1 (-) higo (Invitrogen, Carlsbad, USA). La cadena γ' optimizada fue subclonada en pcDNA3.1 (+) higo.

10 Tabla 1

Cadena de fibrinógeno	Acieros (%)	Índice de adaptación de codones (CAI)		Contenido GC (%)	
		tipo nativo/opt	Tipo nativo	Optimizado	Tipo Nativo
Cadena A α	72	0,71	0,97	48	65
Cadena B β	77	0,69	0,96	45	60
Cadena γ	76	0,68	0,97	42	60
Cadena A α Fib420	72	0,71	0,98	48	63
Cadena γ'	75	n. d.	0,97	42	60

Ejemplo 2 Expresión transitoria de las secuencias de fibrinógeno tipo nativo y de codones optimizados en células CHO.

15 Para verificar si las secuencias optimizadas mejoraban la expresión de proteínas, se hicieron transfecciones transitorias en células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células CHO-S fueron sembradas el día antes de la transfección a $0,6 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo FreeStyle enriquecido con L-glutamina 8mM. En el día de la transfección, las células fueron diluidas a una concentración de 1×10^6 células/ml en 15 ml de medio en un matraz con agitación de 125 ml (Corning Life Sciences, Corning, USA). Se mezcló un total de 18,75 μ g de plásmido de expresión (6,25 μ g por cada cadena individual) con 20 0,3 ml OptiPro SFM. Después se añadieron 0,3 ml del reactivo de transfección FreeStyle MAX (16 x diluido en OptiPro SFM) y se mezcló suavemente. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla DNA-FreeStyle MAX fue añadida suavemente a las células CHO-S, arremolinándose lentamente en el matraz con agitación. El experimento fue realizado por duplicado.

25 Las células transfectadas fueron incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ en una plataforma de agitación orbitalica rotando a 125 rpm. En el día 1, 2, 3 y 6 después de la transfección se tomaron muestras para medir la expresión del fibrinógeno recombinante.

30 La expresión de proteínas se midió con un ELISA específico para fibrinógeno humano. Placas certificadas Maxisorb Elisa (Nunc, Thermofisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas durante una noche con 100 μ l 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal G8 (TNO KvL, Leiden, Países Bajos) generado contra el fibrinógeno humano (Hoegge-de Nobel y colaboradores (1988) Thromb. Haemost. 60(3) 415) en PBS (Invitrogen) a 4 °C. Después las placas se lavaron con PBST (PBS/0,05% tabletas Tween20, Calbiochem, EMD, San Diego, USA) y se añadieron 100 μ l de ya sea muestra de sobrenadante de cultivo o estándar de fibrinógeno. El fibrinógeno estándar contiene fibrinógeno 35 (Fibrinógeno humano FIB3, Enzyme Research Laboratories (ERL), Swansea, UK) disuelto y diluido en PBST a las siguientes concentraciones: 100 – 75 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 0 ng/ml. Muestras del sobrenadante de cultivo de tejido fueron diluidas 1:10 – 1:500 en PBST. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente las placas fueron lavadas tres veces con 200 μ l de PBST por pocillo y se dio un golpe seco en una servilleta de papel. Después se añadieron 100 μ l de HRP conjugado con anticuerpo monoclonal Y18 (TNO KvL, Leiden, Países Bajos), diluido 1:10.000 en PBST. Este fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por el lavado de las 40 placas 4 veces con 200 μ l de PBST por pocillo; después de cada etapa de lavado las placas fueron golpeadas en seco en una servilleta de papel. Después, 100 μ l de TMB Ultra (Pierce, Thermofisher Scientific, Rockford, USA) fue añadido a cada pocillo, seguido por una incubación de 4-30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de 100 μ l H₂SO₄ 2M (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania) a cada pocillo y el OD450 fue determinado usando un lector de placas ELISA.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Los datos muestran claramente que las secuencias optimizadas mejoran drásticamente la expresión del fibrinógeno en todos los tiempos en los que las muestras fueron analizadas. El incremento en el nivel de expresión para construcciones optimizadas oscila desde 7,9 – 10,5 veces.

5 Ejemplo 3 Expresión transitoria de Fibrinógeno 420 con codones optimizados en células de cultivo CHO libres de suero.

La transfección y el análisis fueron realizados como se describe en el Ejemplo 2. La secuencia de cDNA de cadena A α extendida utilizada en este experimento es una secuencia A α extendida optimizada (SEQ ID No. 7) y codifica un polipéptido secretado de 847 aminoácidos (SEQ ID No. 11).

10 Los resultados se muestran en la Figura 2 y muestran claramente que los niveles de expresión de una variante de fibrinógeno, en este caso la variante Fib420 con cadenas A α extendidas, están en el mismo intervalo que los niveles mejorados para la variante de la cadena A α tipo nativo optimizada.

Ejemplo 4 Generación de células CHO que expresan de forma estable el fibrinógeno humano a partir de cDNAs de fibrinógeno con codones optimizados bajo condiciones libres de suero.

15 Para la generación de las líneas celulares descritas en este informe se usaron plásmidos derivados de la secuencia optimizada pcDNA3.1, como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, las células CHO-S (Invitrogen) fueron subcultivadas en un medio FreeStyle (Invitrogen) enriquecido con L-glutamina 8mM (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De manera rutinaria, las células fueron cultivadas en un matraz con agitación de 125 ml que contenía 10% (v/v) de medio de cultivo (=12,5 ml). Los cultivos fueron colocados en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ en una plataforma de agitación horizontal a 125 rpm. Se realizaron transfecciones de células CHO-S de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la transfección los cultivos fueron incubados durante una noche en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ en una plataforma de agitación horizontal a 125 rpm.

25 Al día siguiente de la transfección, las células fueron contadas, y sembradas en placas de 96 pocillos (densidad de sembrado 200 células/pocillo) en un medio FreeStyle enriquecido con L glutamina 8 mM y agentes de selección Geneticina (Invitrogen) y Higromicina B (Invitrogen) (ambos a una concentración final de 500 μ g/ml: a partir de aquí "medio de selección"). El volumen de cultivo en cada pocillo fue 100-200 μ l. Las placas fueron colocadas en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ bajo condiciones estacionarias. El medio fue cambiado dos veces en una semana por 100 μ l de medio de selección. Las placas fueron seleccionadas para el crecimiento celular al microscopio. Después de 10 días los clones resistentes se hicieron aparentes. Estos clones fueron transferidos a placas de 48 pocillos que contenían 500 μ l de medio de selección.

35 Cuando los clones alcanzaron aproximadamente el 50% de confluencia se tomó una muestra del medio y se almacenó a -20 °C hasta que el análisis ELISA para los niveles de expresión del fibrinógeno fue realizado (véase el ejemplo 2). Basado en los resultados de ELISA los clones positivos para el fibrinógeno fueron subcultivados en placas de 6 pocillos. Otra vez a una confluencia aproximada del 50% fue cogida una muestra del medio de cada clon y analizada para la expresión por ELISA. En base a los datos de ELISA, los clones de alta expresión seleccionados fueron transferidos a matraces T25 y 3 – 5 días después a matraces de T75 cm². Después, las células fueron transferidas a cultivos agitados, donde fueron inoculados a una concentración de 0,2 x 10⁶ células viables/ml en matraces con agitación de 125 ml que contenían 12,5 ml de medio de selección. Los matraces fueron colocados en un agitador horizontal ELMI a 125 rpm en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂. Después de alcanzar la densidad celular de más de 0,5 x 10⁶ células viables/ml, las células fueron subcultivadas en un nuevo matraz con agitación de 125 ml con medio fresco tres veces a la semana a una concentración de inoculación de 0,2 x 10⁶ células viables/ml hasta que se establecieron características de crecimiento reproducibles (normalmente en 2 semanas). Los cultivos de los clones seleccionados se mantuvieron en el medio de selección.

45 Para el ensayo del lote, se iniciaron los cultivos agitados de los clones seleccionados en 12,5 ml de medio FreeStyle enriquecidos con L-glutamina 8mM en matraces con agitación de 125 mL. Los cultivos fueron inoculados a 0,2 x 10⁶ células viables/ml. Los matraces fueron colocados en el agitador horizontal DOS-10-ELMI a 125 rpm a 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado. Las muestras fueron recogidas en el día 1, 2, 3, 4, y 7 después de la siembra, y se determinó el recuento total de células y la viabilidad (por tinción con azul de Tripano). Las muestras fueron limpiadas de células por centrifugación 300 x g y los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C hasta que las concentraciones de fibrinógeno pudieron ser determinadas.

50 Para la transferencia Western, las muestras que contenían fibrinógeno fueron mezcladas con 5 μ l de muestra tampón 4x concentrada NuPAGE LDS (Invitrogen, Paisley, UK) y 2 μ l de muestra de agente reductor 10x concentrada NuPAGE (Invitrogen). El volumen final fue ajustado a 20 μ l con agua desionizada (Invitrogen/Gibco). Las muestras fueron calentadas durante 10 minutos a 70 °C y cargadas en un gel NuPAGE Novex (10%; Bis-Tris Mini gel, Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gel fue corrido durante 1 hora a 200 Voltios. El tampón de transferencia fue preparado por la mezcla de 44 ml 25x de tampón de transferencia Novex Tris-glicina (Invitrogen), 836 ml de agua desmineralizada y 220 ml de metanol (Merck). La solución fue preenfriada durante un mínimo de 30 minutos a -20 °C. Un trozo de membrana de PVDF (Pierce) es activado durante aproximadamente 15

segundos en metanol. La membrana, 6 piezas de papel secante de gel y 2 almohadillas secantes fueron entonces incubadas en un tampón de transferencia durante unos pocos minutos. La membrana fue colocada en el gel en un cartucho de transferencia que se puso en una cámara de transferencia (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) sosteniendo una bolsa fría congelada a -20 °C. La transferencia de la proteína se realizó a 100 Voltios a través del conjunto gel/membrana durante 1 hora.

Para visualizar las bandas de fibrinógeno en la membrana, la transferencia fue incubada en 50 ml de tampón de bloqueo (3% leche en polvo baja en grasa (Elk, Campina, Meppel, Países Bajos) en PBS) en una plataforma agitadora. Después, la transferencia fue lavada durante 10 minutos en 50 ml de tampón de lavado (0,05% de Tween20 en PBS) e incubada durante 1 hora con 10 ml de tampón de bloqueo que contiene una dilución 1/2000 del anticuerpo HRP monoclonal conjugado Y18/PO (Koppert y colaboradores (1985) 66, 503). Después la transferencia fue lavada 2x lavado corto (menos de 1 minuto), 1 x 15 min, y 3 x 5 min. en 50 ml de tampón de lavado, seguido por unos 10 minutos de incubación en 50 ml de PBS.

Las bandas fueron visualizadas con ECL (cat# 32209, Pierce). La imagen fue capturada usando un sistema de imagen ChemiDoc-It (UVP, California, US).

Múltiples ciclos de generación de clones estables fueron realizados. Solo los clones que produjeron más de 3 picogramos por célula por día (pcd) en lotes de cultivos de 7 días fueron recogidos. Algunos clones produjeron más de 5 pcd en lotes de cultivo de 7 días.

Como se indicó antes, los clones fueron probados tanto para la producción de fibrinógeno como para la calidad del fibrinógeno producido. Algunos clones produjeron elevados niveles de fibrinógeno intacto, otros generaron producto intacto pero también mostraron productos de degradación. La cadena A α es la más sensible a la proteólisis comparada con la B β y γ , así la primera exploración con la herramienta de detección se centró en primera instancia en las pruebas para la integridad de la cadena A α . Un ejemplo típico se muestra en la Figura 3, donde el clon M21 muestra claramente la degradación de la cadena A α , mientras que M25 y M57 no. El análisis de la transferencia Western de estas muestras para la integridad de B β y γ probó que estas cadenas estaban todavía intactas, incluso si la cadena A α mostraba ruptura proteolítica.

Ejemplo 5 Generación de líneas celulares estables que expresan la variante humana Fib420

Líneas celulares estables que expresan una variante del fibrinógeno humano, viz. la variante Fib420 que tiene una cadena A α extendida (847 aminoácidos en lugar de 625) fueron generadas. Una construcción codón optimizada (SEQ ID No. 7) fue utilizada y los clones fueron generados bajo condiciones libres de suero, como se describe en el Ejemplo 5.

El sobrenadante de dos clones positivos que produjeron más de 3 pcd en un lote de cultivo de 7 días se comprobaron para la cadena A α extendida intacta (Fib420) utilizando el análisis de Western Blot. Estaba claro (Figura 4) que incluso en elevadas producciones de clones la cadena A α del Fib420 estaba extendida e intacta.

Ejemplo 6 Generación de células estables PER.C6 que expresan el fibrinógeno humano desde cDNAs de fibrinógeno de codones optimizados bajo condiciones libres de suero.

Células PER.C6 (Fallaux y colaboradores (1998) Hum. Gene Ther. 9(13) 1909) fueron usadas como un huésped para la expresión del fibrinógeno recombinante humano. Brevemente, las células PER.C6 fueron cultivadas en suspensión en un medio mAb (SAFC, Hampshire, UK) y transfectadas utilizando el dispositivo de nucleofección AMAXA (Lonza, Cologne, Alemania) (programa A-27, que utiliza el Nucleofector Kit T con tres vectores que codifican las tres diferentes cadenas de la proteína fibrinógeno humano (cadena A α , B β y γ) y que contiene las cadenas del cDNA optimizado (SEQ ID no.4, SEQ ID no.5, y SEQ ID no.6, resp).

Después de la nucleofección, las células fueron cultivadas durante 1 día en un matraz T y posteriormente sembradas en placas de 96 pocillos (Greiner, Alphen a/d Rijn, Países Bajos) a una densidad de 1.000-3.000 células/pocillo. Después el medio mAb que contiene 125 μ g/ml de Geneticina (Invitrogen) fue añadido. Después de aproximadamente 3 semanas, aparecieron clones en aproximadamente 10 – 30% de pocillos individuales de la placa de 96 pocillos, que se ampliaron posteriormente a placas de 48-, 24- y 6 pocillos y después subcultivados en matraces de cultivo T25 y T80. Durante toda la expansión los cultivos fueron seleccionados por los niveles de expresión del fibrinógeno humano. Las células de baja y no-expresión fueron descartadas. Posteriormente las células fueron cultivadas en matraces con agitación (125 mL, Corning).

En total, 579 clones fueron identificados en las placas de 96 pocillos. Basado en los niveles de expresión del fibrinógeno a través de la expansión, 43 clones fueron seleccionados y subcultivados en matraces de agitación. 10 fuera de estas 43 líneas celulares PER.C6 que producen fibrinógeno humano recombinante fueron seleccionadas para un lote de ensayo inicial, basado en las características de crecimiento y producción.

El ensayo del lote de las 6 líneas celulares PER.C6® seleccionadas en medio VPRO (SAFC) mostró niveles de producción volumétrica de hasta 279 mg/L de fibrinógeno recombinante humano, y una productividad específica de

19,8 pcd. Finalmente un lote de cultivo en medio VPRO fue realizado con un cambio de medio en el tiempo de toma de muestra, que resultó en niveles de producción volumétrica acumulativa de hasta 515 mg/L de fibrinógeno recombinante.

5 Ejemplo 7 Generación de líneas celulares estables PER.C6 que expresan el fibrinógeno humano con una cadena A α de 610 aminoácidos

10 Para generar un plásmido de expresión que codifique la A α 610 de la forma predominante del fibrinógeno de origen plasmático en la circulación sanguínea, un fragmento de cDNA (SECUENCIA ID 8), optimizado como se describió anteriormente, que codifique aminoácidos 1 – 610 de la cadena A α fue clonado en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (+) neo, de acuerdo con los procedimientos estándar. La generación de líneas celulares PER.C6 que producen fibrinógeno recombinante humano es similar a como se describió anteriormente (véase ejemplo 6). Las secuencias utilizadas para las cadenas A α , B β y γ son SEQ ID no.8, SEQ ID no.5, y SEQ ID no.6, resp.

15 Después de la transfección de las células PER.C6 y cultivado en placas de 96 pocillos, 310 clones fueron transferidos y seleccionados en placas de 48 pocillos. Al final de la trayectoria de expansión, 24 fuera de los 310 fueron transferidos a matraces con agitación, que después de un ensayo de lote inicial, 8 fueron seleccionados para el ensayo de estabilidad y productividad en el cultivo de lote.

Los rendimientos del cultivo de lote fueron similares a los rendimientos obtenidos con líneas celulares que expresan la cadena A α en el formato de 625 aminoácidos, que demuestra claramente que la expresión de las cadenas A α del cDNA que codifica la forma de 610 amino no afecta a los niveles de expresión.

20 El análisis de proteínas que utiliza el análisis SDS-PAGE y de transferencia Western indicó que el fibrinógeno recombinante fue producido en formato intacto.

Ejemplo 8 Líneas celulares PER.C6 que expresan fibrinógeno recombinante humano basado en la cadena A α extendida (variante Fib420)

25 La generación de líneas celulares PER.C6 que producen fibrinógeno recombinante humano es similar a la descrita antes (véase ejemplos 6 y 7). En resumen, las secuencias utilizadas para la cadena A α , B β , y γ son SEQ ID no.7, SEQ ID no.5, y SEQ ID no.6, resp.

Después de la transfección y cultivo en las placas de 96 pocillos, 325 clones fueron transferidos y seleccionados en placas de 48 pocillos. Al final de la trayectoria de expansión, 24 clones fueron transferidos a matraces de agitación, de los cuales 8 fueron seleccionados por el análisis de estabilidad y expresión para continuar con el ensayo de cultivo de lote.

30 Los rendimientos en el cultivo de lote fueron similares a los rendimientos obtenidos con líneas celulares que expresan la cadena A α en formato de 610 o 625 aminoácidos, indicando que la extensión de la cadena A α no afecta a los niveles de expresión. Esto no era de esperar a priori, un fibrinógeno de origen plasmático solo contiene 1-3% de cadena A α extendida en comparación con fibrinógeno que contiene la cadena A α 610/625. El análisis de la proteína utilizando el análisis SDS-PAGE y de transferencia Western indica que el fibrinógeno recombinante es producido en formato intacto, con la cadena α que tiene el tamaño esperado (similar a la cadena A α producida por CHO desde el Fib420 como se muestra en la Figura 4).

Ejemplo 9 Expresión transitoria de fibrinógeno γ' codones optimizados en células cultivadas CHO libres de suero.

40 La transfección transitoria y análisis fueron realizados como se describe en el Ejemplo 2. La secuencia cDNA de cadena γ' extendida utilizada en este experimento es una secuencia γ' extendida optimizada (SEQ ID No. 12) y codificada para el polipéptido de 453 aminoácidos. Después de la eliminación del péptido señal, un polipéptido secretado de 427 aminoácidos (aminoácidos de 27 a 453 de SEQ ID NO. 13).

45 Los resultados mostraron que los niveles de expresión de la variante de fibrinógeno con las cadenas γ' están en el mismo intervalo que los niveles mejorados para la variante optimizada de 'tipo nativo'. El sobrenadante del cultivo fue analizado mediante el análisis de transferencia Western. Los resultados (Figura 5) muestran que la cadena γ' del fibrinógeno recombinante, en el carril 1, corre más lento que el fibrinógeno 'tipo nativo', en el carril 2. Esto indica que la cadena γ' en el fibrinógeno recombinante está extendida si se compara con la cadena γ en el fibrinógeno de origen plasmático y que la cadena γ' está intacta y no degradada.

Ejemplo 10 Purificación del fibrinógeno recombinante humano.

50 El fibrinógeno recombinante humano del Ejemplo 6 fue purificado desde el sobrenadante del cultivo celular de acuerdo con los métodos estándar. Brevemente, (NH₄)₂SO₄ fue añadido al sobrenadante del cultivo a 40% de saturación y el precipitado fue recogido por centrifugación. Posteriormente, el precipitado fue disuelto en TBS (Tris-

HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 100mM), diluido (10 veces) en un tampón de carga (Tris-HCl 5mM pH 7,4, 0,01% Tween-20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5M) y cargado en una columna de interacción hidrofóbica (HIC) Hi Trap Butyl FF (20mL) (GE Healthcare, Upsala, Suecia). La proteína unida fue eluida por el tampón de carga que contiene un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,5 – 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 20 volúmenes de columna. Las fracciones de picos de la purificación HIC fueron sometidas a un cambio de tampón por diálisis frente al tampón de carga TMAE (Tris-HCl 5mM pH8,5, 0,01% Tween-20) y posteriormente cargado en una columna de intercambio iónico Fractogel EMD TMAE (m) 40 – 90 μm (20 ml) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El fibrinógeno recombinante humano fue posteriormente eluido utilizando un gradiente de sal continuo de NaCl 0 – 1 M en 20 volúmenes de columna.

El fibrinógeno recombinante humano en las fracciones de pico fue precipitado otra vez por adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% de saturación y recogido por centrifugación. Finalmente el material fue disuelto en TBS (Tris-HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 100mM) y dializado frente al TBS para eliminar cualquier resto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ejemplo 11 Funcionalidad del fibrinógeno recombinante

El fibrinógeno recombinante purificado PER.C6, como el producido por las líneas celulares generado en el Ejemplo 6, fue sometido a un número de ensayos para evaluar su calidad y funcionalidad y compararlo con el fibrinógeno de origen plasmático. La N-glicosilación del fibrinógeno fue probada por tratamiento del fibrinógeno con PNGase F, que es una amidasa que elimina las estructuras de carbohidratos N-unidas de las proteínas (Maley, F. y colaboradores (1989) Anal. Biochem. 180, 195). Las muestras de fibrinógeno purificado, derivado de los cultivos PER.C6, así como el fibrinógeno de origen plasmático (Fibrinógeno humano FIB3, ERL) fueron tratadas con PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, US), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados (Figura 6) indican que el tratamiento con PNGase F da lugar a un descenso de la masa molecular para las cadenas B β y γ , según lo determinado por SDS-PAGE, para ambos FIB3 (ERL) de origen plasmático y fibrinógeno base PER.C6. Esto es consistente con el hecho de que ambas cadenas contienen un sitio de N-glicosilación (Henschen-Edman (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 936, 580). Los datos muestran que ambos pre- como post tratamiento con PNGase F, diferentes bandas sencillas son visibles para ambas cadenas b β y γ . Esto indica que, así para el fibrinógeno de origen plasmático, todas estas cadenas en el fibrinógeno recombinante están glicosiladas. La cadena A α del fibrinógeno humano no contiene N-glicanos, por eso el peso molecular no cambia tras el tratamiento PNGase F. En conclusión, estos datos indican que el modelo de la N-glicosilación de PER.C6 basado en el fibrinógeno es similar a del homólogo de origen plasmático.

La actividad biológica del fibrinógeno derivado de PER.C6 fue además probada en ensayos de polimerización, realizados como describieron Koopman y colaboradores (1992) Blood 80(8):1972. Los resultados obtenidos fueron similares a aquellos obtenidos con fibrinógeno humano derivado de CHO. El ensayo mide la polimerización del fibrinógeno bajo la acción de trombina para formar fibrina. La polimerización es medida mediante el registro OD350 nm en el tiempo. La polimerización del fibrinógeno recombinante PER.C6 en plasma fue igual al plasma y al fibrinógeno derivado de CHO.

La capacidad de coagulación de fibrinógeno derivado de PER.C6, purificado como se describió, fue probada por adición de α -trombina (7,5 IU/ml) (ERL, Swansea, UK) y CaCl_2 (concentración final 2mM), seguido por una incubación a 37 °C durante 1 hora. El coagulo resultante fue entonces recogido por centrifugación en un vial Eppendorf (15 min, 5.000 rpm, centrífuga eppendorf). El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y el coagulo fue disuelto en urea alcalina. La proteína fue medida en el sobrenadante y el coagulo por medición A280. El contenido en fibrinógeno del sobrenadante fue medido mediante ELISA (anticuerpos G8-Y18). Los resultados fueron similares para el fibrinógeno de origen plasmático y fibrinógeno derivado de PER.C6: 97 y 94% de la proteína fue medida en el coagulo disuelto (5% y 8% en el sobrenadante), respectivamente. Ningún fibrinógeno podía ser detectado en el sobrenadante mediante ELISA. Estos resultados apoyan aún más la similitud biológica entre el fibrinógeno de origen plasmático y recombinante humano.

El tiempo de coagulación y la firmeza del coagulo del recombinante y del fibrinógeno de origen plasmático fueron medidos usando el análisis ROTEM. ROTEM® (Pentapharm GMBH, Munich, Alemania) representa ROTation ThromboElastoMetry. La técnica utiliza un eje de rotación sumergido en una muestra (sangre) en una cubeta desechable. Los cambios en la elasticidad bajo diferentes condiciones de coagulación producen un cambio en la rotación de los ejes, que es visualizado en un tromboelastograma, que refleja parámetros mecánicos del coagulo (véase por ejemplo Luddington R. J. (2005) Clin Lab Haematol. 2005 27(2):81). Plasma normal combinado (citrato) fue mezclado 1:1 con Haemocomettan (CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania) o fibrinógeno PER.C6 (ambos 2 mg/ml en TBS). CaCl_2 fue añadido a una concentración final de 17 mM. Para empezar la coagulación, α -trombina fue añadida a una concentración final de 1 IU/ml. El tiempo de coagulación y la firmeza del coágulo fueron analizados mediante ROTEM.

La dilución del plasma citrado compromete tanto el tiempo de coagulación como la firmeza del coagulo. Los resultados indican que la restauración de los niveles de fibrinógeno en el plasma diluido por adición de fibrinógeno purificado restaura tanto el tiempo de coagulación (Figura 7) como la firmeza del coagulo (Figura 8) en la misma

medida para el fibrinógeno de origen plasmático y el fibrinógeno recombinante. Datos similares fueron obtenidos para el fibrinógeno recombinante basado en CHO.

5 Estos resultados indican que el fibrinógeno recombinante humano sería una buena alternativa para suplir la deficiencia de fibrinógeno en pacientes con fibrinogenemia congénita y en pacientes con una deficiencia de fibrinógeno adquirida.

Ejemplo 12 Análisis de ROTEM en sangre humana

10 Para demostrar además que el fibrinógeno recombinante humano puede ser usado para el tratamiento de pacientes con deficiencia de fibrinógeno, fueron realizados experimentos en sangre de un individuo humano sano. La deficiencia de fibrinógeno fue simulada por dilución de la sangre 1:1 con lactato de Ringer (Baxter, Utrecht, Países Bajos). Después, usando el análisis de ROTEM como se describió en el ejemplo 11, el tiempo de formación del coagulo y la firmeza del coagulo fueron determinados.

Para restablecer los niveles de fibrinógeno en la sangre que fue diluida 1:1 con el lactato de Ringer, o fibrinógeno de origen plasmático o fibrinógeno recombinante fueron añadidos.

15 Los datos (Figura 9) indican que el tiempo de formación del coagulo en la sangre diluida con lactato de Ringer estaba fuera del intervalo normal, así como en una situación clínica para un paciente que tiene bajos niveles de fibrinógeno. La adición de o fibrinógeno recombinante o fibrinógeno de origen plasmático produce la restauración del tiempo de formación del coagulo a un nivel dentro del intervalo normal. Esto indica el potencial del fibrinógeno recombinante para tratamiento intra venoso de pacientes con bajos niveles de fibrinógeno.

20 Cuando la sangre fue diluida con lactato de Ringer la máxima firmeza de coagulo (MCF) fue reducida a un nivel asociado con el riesgo de hemorragia en pacientes (Figura 10). Cuando los niveles de fibrinógeno fueron repuestos con fibrinógeno de origen plasmático o fibrinógeno recombinante MCF fue restaurado a niveles normales, lo que destaca el potencial para uso del fibrinógeno recombinante para tratamiento intravenoso de pacientes con bajos niveles de fibrinógeno. Es de notar, que para la aprobación de Riastap en US, la eficacia clínica estaba basada en un criterio indirecto de valoración, en el que la máxima firmeza de coagulo fue medida por tromboelastografía.

25

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> ProFibrix BV	
5	<120> Fibrinógeno recombinante	
	<130> P613WO	
10	<150> EP0815999.5	
	<151>09-07- 2008	
	<160> 13	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 1932	
	<212> DNA	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	atgtttttcca tgaggatcgt ctgcctggtc ctaagtgtgg tgggcacagc atggactgca	60
	gatagtgggtg aagggtgactt tctagctgaa ggaggaggcg tgcgtggccc aagggttgtg	120
	gaaagacatc aatctgcctg caaagattca gactggcctt tctgctctga tgaagactgg	180
	aactacaaat gcccttctgg ctgcaggatg aaagggttga ttgatgaagt caatcaagat	240
	tttacaataa gaataaataa gctcaaaaat tcaactattt aatatcagaa gaacaataag	300
	gattctcatt cgttgaccac taatataatg gaaattttga gaggcgattt ttctctagcc	360
	aataaccgtg ataataccta caaccgagtg tcagaggatc tgagaagcag aattgaagtc	420
	ctgaagcgca aagtcataga aaaagtacag catatccagc ttctgcaaaa aatgttagg	480
	gcccagttgg ttgatatgaa acgactggag gtggacattg atattaagat cccgatcttg	540
	cgagggtcat gcagtagggc tttagctcgt gaagtagatc tgaaggacta tgaagatcag	600
	cagaagcaac ttgaacaggt cattgcaaaa gacttacttc cctctagaga taggcaacac	660
	ttaccaactga taaaaatgaa accagttcca gacttggttc ccggaaattt taagagccag	720
	cttcagaagg tacccccaga gtggaaggca ttaacagaca tgccgcagat gagaatggag	780
	ttagagagac ctgggtgaaa tgagattact cgaggaggct ccacctctta tggaaccgga	840
	tcagagacgg aaagccccag gaaccctagc agtgctggaa gctggaactc tgggagctct	900
	ggacctggaa gtactggaaa ccgaaaccct gggagctctg ggactggagg gactgcaacc	960
	tggaaacctg ggagctctgg acctggaagt actggaagct ggaactctgg gagctctgga	1020
	actggaagta ctggaacca aaaccctggg agccctagac ctggtagtac ccgaaacctgg	1080
	aatcctggca gctctgaacg ccggaagtgt gggcactgga cctctgagag ctctgtatct	1140
	ggtagtactg gacaatggca ctctgaaatc ggaagtttta ggccagatag cccaggctct	1200

ES 2 585 246 T3

gggaacgoga ggctaacaa cccagactgg ggcacatttg aagaggtgtc aggaaatgta 1260
 agtccagga caaggagaga gtaccacaca gaaaaactgg tcacttctaa aggagataaa 1320
 gagctcagga ctggtaaaga gaaggtcacc tctggtagca caaccaccac gcgtcgttca 1380
 tgctctaaaa ccgttactaa gactgttatt ggtcctgatg gtcacaaaga agttacaaa 1440
 gaagtgggga cctccgaaga tggttctgac tgtcccagg caatggattt aggcacattg 1500
 tctggcatag gtactctgga tgggttccgc cataggcacc ctgatgaagc tgccttcttc 1560
 gacactgcct caactggaaa aacattccca ggtttcttct cacctatggt aggagagttt 1620
 gtcagtgaga ctgagtctag gggctcagaa tctggcatct tcacaaatac aaaggaatcc 1680
 agttctcatc accctgggat agctgaatc ccttcccgtg gtaaattctc aagttacagc 1740
 aaacaattta ctagtagcac gagttacaac agaggagact ccacatttga aagcaagagc 1800
 tataaatgg cagatgagc cggaagtga gccgatcatg aaggaacaca tagcaccaag 1860
 agaggccatg ctaaatctcg cctgtcaga ggtatccaca cttctccttt ggggaagcct 1920
 tcctgtccc cc 1932

<210> 2
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

5

<400> 2
 atgaaaagga tggtttcttg gagcttcac aaacttaaaa coatgaaaca tctattattg 60
 ctactattgt gtgttttct agttaagtcc caaggtgtca acgacaatga ggagggttcc 120
 ttcagtgcc gtggtcatcg acccctgac aagaagagag aagaggctcc cagcctgagg 180
 cctgccccac cgccatcag tggagtggtc tatcgggctc gtccagccaa agcagctgcc 240
 actcaaaaga aagtagaaag aaaagcccct gatgctggag gctgtcttca cgctgaccca 300
 gacctggggg tgttgtgtcc tacaggatgt cagttgcaag aggccttctc acaacaggaa 360
 aggccaatca gaaatagtgt tgatgagta aataacaatg tgaagctgt tcccagacc 420
 tcctcttctt cctttcagta catgtatttg ctgaaagacc tgtggcaaaa gaggcagaag 480
 caagtaaaag ataatgaaaa tgtagcaat gactactcct cagaactgga aaagcaccia 540
 ttatatatag atgagactgt gaatagcaat atcccaacta acctcgtgt gcttcgttca 600
 atcctggaaa acctgagaag caaaatacaa aagttagaat ctgatgtctc agtcaaattg 660
 gaatattgtc gcaccccatg cactgtcagt tgcaatattc ctgtggtgtc tggcaaagaa 720
 tgtgaggaaa ttatcaggaa aggagtgaa acatctgaaa tgtatctcat tcaacctgac 780
 agttctgtca aaccgtatag agtatactgt gacatgaata cagaaaatgg aggatggaca 840

10

ES 2 585 246 T3

gtgattcaga accgtcaaga cggtagtggt gactttggca ggaaatggga tccatataaa 900
 cagggatttg gaaatggtgc aaccaacaca gatgggaaga attactgtgg cctaccaggt 960
 gaatatggc ttggaaatga taaaattagc cagcttacca ggatgggacc cacagaactt 1020
 ttgatagaaa tggaggactg gaaaggagac aaagtaaag ctcactatgg aggattcact 1080
 gtacagaatg aagccaacaa ataccagatc tcagtgaaca aatacagagg aacagccggt 1140
 aatgccctca tggatggagc atctcagctg atgggagaaa acaggaccat gaccattcac 1200
 aacggcatgt tcttcagcac gtatgacaga gacaatgacg gctggttaac atcagatccc 1260
 agaaaacagt gttctaaaga agacggtggt ggatggtggt ataatagatg tcatgcagcc 1320
 aatccaaacg gcagatacta ctggggtgga cagtacacct gggacatggc aaagcatggc 1380
 acagatgatg gtgtagtatg gatgaattgg aaggggtcat ggtactcaat gaggaagatg 1440
 agtatgaaga tcaggccctt cttcccacag caa 1473

<210> 3
 <211> 1311
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 atgagttggt ccttgcaccc cgggaattta attctctact tctatgctct tttatttctc 60
 tcttcaacat gtgtagcata tgttgctacc agagacaact gctgcatctt agatgaaaga 120
 ttcggtagtt attgtccaac tacctgtggc attgcagatt tcctgtctac ttatcaaacc 180
 aaagtagaca aggatctaca gtctttggaa gacatcttac atcaagttga aaacaaaaca 240
 tcagaagtca aacagctgat aaaagcaatc caactcaactt ataatcctga tgaatcatca 300
 aaaccaaata tgatagacgc tgctactttg aagtccagga aatgtttaga agaaattatg 360
 aaatatgaag catcgatfff aacacatgac tcaagtattc gatatttgca ggaaatata 420
 aattcaaata atcaaaagat tgtaacctg aaagagaagg tagcccagct tgaagcacag 480
 tgccaggaac cttgcaaaga cacggtgcaa atccatgata tcaactggga agattgtcaa 540
 gacattgcca ataaggagc taaacagagc gggctttact ttattaaacc tctgaaagct 600
 aaccagcaat tcttagtcta ctgtgaaatc gatgggtctg gaaatggatg gactgtgttt 660
 cagaagagac ttgatggcag tgtagatttc aagaaaaact ggattcaata taaagaagga 720
 tttggacatc tgtctcctac tggcacaaca gaattttggc tgggaaatga gaagattcat 780
 ttgataagca cacagtctgc catccatat gcattaagag tggaaactgga agactggaat 840
 ggcagaacca gtactgcaga ctatgccatg ttcaaggtgg gacctgaagc tgacaagtac 900
 cgcctaacat atgcctactt cgctggtggg gatgctggag atgcctttga tggctttgat 960

10

ES 2 585 246 T3

tttgccgatg atcctagtga caagtttttc acatcccata atggcatgca gttcagtacc 1020
 tgggacaatg acaatgataa gtttgaaggc aactgtgctg aacaggatgg atctgggttg 1080
 tggatgaaca agtgtcacgc tggccatctc aatggagttt attaccaagg tggcacttac 1140
 tcaaaagcat ctactcctaa tggttatgat aatggcatta tttgggccac ttggaaaacc 1200
 cgggtgtatt coatgaagaa aaccactatg aagataatcc cattcaacag actcacaatt 1260
 ggagaaggac agcaacacca cctgggggga gccaaacagg ctggagacgt t 1311

<210> 4
 <211> 1932
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 atgttcagca tgaggatcgt gtgcctggtg ctgtccgtgg tgggcaccgc ctggaccgcc 60
 gacagcggcg agggcgactt cctggccgag ggcggtggtg tgagggggccc caggggtggtg 120
 gagaggcacc agagcgcctg caaggacagc gactggccct tctgcagcga cgaggactgg 180
 aactacaagt gccccagcgg ctgcaggatg aagggcctga tcgacgaggt gaaccaggac 240
 ttcaccaaca ggatcaacaa gctgaagaac agcctgttcg agtaccagaa gaacaacaag 300
 gacagccaca gctgaccac caacatcatg gaaatcctga gggcgattt ctctagcgcc 360
 aacaacaggg acaacaccta caacaggtg tccgaggacc tgaggtccag gatcgaggtg 420
 ctgaagagga aggtgatcga gaaggtgcag cacatccagc tgctgcagaa gaacgtcagg 480
 gcccagctgg tcgacatgaa gaggtctgaa gtggacatcg acatcaagat caggtcctgc 540
 aggggcagct gcagccgggc tctggctaga gaggtggacc tgaaggacta cgaggaccag 600
 cagaaacagc tggaacaggt gatcgccaag gacctgctgc ccagcaggga caggcagcac 660
 ctgcccctga tcaagatgaa gcccggtgcc gacctggtgc ccggcaactt caagagccag 720
 ctgcagaaag tgcccccgga gtggaaggcc ctgaccgaca tgccccagat gaggatgga 780
 ctggaaaggc caggcggcaa cgagatcacc aggggcggca gcaccagcta cggcaccggc 840
 agcgagaccg agagccccag gaacccccag agcgcggca gctggaactc cggcagcagc 900
 ggcccaggtc ccaccggcaa caggaacccc ggctccagcg gcaccggcgg cacagccacc 960
 tggaagcccg gcagctccgg ccttggcagc accggtcttt ggaacagcgg cagctctggc 1020
 accgggagca caggcaacca gaaccaggc agccccaggc ctggctctac cgggacctgg 1080
 aaccaggct cctccgagag gggctctgcc ggccactgga ccagcgagag cagcgtgagc 1140
 ggcagcacag gccagtggca cagcgagtcc ggcagcttca ggcccagacg ccccggcagc 1200
 ggcaacgcca ggccaacaa ccccgactgg ggcacottcg aggaagtgag cggcaacgtg 1260

10

ES 2 585 246 T3

```

agccccggca ccaggcggga gtaccacacc gagaagctgg tgaccagcaa gggcgacaaa 1320
gagctgagga ccggcaaaga aaaggtgacc agcggctcta ccaccaccac caggcggagc 1380
tgcagcaaga ccgtgaccaa gacagtgatc ggccccgacg gccacaaaga ggtgacccaaa 1440
gaagtctgta ccagcgagga cggcagcgac tgccccgagg ccatggacct gggcacccctg 1500
agcggcatcg gcaccctgga cggcttcagg cacaggcacc ccgacgaggc cgccttcttc 1560
gacaccgcca gcaccggcaa gaccttcccc ggcttcttca gccccatgct gggcgagttc 1620
gtgtccgaga ccgagtcccc cggctccgag agcggcatct tcacaaacac caaagagagc 1680
agcagccacc accccggcat cggcaggttc cccagcaggg gcaagagcag ctctacagc 1740
aagcagttca ccagcagcac ctctacaac agaggcgact ccaccttoga gagcaagagc 1800
tacaagatgg ccgacgaggc tggcagcgag gccgaccacg agggcaccca cagcaccaag 1860
aggggccacg ccaagagcag gccctgagg ggcattcaca ccagccccct gggcaagccc 1920
agcctgagcc cc 1932

```

<210> 5

<211> 1473

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

atgaagagga tgggtgcctg gtccttcacc aagctgaaaa caatgaagca cctgctcctc 60
ctctctctct gcgtgttctt ggtgaagagc cagggcgtga acgacaacga agagggttc 120
ttcagcgcca gaggacaccg ccccctggac aagaagagag aagaggcccc cagcctgaga 180
cccgccccac cccaatcag cggcggaggg tacagagcca ggcccccaa ggctgccgcc 240
accagaaga aggtcgaacg gaaggctccc gacgccgag gatgcctgca cgcgcacccc 300
gacctgggctg tctgtgccc caccggctgc cagctgcagg aagctctgct ccagcaggaa 360
aggcccatca gaaacagcgt ggacgagctg aacaacaacg tggaggccgt gagccagacc 420
agcagcagca gcttccagta catgtacctg ctgaaggacc tgtggcagaa gaggcagaag 480
caggtcaaaag acaacgagaa cgtggtgaac gagtacagca gcgagctgga gaagcaccag 540
ctgtacatcg acgagaccgt gaacagcaat atcccaacca acctgagggt gctgagaagc 600
atcctggaga acctgaggtc caagatccag aagctggaga gcgacgtcag cgcaccagatg 660
gagtactgca ggacccccctg caccgtgtcc tgcaacatcc cagtgggtgc cggcaaggaa 720
tgcgaggaaa tcattcaggaa gggcggcgag accagcgaga tgtacctgat ccagcccgac 780
agcagcgtga agccctacag ggtgtactgc gacatgaaca ccgagaatgg gggctggacc 840
gtcatccaga acaggcagga cggcagcgtg gacttcggca ggaagtggga cccctacaag 900

```

10

ES 2 585 246 T3

cagggttcg gcaacgtggc caccaacacc gacggcaaga actactgagg cctgcctggc 960
 gagtattggc tgggaaacga caagatcagc cagctgacca ggatgggccc aaccgagctg 1020
 ctgatcgaga tggaggactg gaagggcgac aaggtgaaag cccactacgg cggcttcacc 1080
 gtgcagaacg aggccaaaca gtaccagatc agcgtgaaca agtacagggg caccgcccggc 1140
 aacgccctga tggacggcgc ctcccagctg atggggcgaga acaggacat gaccatccac 1200
 aacggcatgt tcttcagcac ctacgacagg gacaacgacg gctggctgac cagcgacccc 1260
 agaaagcagt gcagcaagga agatggcgga ggatggtggt acaacaggtg ccacgcccgc 1320
 aacccaacg gcaggtacta ctggggcgga cagtacacct gggacatggc caagcacggc 1380
 accgacgacg gcgtggtgtg gatgaactgg aaggggtcct ggtacagcat gaggaagatg 1440
 agcatgaaga tcaggccatt ctttccacag cag 1473

<210> 6
 <211> 1311
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6
 atgagctggt cctgcacccc caggaacctg atcctgtact totacgcctt gctgttctctg 60
 agcagcacat gcgtgcctta tgtggttacc agggacaact gctgcatcct ggacgagagg 120
 ttcggcagct actgccccac cacctgcggc atcggcgact ttctgagcac ctaccagacc 180
 aaggtggaca aggacctgca gagcctggag gacatcctgc accaggtgga gaacaagacc 240
 agcagagtgga agcagctgat caaggccatc cagctgacct acaaccccga cgagagcagc 300
 aagccaaca tgatcgacgc cgccaccctg aagagcagga agatgctgga ggaaatcatg 360
 aagtacgagg ccagcatcct gacccacgac agcagcatca gatacctgca ggaaatctac 420
 aacagcaaca accagaagat cgtcaacctg aaggaaaagg tcgcccagct ggaagcccag 480
 tgccaggaac cctgcaagga caccgtgcag atccaagaca tcaccggcaa ggactgccag 540
 gacatcgcca acaagggcgc caagcagagc ggctgtact tcataagcc cctgaaggcc 600
 aaccagcagt tcttgggtga ctgagagatc gacggcagcg gcaacggctg gaccgtgttc 660
 cagaagaggc tggacggcag cgtggacttc aagaagaact ggattcagta caaggaaggc 720
 ttcggcccac tgagccccac cggcaccacc gaggttctggc tgggcaacga gaagatccac 780
 ctgatcagca cccagagcgc catcccatac gccctgaggg tggagctgga ggactggaac 840
 ggcaggacca gcaccgccga ctacgccatg ttcaaagtgg gacccgaggc cgacaagtac 900
 aggetgaact acgctactt tgccggaggg gacgctggcg acgcttoga cggcttogac 960
 ttcggcgacg accccagcga caagttcttc accagccaca acggcatgca gttcagcacc 1020

10

ES 2 585 246 T3

tgggacaacg acaacgacaa gttcgagggc aactgcgccg agcaggacgg ctccgggtgg 1080
 tggatgaaca agtgccacgc cgggcacctg aacggcgtgt actaccaggc cggcacctac 1140
 agcaaggcca gcacccccaa cggctacgac aacggcatca tctgggccac ctggaaaacc 1200
 aggtggtaca gcatgaaaaa aaccaccatg aagatcatcc cattcaacag actgaccatc 1260
 ggcgagggcc agcagcacca cctggggcga gccaaagcagg ctggcgacgt g 1311

<210> 7
 <211> 2598
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7
 atgttcagca tgaggatcgt gtgcctggtg ctgtccgtgg tgggcaccgc ctggaccgcc 60
 gacagcggcg agggcgactt cctggccgag ggcggtggcg tgagggggccc cagggtggtg 120
 gagaggcacc agagcgcctg caaggacagc gactggccct tctgcagcga cgaggactgg 180
 aactacaagt gccccagcgg ctgcaggatg aagggcctga tgcacgaggt gaaccaggac 240
 ttcaccaaca ggatcaacaa gctgaagaac agcctgttcg agtaccagaa gaacaacaag 300
 gacagccaca gcctgaccac caacatcatg gaaatcctga gggcgattt ctctagcgcc 360
 aacaacaggg acaaacaccta caacaggtg tccgaggacc tgaggtccag gatcgaggtg 420
 ctgaagagga aggtgatcga gaaggtgcag cacatccagc tgctgcagaa gaacgtcagg 480
 gccagctgg tcgacatgaa gaggtggaa gtggacatcg acatcaagat caggtcctgc 540
 aggggcagct gcagccgggc tctggctaga gaggtggacc tgaaggacta cgaggaccag 600
 cagaaacagc tggaacaggt gatcgccaag gacctgctgc ccagcagga caggcagcac 660
 ctgcccctga tcaagatgaa gcccgtgccc gacctggtgc ccggcaactt caagagccag 720
 ctgcagaaag tgcccccgga gtggaaggcc ctgaccgaca tgccccagat gaggatggaa 780
 ctggaaaggc caggcgcaa cgagatcacc aggggcggca gcaccagcta cggcaccggc 840
 agcgagaccg agagccccag gaacccccagc agcggccgca gctggaactc cggcagcagc 900
 ggcccaggct ccaccggcaa caggaacccc ggctccagcg gcaccggcgg cacagccacc 960
 tggaagcccg gcagctccgg ccctggcagc accggctctt ggaacagcgg cagctctggc 1020
 accgggagca caggcaacca gaaccaggc agccccaggc ctggctctac cgggacctgg 1080
 aaccaggct cctccgagag gggctctgcc ggccactgga ccagcgagag cagcgtgagc 1140
 ggcagcacag gccagtggca cagcgagtcc ggcagcttca ggcccagacg ccccggcagc 1200
 ggcaacgcca ggcccaacaa ccccactgg ggcaccttcg aggaagtgag cggcaacgtg 1260
 agccccggca ccaggcggga gtaccacacc gagaagctgg tgaccagcaa gggcgacaaa 1320

10

ES 2 585 246 T3

gagctgagga ccggcaaaga aaaggtgacc agcggctcta ccaccaccac caggcggagc 1380
 tgcagcaaga ccgtgaccaa gacagtgatc ggccccgacg gccacaaaga ggtgacccaaa 1440
 gaagtcgtga ccagcgagga cggcagcgac tgccccgagg ccattggacct gggcaccctg 1500
 agcggcatcg gcaccctgga cggcttcagg cacaggcacc ccgacgagge cgccttcttc 1560
 gacaccgcca gcaccggcaa gaccttcccc ggcttcttca gcccattgct gggcgagttc 1620
 gtgtccgaga ccgagtcccc cggcagcgag agcggcatct tcaccaacac caaagagtcc 1680
 agcagccacc atccccgcat cgctgagttc cccagcaggg gcaagagcag ctccctacagc 1740
 aagcagttca ccagcagcac cagctacaac agggggcgaca gcaccttoga gagcaagagc 1800
 tacaagatgg ccgacgaggc cggctctgag gccgaccacg agggcaccca cagcaccaag 1860
 agggggccacg ccaagagcag gccctgagg gactgcgacg acgtgctgca gacccaaccc 1920
 agcggcacc agtctggcat cttcaacatc aagctgcccg gcagcagcaa gatcttcagc 1980
 gtgtactgcg accaggaaac cagcctgggc ggctggctgc tgatccagca gaggatggac 2040
 ggcagcctga acttcaacag gacctggcag gactacaaga ggggcttcgg ctccctgaac 2100
 gacgagggcg agggcgagtt ctggctgggc aacgactacc tgcacctgct gacccagagg 2160
 ggatctgtcc tgagggtcga gctggaagat tgggcccgca acgaggccta cgcgagtagc 2220
 cacttcagag tgggcagcga ggccgagggc tacgctctgc aggtgtccag ctacgagggc 2280
 acagccggcg acgacctgat cgagggcagc gtggaagagg gcgcccagta caccagccac 2340
 aacaacatgc agttctccac ctccgacagg gacgccgacc agtgggagga aaactgcgcc 2400
 gaggtgtacg gcggaggggtg gtggtacaac aactgccagg ccgccaacct gaacggcatc 2460
 tactaccag gcggcagcta cgaccccagg aacaacagcc cctacgagat cgagaacggc 2520
 gtggtgtggg tgccttcag aggcgccgac tacagcctga gggccgtgag gatgaagatc 2580
 aggccctgg tgacctag 2598

<210> 8

<211> 644

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr
 1 5 10 15

Ala Trp Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly
 20 25 30

Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys

10

ES 2 585 246 T3

35	40	45																						
Asp 50	Ser	Asp	Trp	Pro	Phe	Cys 55	Ser	Asp	Glu	Asp	Trp 60	Asn	Tyr	Lys	Cys									
Pro 65	Ser	Gly	Cys	Arg	Met 70	Lys	Gly	Leu	Ile	Asp 75	Glu	Val	Asn	Gln	Asp 80									
Phe	Thr	Asn	Arg	Ile 85	Asn	Lys	Leu	Lys	Asn 90	Ser	Leu	Phe	Glu	Tyr 95	Gln									
Lys	Asn	Asn	Lys	Asp 100	Ser	His	Ser	Leu	Thr 105	Thr	Asn	Ile	Met 110	Glu	Ile									
Leu	Arg	Gly 115	Asp	Phe	Ser	Ser	Ala 120	Asn	Asn	Arg	Asp	Asn	Thr 125	Tyr	Asn									
Arg 130	Val	Ser	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser 135	Arg	Ile	Glu	Val 140	Leu	Lys	Arg	Lys									
Val 145	Ile	Glu	Lys	Val	Gln 150	His	Ile	Gln	Leu	Leu 155	Gln	Lys	Asn	Val	Arg 160									
Ala	Gln	Leu	Val	Asp 165	Met	Lys	Arg	Leu	Glu 170	Val	Asp	Ile	Asp	Ile	Lys 175									
Ile	Arg	Ser	Cys 180	Arg	Gly	Ser	Cys	Ser 185	Arg	Ala	Leu	Ala	Arg	Glu	Val 190									
Asp	Leu	Lys 195	Asp	Tyr	Glu	Asp	Gln 200	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu 205	Gln	Val	Ile									
Ala 210	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser 215	Arg	Asp	Arg	Gln	His 220	Leu	Pro	Leu	Ile									
Lys 225	Met	Lys	Pro	Val	Pro 230	Asp	Leu	Val	Pro	Gly 235	Asn	Phe	Lys	Ser	Gln 240									
Leu	Gln	Lys	Val	Pro 245	Pro	Glu	Trp	Lys	Ala 250	Leu	Thr	Asp	Met	Pro	Gln 255									
Met	Arg	Met	Glu 260	Leu	Glu	Arg	Pro	Gly 265	Gly	Asn	Glu	Ile	Thr 270	Arg	Gly									
Gly	Ser	Thr 275	Ser	Tyr	Gly	Thr	Gly 280	Ser	Glu	Thr	Glu	Ser 285	Pro	Arg	Asn									

ES 2 585 246 T3

Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
 290 295 300

Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
 305 310 315 320

Trp Lys Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Thr Gly Ser Trp Asn Ser
 325 330 335

Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro
 340 345 350

Arg Pro Gly Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly
 355 360 365

Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly
 370 375 380

Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser
 385 390 395 400

Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
 405 410 415

Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
 420 425 430

Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
 435 440 445

Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
 450 455 460

Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys
 465 470 475 480

Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp
 485 490 495

Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg
 500 505 510

His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr
 515 520 525

ES 2 585 246 T3

Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr
 530 535 540

Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser
 545 550 555 560

Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser
 565 570 575

Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly
 580 585 590

Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly
 595 600 605

Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala
 610 615 620

Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro

<210> 9

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys
 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly
 20 25 30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro
 35 40 45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro
 50 55 60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu

10

ES 2 585 246 T3

85	90	95
His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu 100	105	110
Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp 115	120	125
Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser 130	135	140
Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys 145	150	155
Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu 165	170	175
Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro 180	185	190
Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys 195	200	205
Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg 210	215	220
Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu 225	230	235
Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu 245	250	255
Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met 260	265	270
Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly 275	280	285
Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly 290	295	300
Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly 305	310	315
Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly 325	330	335

ES 2 585 246 T3

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val
 340 345 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr
 355 360 365

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met
 370 375 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His
 385 390 395 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu
 405 410 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp
 420 425 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp
 435 440 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly
 450 455 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met
 465 470 475 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln
 485 490

<210> 10

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp
 20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr
 35 40 45

10

ES 2 585 246 T3

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys
 50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr
 65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro
 85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser
 100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr
 115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn
 130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln
 145 150 155 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly
 165 170 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
 180 185 190

Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
 195 200 205

Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
 210 215 220

Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
 225 230 235 240

Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
 245 250 255

Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
 260 265 270

Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
 275 280 285

Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr

ES 2 585 246 T3

290 295 300

Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
305 310 315 320

Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
325 330 335

Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
340 345 350

Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
355 360 365

His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
370 375 380

Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
385 390 395 400

Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
405 410 415

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys
420 425 430

Gln Ala Gly Asp Val
435

<210> 11

<211> 866

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr
1 5 10 15

Ala Trp Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly
20 25 30

Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys
35 40 45

Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys Cys
50 55 60

10

ES 2 585 246 T3

Pro Ser Gly Cys Arg Met Lys Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn Gln Asp
 65 70 75 80

Phe Thr Asn Arg Ile Asn Lys Leu Lys Asn Ser Leu Phe Glu Tyr Gln
 85 90 95

Lys Asn Asn Lys Asp Ser His Ser Leu Thr Thr Asn Ile Met Glu Ile
 100 105 110

Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser Ala Asn Asn Arg Asp Asn Thr Tyr Asn
 115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile Glu Val Leu Lys Arg Lys
 130 135 140

Val Ile Glu Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys Asn Val Arg
 145 150 155 160

Ala Gln Leu Val Asp Met Lys Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys
 165 170 175

Ile Arg Ser Cys Arg Gly Ser Cys Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val
 180 185 190

Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Asp Gln Gln Lys Gln Leu Glu Gln Val Ile
 195 200 205

Ala Lys Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu Ile
 210 215 220

Lys Met Lys Pro Val Pro Asp Leu Val Pro Gly Asn Phe Lys Ser Gln
 225 230 235 240

Leu Gln Lys Val Pro Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln
 245 250 255

Met Arg Met Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly
 260 265 270

Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn
 275 280 285

Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
 290 295 300

ES 2 585 246 T3

Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
 305 310 315 320

Trp Lys Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Thr Gly Ser Trp Asn Ser
 325 330 335

Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro
 340 345 350

Arg Pro Gly Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly
 355 360 365

Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly
 370 375 380

Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser
 385 390 395 400

Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
 405 410 415

Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
 420 425 430

Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
 435 440 445

Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
 450 455 460

Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys
 465 470 475 480

Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp
 485 490 495

Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg
 500 505 510

His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr
 515 520 525

Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr
 530 535 540

Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser

ES 2 585 246 T3

Glu Val Tyr Gly Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Asn Cys Gln Ala Ala Asn
 805 810 815

Leu Asn Gly Ile Tyr Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Asp Pro Arg Asn Asn
 820 825 830

Ser Pro Tyr Glu Ile Glu Asn Gly Val Val Trp Val Ser Phe Arg Gly
 835 840 845

Ala Asp Tyr Ser Leu Arg Ala Val Arg Met Lys Ile Arg Pro Leu Val
 850 855 860

Thr Gln
 865

<210> 12
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12
 atgagctggt cctgcaccc caggaacctg atcctgtact tctacgcctt gctgttctg 60
 agcagcacat gcgtgccta tgtggctacc agggacaact gctgcatcct ggacgagagg 120
 ttcggcagct actgccccac cacctgcggc atcgccgact ttctgagcac ctaccagacc 180
 aaggtggaca aggacctgca gagcctggag gacatcctgc accaggtgga gaacaagacc 240
 agcagagtgga agcagctgat caaggccatc cagctgacct acaaccccga cgagagcagc 300
 aagcccaaca tgatcgacgc cgccacctg aagagcagga agatgctgga ggaaatcatg 360
 aagtacgagg ccagcatcct gaccacagac agcagcatca gatacctgca ggaaatctac 420
 aacagcaaca accagaagat cgtcaacctg aaggaaaagg tgcgccagct ggaagcccag 480
 tgccaggaac cctgcaagga caccgtgcag atccacgaca tcaccggcaa ggactgccag 540
 gacatcgcca acaagggcgc caagcagagc ggctgtact toatcaagcc cctgaaggcc 600
 aaccagcagt tcctggtgta ctgcgagatc gacggcagcg gcaacggctg gaccgtgttc 660
 cagaagagggc tggacggcag cgtggacttc aagaagaact ggattcagta caaggaagggc 720
 ttcgccacc tgagccccac cggcaccacc gagtcttggc tgggcaacga gaagatccac 780
 ctgatcagca cccagagcgc catcccatac gccctgaggg tggagctgga ggactggaac 840
 ggcaggacca gcaccgccga ctacgccatg ttcaaagtgg gacccgaggc cgacaagtac 900
 aggetgacct acgcctactt tgccggaggg gacgctggcg acgccttcga cggettcgac 960
 ttcggcgacg accccagcga caagttcttc accagccaca acggcatgca gttcagcacc 1020

10

ES 2 585 246 T3

tgggacaacg acaacgacaa gttcgagggc aactgogccg agcaggacgg ctccgggtgg 1080
 tggatgaaca agtgccacgc cgggcacctg aacggcgtgt actaccaggg cggcacctac 1140
 agcaaggcca gcacccccaa cggctacgac aacggcatca tctgggccac ctggaaaacc 1200
 aggtggtaca gcatgaaaaa aaccaccatg aagatcatcc cattcaacag actgaccatc 1260
 ggcgagggcc agcagcacca cctgggcgga gccaaagcagg tgcggccaga gcaccccgcc 1320
 gagacagagt acgacagcct gtaccccgag gacgacctg 1359

<210> 13

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 13

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp
 20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr
 35 40 45

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys
 50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr
 65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro
 85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser
 100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr
 115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn
 130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln
 145 150 155 160

10

ES 2 585 246 T3

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly
 165 170 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
 180 185 190

Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
 195 200 205

Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
 210 215 220

Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
 225 230 235 240

Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
 245 250 255

Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
 260 265 270

Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
 275 280 285

Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
 290 295 300

Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
 305 310 315 320

Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
 325 330 335

Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
 340 345 350

Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
 355 360 365

His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
 370 375 380

Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
 385 390 395 400

Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn

ES 2 585 246 T3

405

410

415

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys
420 425 430

Gln Val Arg Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr
435 440 445

Pro Glu Asp Asp Leu
450

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos que está optimizada para su expresión en un sistema de cultivo de células de mamíferos, preferiblemente para la expresión en una célula COS, una célula BHK, una célula NS0, una célula CHO, Sp2/0 o un sistema de cultivo celular humano, más preferiblemente para su expresión en células PER.C6 o un sistema de cultivo celular HEK293, que comprende
 - (i) una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO. 4 o 7, o una parte de la misma que comprende los nucleótidos 60 a 1932 de SEQ ID NO. 4, nucleótidos 60 a 1887 de SEQ ID NO. 4 o nucleótidos 60-2598 de SEQ ID NO. 7, o una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO. 4 o 7 y que codifica una cadena alfa de fibrinógeno, o
 - (ii) una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO. 5, o la parte de la misma que comprende los nucleótidos 93 a 1473 de SEQ ID NO. 5, o una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO. 5 y que codifica una cadena beta del fibrinógeno o
 - (iii) una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO. 6 o 12, o una parte de la misma que comprende los nucleótidos 81 a 1311 de SEQ ID NO. 6 o nucleótidos 81 a 1359 de SEQ ID NO. 12, o una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO. 6 o 12 y que codifica una cadena gamma del fibrinógeno.
2. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, que está optimizada mediante adaptación de uso de codones a células CHO, preferiblemente con un índice de adaptación de codones de al menos 0,95.
3. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene un contenido de GC de al menos 55%.
4. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que muestra al menos 70% de identidad con sus respectivos homólogos no optimizados.
5. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que no contiene sitios de actuación en cis.
6. Una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-5.
7. Una célula de mamíferos que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-5.
8. Una célula de mamíferos que produce fibrinógeno recombinante intacto a niveles de al menos 3 picogramos por célula por día, donde la célula comprende una construcción de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6.
9. Una línea celular que produce fibrinógeno recombinante intacto a niveles de al menos 3 picogramos por célula por día, donde la línea celular esta basada en una célula de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un método para la producción de fibrinógeno en un sistema de cultivo de células de mamífero cuyo método comprende cultivar células de mamífero de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 8 o una línea celular de acuerdo con la reivindicación 9 bajo condiciones donde el fibrinógeno es producido, y opcionalmente, el fibrinógeno producido es recuperado.
11. Una preparación de fibrinógeno preparada por el método de la reivindicación 10.
12. Una preparación de fibrinógeno de acuerdo con la reivindicación 11, en la que más del 10% de las cadenas alfa, beta y gamma son de un tipo variante, donde el tipo variante es preferiblemente una cadena gamma prima o una cadena alfa extendida.
13. Una preparación de fibrinógeno de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12 para uso como un medicamento, como un sellador de tejidos o para facilitar la adherencia del tejido.
14. Uso de una preparación de fibrinógeno de acuerdo con las reivindicaciones 11-13 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la deficiencia de fibrinógeno.

15. Una preparación de fibrinógeno producida por el método de acuerdo con la reivindicación 10, en la que en dicha preparación más del 90% del fibrinógeno está en la forma intacta.

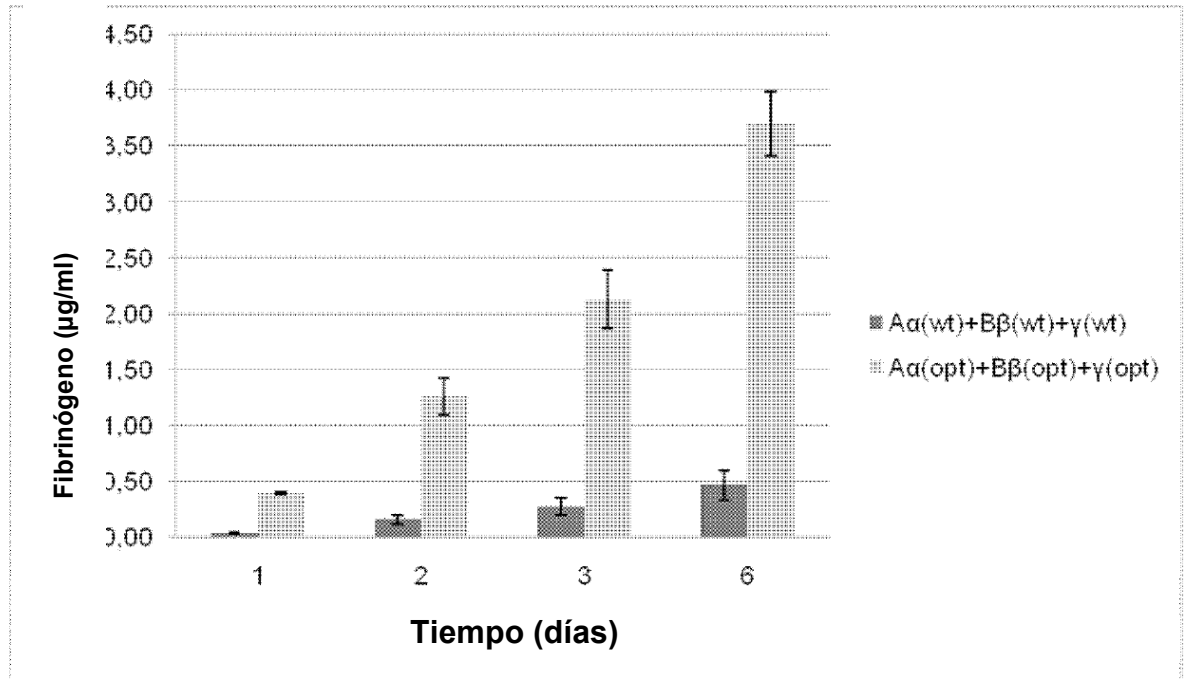


Fig. 1

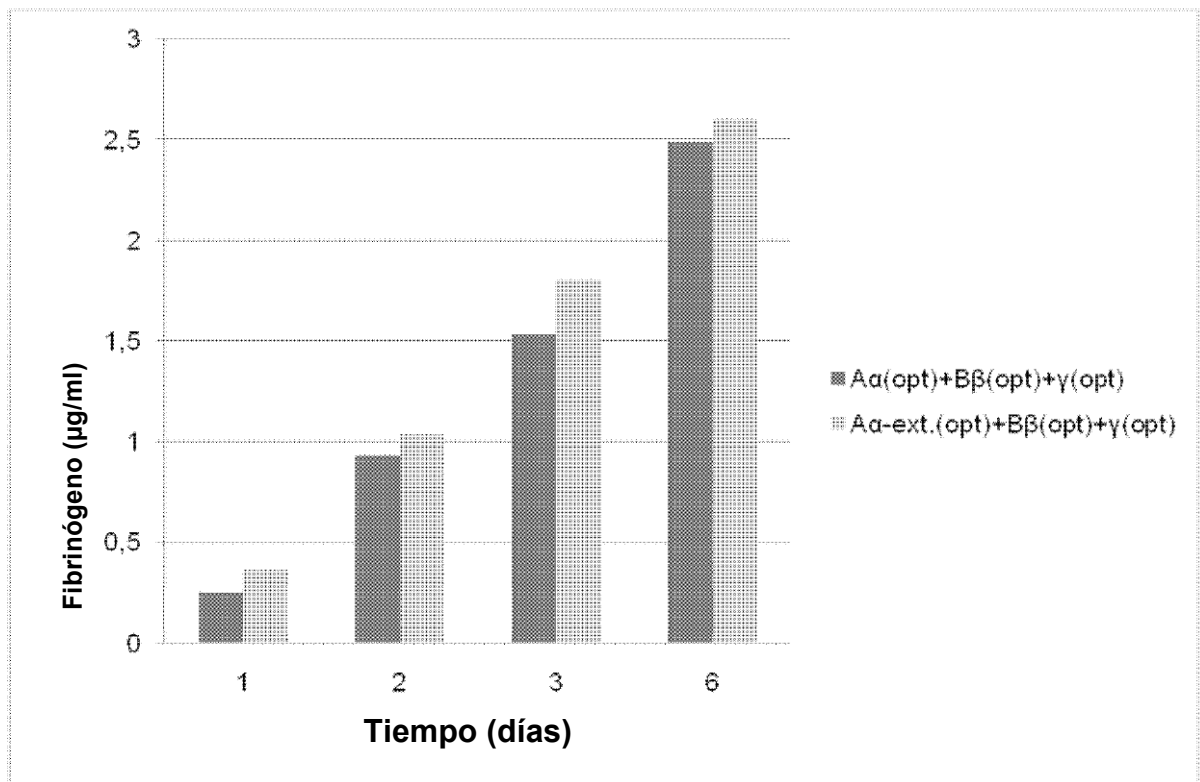


Fig. 2

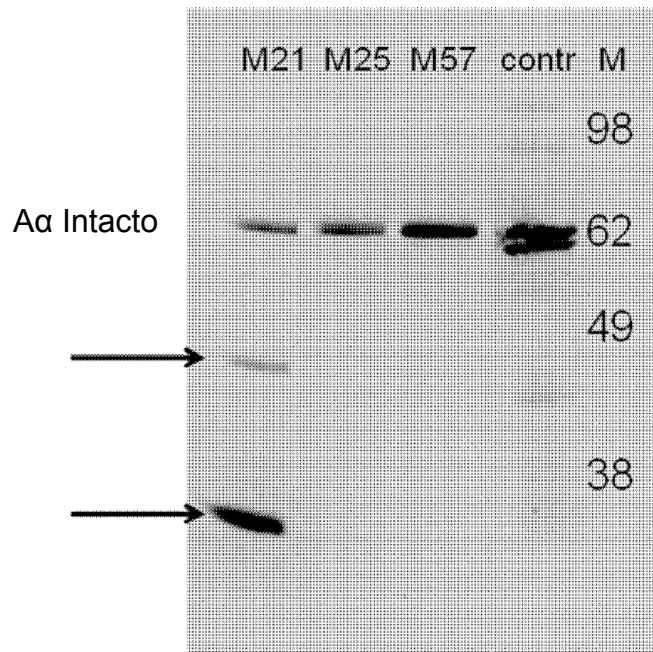


Fig. 3

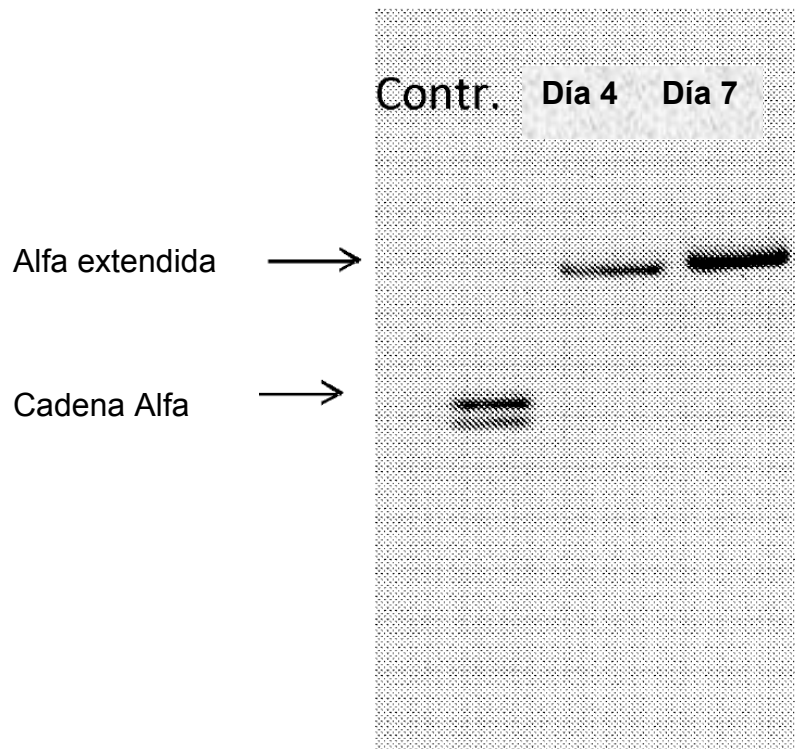


Fig. 4

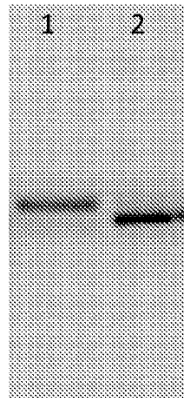


Fig. 5

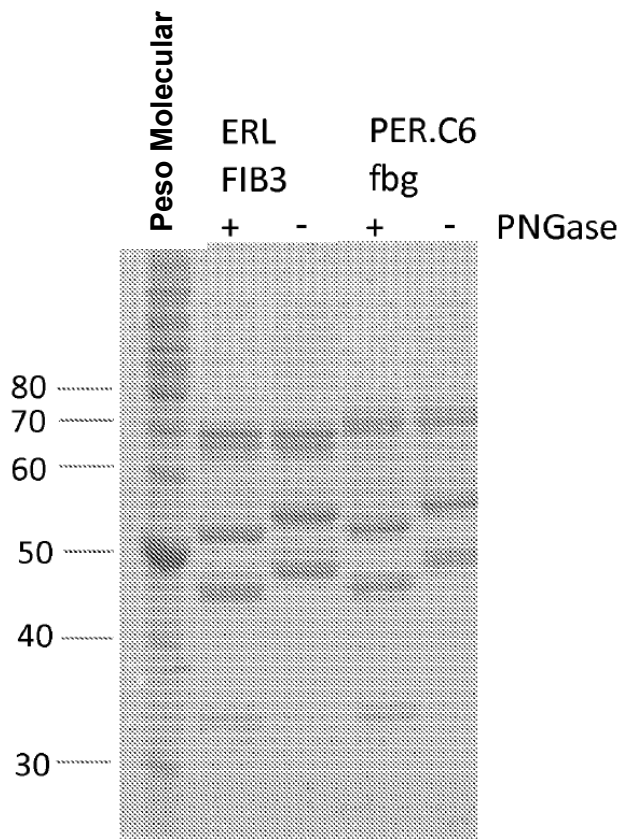


Fig 6.

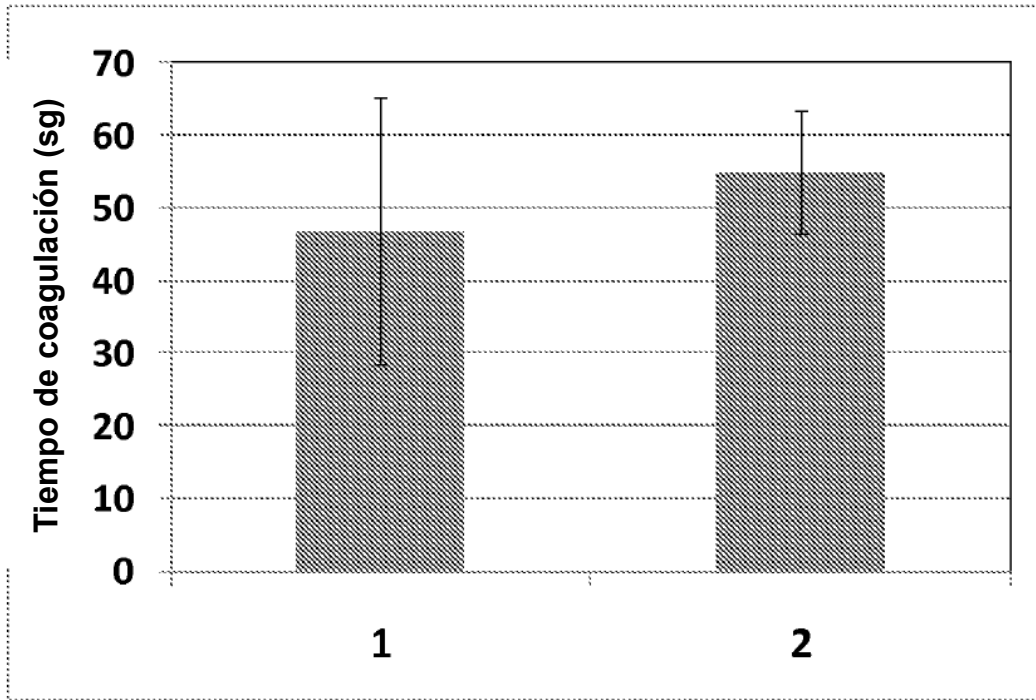


Fig. 7

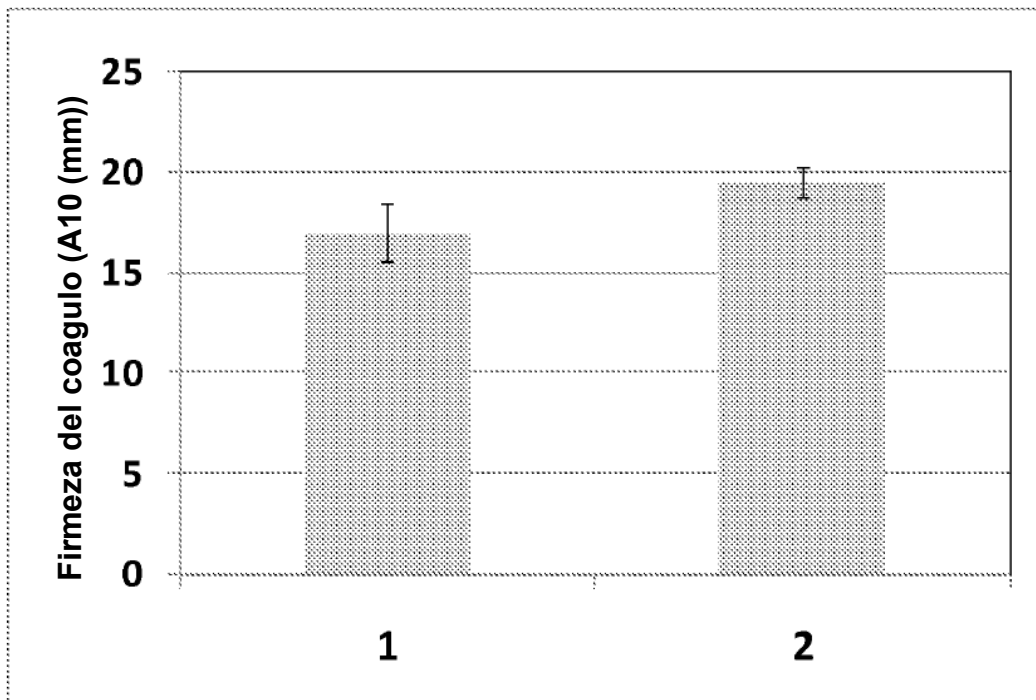


Fig. 8

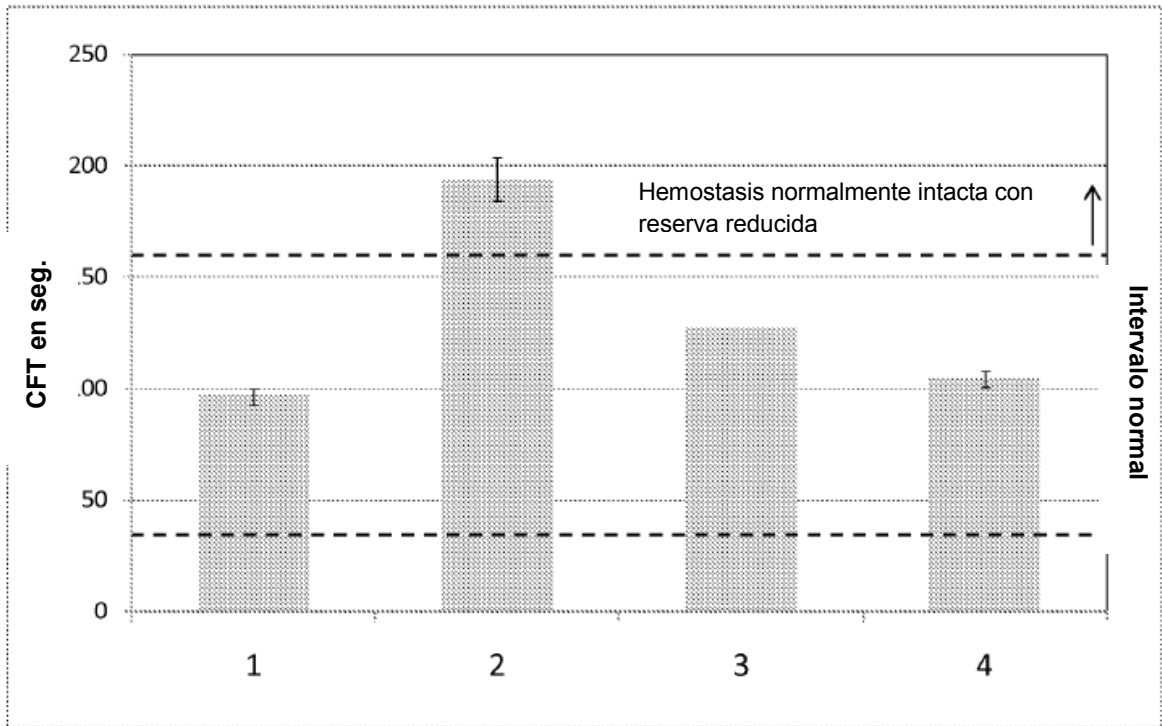


Fig. 9

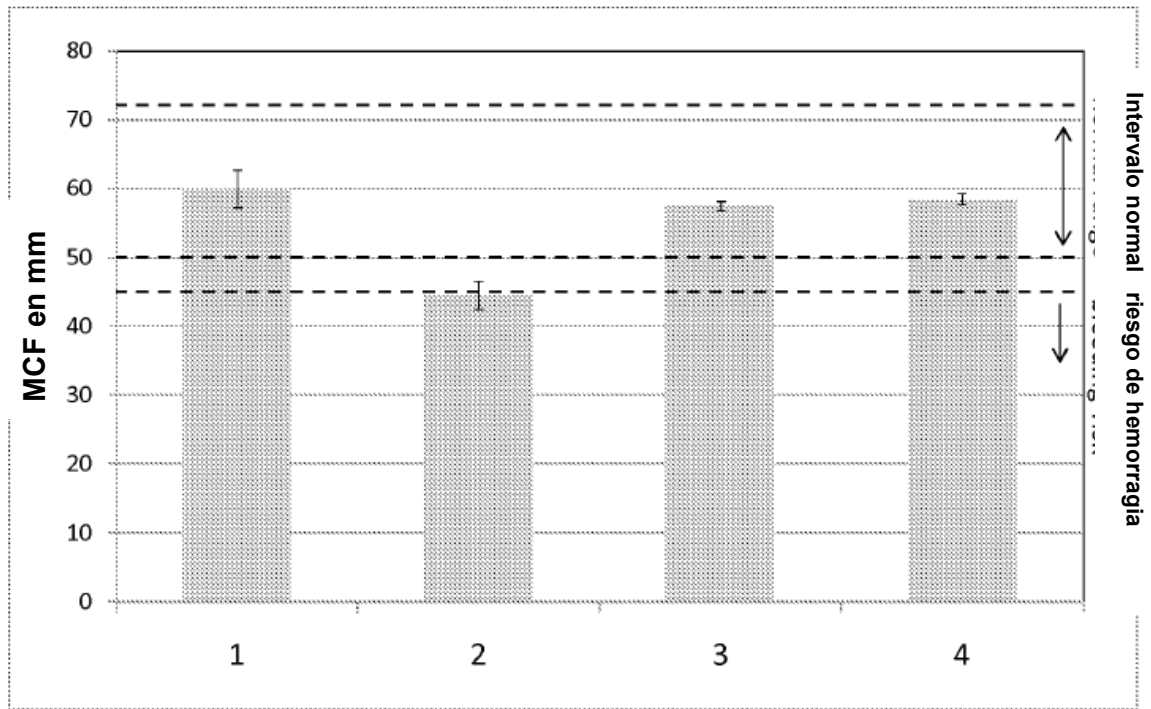


Fig. 10