

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 966**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/KR2011/008040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12057527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11836619 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2633058**

54 Título: **Método para la producción en masa de factor VII/VIIa**

30 Prioridad:

26.10.2010 KR 20100104403

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

24.01.2017

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHANG HWAN;
HONG, SUNG KAP;
LEE, BYUNG SUN;
HONG, SUNG HWAN y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 597 966 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la producción en masa de factor VII/VIIa

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método para la producción en masa del factor de coagulación VII humano, que comprende: a) construir un vector de expresión que lleva i) un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo y ii) un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen del factor de coagulación VII humano operativamente unido al mismo; b) transfectar el vector de expresión del paso a) en una línea de células animales; c) cultivar la línea de células animales transfectada del paso b) en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa para seleccionar células que expresan el factor de coagulación VII humano con alta eficacia; y d) añadir butirato de sodio a las células animales del paso c), y una línea celular para la producción en masa del factor de coagulación VII humano.

Antecedentes técnicos

El factor de coagulación VII (FVII) es un precursor de serina proteasa que produce que la sangre coagule en la cascada de coagulación donde activa el factor de coagulación X o factor IX. FVII, producido en el hígado, es una glucoproteína que consiste en una única cadena con un peso molecular de 50.000 Da. Cuando se descompone en dos cadenas por diferentes proteasas, entre las que están el factor Xa, factor XIIa, factor IXa y trombina, el FVII se activa a sí mismo a una forma activa FVIIa. FVII también se activa a FVIIa por unión a factores tisulares y fosfolípido A cargado negativamente (Nemerson et al, *Thromb. Res.*, 1985, 40:351-358).

En presencia de factor tisular e iones calcio, FVIIa activa el factor X a factor Xa que, a su vez, convierte la protrombina en trombina con la ayuda del factor Va en presencia de ion calcio y fosfolípido, realizándose la coagulación.

El factor VII, que consiste en 406 aminoácidos, se corta en el enlace peptídico entre la arginina 152 y la isoleucina 153 para formar el factor VIIa en el que la cadena ligera (152 aminoácidos) y la cadena pesada (254 aminoácidos) se mantienen juntas por un enlace disulfuro. La cadena ligera comprende un dominio de ácido glutámico gamma carboxilo (Gla) y dos dominios EGF (factor de crecimiento epidérmico) mientras que la cadena pesada es responsable de la actividad serina proteasa.

Para que el factor VII sea completamente funcional, se debe someter a gamma-carboxilación de 10 residuos de ácido glutámico N-terminales, que es un proceso dependiente de vitamina K (Hagen et al, *Natl. Acad. SC. U.S.A.*, 1986, 83:2412-2416). Se sabe que este dominio Gla está implicado en la unión del factor VII a la superficie celular que contiene el factor tisular (Sakai et al, *J.Biol Chem*, 1990, 265:1890-1894).

Hasta la fecha, hay dos enfoques para la producción de factor VIIa. En un enfoque, el factor VII se aísla y purifica de plasma y se activa a factor VIIa (Broze et al, *J. Biol. Chem*, 1980, 225:1242-1247). El otro es una técnica de ingeniería genética en la que células animales transformadas con una secuencia de ADN del factor VII se cultivan para producir factor VII (Solicitud de patente europea No: 86302855.1).

El factor VIIa derivado de plasma padece la desventaja de tener un bajo rendimiento de producción y carecer de consistencia en el suministro. Un problema particular con este factor está en el riesgo que representa para la seguridad del cuerpo. En contraste, el producto recombinante genético se considera que supera los deméritos del producto derivado de plasma.

Sin embargo, las células animales a partir de las cuales se produce el factor VII por recombinación genética generalmente tienen un bajo nivel de expresión, de modo que solo se puede asegurar baja productividad. Por tanto, para usar el factor VII como un agente terapéutico, es necesario obtener una línea celular en la que el factor se pueda producir establemente a escala en masa. En este contexto, un vector de expresión que tenga alta eficacia de expresión es indispensable.

El documento US2004/0185535 A1 divulga un método para la producción a escala industrial de polipéptidos FVII en un cultivo de células de mamífero sin componentes derivados de animales.

LI ROBERT W et al. *BMC GENOMICS*, vol.7, no.1, 14 de Septiembre 2006, página 234, divulga perfiles de expresión génica globales de células epiteliales de riñón bovino regulados por butirato de sodio. Se diseñaron y produjeron micromatrices bovinas con 86.191 oligonucleótidos 60meros distintos, cada uno con 4 replicados, con la tecnología Maskless Array Synthesizer. Los oligonucleótidos representan aproximadamente 45.383 secuencias únicas de ganado bovino. Se identificaron 450 genes regulados significativamente por butirato con una tasa de descubrimiento falso (FDR) mediana = 0%. La mayoría de estos genes se reprimían por butirato y se asociaban con control del ciclo celular. Los niveles de expresión de 30 genes seleccionados identificados por la micromatriz se

confirmaron usando PCR a tiempo real. Los resultados de la PCR a tiempo real se correlacionaban positivamente ($R = 0,867$) con los resultados de la micromatriz.

KRUH J., MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 42, no. 2, 1 de Mayo 1982, páginas 65-82, divulga que el butirato de sodio, a concentraciones milimolares, cuando se añade a cultivos celulares produce muchas modificaciones morfológicas y bioquímicas de una manera reversible. Algunas de ellas se producen en todas las líneas celulares. Se refieren a mecanismos reguladores de expresión génica y crecimiento celular: una hiperacetilación de histona resultante de una inhibición de histona desacetilasa y una parada de la proliferación celular se observan casi constantemente.

Divulgación

Problema técnico

Precediendo a la presente divulgación, la investigación intensa y completa en la producción en masa de factor VII, realizada por los presentes inventores, produjo el descubrimiento de que un vector de expresión con un promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR) que carece de la secuencia repetitiva rica en GC permite que células animales se transformen en esas capaces de expresar establemente factor VII con alta eficacia, medido por una serie de experimentos en los que el vector de expresión se transfirió en una línea de células animales para dar un transformante de célula única y cuando el transformante de una única célula se cultivó en presencia de un amplio espectro de concentración de butirato de sodio, en donde la expresión del factor VII aumentó significativamente a una concentración relativamente alta de butirato de sodio.

Solución técnica

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para producir factor VII, que comprende: a) construir un vector de expresión que lleva i) un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo y ii) un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen del factor de coagulación VII humano operativamente unido al mismo; b) transfectar el vector de expresión del paso a) en una línea de células animales; c) cultivar la línea de células animales transfectada del paso b) en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa para seleccionar células que expresan el factor de coagulación VII humano con alta eficacia; y d) añadir butirato de sodio a las células animales del paso c).

Es otro objeto de la presente divulgación proporcionar una línea celular para producir factor VII.

Efectos ventajosos

Al emplear un vector que tiene un promotor de DHFR que carece de las secuencias repetitivas ricas en GC, la presente divulgación puede producir factor de coagulación VII humano con alta eficacia a gran escala, que contribuye al tratamiento de hemofilia.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un proceso de construcción y mapa de un vector de expresión de hFVII.

La figura 2 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de hFVII en colonias formadas de una línea celular transformada con un vector de expresión de hFVII, medido por ELISA.

Mejor manera

Según un aspecto de la misma, la presente divulgación proporciona un método para la producción en masa del factor de coagulación humano VII, que comprende: a) construir un vector de expresión que lleva i) un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo y ii) un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen del factor de coagulación VII humano operativamente unido al mismo; b) transfectar el vector de expresión del paso a) en una línea de células animales; c) cultivar la línea de células animales transfectada del paso b) en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa para seleccionar células que expresan el factor de coagulación VII humano con alta eficacia; y d) añadir butirato de sodio a las células animales del paso c).

Preferiblemente, el paso a) aborda construir un vector de expresión que lleva i) un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo y ii) un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen del factor de coagulación VII humano operativamente unido al mismo.

El término “región rica en GC”, como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia CCGCC repetida en el promotor de dihidrofolato reductasa. Cuando toda o una parte de la secuencia repetitiva se elimina artificialmente por delección o mutación, el nivel de expresión de dihidrofolato reductasa está en un mínimo. En estas condiciones, la presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa produce que las células amplifiquen el gen de la dihidrofolato reductasa a una mayor frecuencia para supervivencia, produciendo de esta manera la alta expresión simultánea de un gen de interés llevado por un vector de expresión que contiene el gen de la dihidrofolato reductasa.

Por tanto, según una forma de realización de la misma, la presente divulgación proporciona un casete de inducción de alta expresión que comprende un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCCC y un gen de dihidrofolato reductasa. Preferiblemente, el casete de inducción de alta expresión comprende un promotor de dihidrofolato reductasa en el que la secuencia repetitiva CCGCCC se repite seis veces o menos, más preferiblemente tres veces o menos, más particularmente preferible una vez o menos, e incluso más particularmente preferible es cuando está ausente.

La eliminación de estas secuencias repetitivas CCGCCC se puede lograr por técnicas de sustitución o delección genéticamente recombinantes que se conocen ampliamente en la técnica. En una forma de realización de la presente divulgación, una parte de una secuencia de bases que contiene las secuencias repetitivas CCGCCC se deleciona para eliminar una parte o toda la región rica en GC del promotor.

Como se usa en el presente documento, el término “dihidrofolato reductasa” se refiere a una enzima que reduce el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico con NADPH que sirve como donante de electrones. En seres humanos, el gen DHFR codifica la enzima.

El término “factor de coagulación humano” o solo “factor”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que está implicada en la coagulación sanguínea tras hemorragia, ofreciendo de esta manera protección. El término “coagulación” se refiere a un proceso complejo en el que la sangre forma coágulos y en el que participan 12 factores. La presente divulgación se dirige a la producción en masa de factor VII.

El término “factor VII”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína inestable al calor con un peso molecular de 50.000 Da, también conocida como proconvertina, que se produce en el hígado y oscila en nivel en suero desde 20 a 40 mg/ml. Para uso en coagulación, el factor VII se debe activar a una forma activa, es decir, el factor VIIa. El factor VII codificado por un gen que comparte homología del 70% o mayor, preferiblemente del 80% o mayor, más preferiblemente del 90% o mayor, mucho más preferiblemente del 95% o mayor, y lo más preferiblemente del 97% o mayor con el gen del factor VII de tipo salvaje está dentro del ámbito de la presente divulgación. Preferible es factor VII codificado por el gen de SEQ ID NO: 3.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otro segmento de ADN de modo que se produzca la replicación del segmento unido. Un “replicón” se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN in vivo, es decir, que es capaz de replicación bajo su propio control. El término “vector” incluye vehículos tanto víricos como no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula huésped in vitro, ex vivo o in vivo. El término “vector” también puede incluir ADN minicirculares. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido sin secuencias de ADN bacteriano. Se ha mostrado que la eliminación de secuencias de ADN bacteriano que son ricas en regiones CpG disminuye el silenciamiento de la expresión del transgén y produce una expresión más persistente de vectores de ADN de plásmido (véase, por ejemplo, Ehrhardt, A. et al. (2003) Hum Gene Ther 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) Mol Ther 5: 731-38; Chen, Z. Y. et al. (2004) Gene Ther 11: 856-64). El término “vector” también puede incluir transposones tal como Bella Durmiente (Izsvak et al. J. Mol. Biol. 302:93-102 (2000)), o cromosomas artificiales. Como se usa en el presente documento, el término “vector de expresión” significa un vector que puede expresar una proteína de interés, por ejemplo, el factor, con alta eficacia. En la presente divulgación, el vector de expresión contiene i) un promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR) que carece de una o más secuencias de repetición CCGCCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo. Preferiblemente, el vector de expresión puede ser el pXOCG-FVII ilustrado en la figura 1. Los ejemplos de vectores de expresión útiles en la presente divulgación incluyen plásmidos, cósmidos, bacteriófagos, vector de adenovirus, vectores de retrovirus, y vectores de virus adenoasociados, con una preferencia por plásmidos.

Preferiblemente, el vector de expresión puede incluir además un gen que codifica un factor de coagulación VII humano. El factor de coagulación VII humano se puede expresar a altos niveles expresando el vector de expresión.

El factor de coagulación VII humano se puede expresar bajo el control del promotor del gen DHFR o bajo el control de un promotor independiente. Preferiblemente, el factor de coagulación VII humano se puede colocar bajo el control de un promotor independiente. Tales promotores incluyen los ampliamente conocidos en la técnica, y los ejemplos no limitantes de tales promotores incluyen el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor de LTR, el promotor de EF α , el promotor de SV40 y el promotor de TK. Los expertos en la materia seleccionarán fácilmente cualquiera del grupo que consiste en los promotores anteriormente mencionados.

El vector de expresión de la presente divulgación, que se proporciona para inducir alta expresión de un gen del factor de coagulación VII humano en células animales, puede incluir además preferiblemente un gen de resistencia para células animales, que se usa como un marcador seleccionable para expresión permanente del gen en células animales. Los ejemplos no limitantes de tales genes de resistencia para células animales incluyen los comúnmente usados en la técnica, tal como el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a zeomicina, el gen de resistencia a higomicina, y el gen de resistencia a blastomicina.

Asimismo, el vector de expresión de la presente divulgación puede además incluir, pero no está limitado a, elementos constituyentes generales de un vector, tal como un origen de replicación y una señal de poliadenilación, y otros elementos de control transcripcional.

Preferiblemente, el paso (b) aborda la transformación de una línea de células animales con el vector de expresión del paso a).

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" o "transfección" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la alteración genética artificial de una célula resultante de la introducción de un gen exógeno en la célula huésped de modo que el gen introducido se puede replicar por sí mismo o como un factor incorporado en el cromosoma.

El vector de la presente divulgación se puede introducir en células huésped usando técnicas estándar adecuadas que se conocen en la técnica, ejemplos de las cuales incluyen electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, infección retroviral, microinyección, DEAE-dextrano, y calcio de liposoma catiónico, pero no están limitadas a las mismas.

En la presente divulgación, por ejemplo, un vector de expresión que tiene un gen recombinante se transforma en células CHO con la ayuda de Lipofectamina.

Se puede realizar un procedimiento para cultivar líneas de células animales usando cualquier medio y condiciones de cultivo bien conocidos en la técnica que sean adecuados. Los expertos en la materia pueden controlar fácilmente el procedimiento de cultivo para que se ajuste a las cepas empleadas. Por ejemplo, el procedimiento puede implicar cultivo en suspensión o un método de cultivo adherente según el tipo de crecimiento de las células, que se puede realizar en un tipo por lotes, en un tipo continuo o en un tipo de lote alimentado. El medio de cultivo debe cumplir adecuadamente los requisitos específicos de las líneas celulares que se van a cultivar.

Un medio de cultivo para células animales puede contener una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y oligoelementos. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y grasas tal como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tal como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tal como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tal como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden estar presentes solas o en combinación en el medio de cultivo. Como una fuente de nitrógeno, un material orgánico tal como peptona, extracto de levadura, caldo, extracto de malta, licor de maceración del maíz (CSL) y soja, o un compuesto nitrogenado inorgánico tal como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio puede estar contenido en el medio de cultivo. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinación. Además, el medio de cultivo puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados.

Además, el medio se puede suplementar con un inhibidor de DHFR, tal como metotrexato. Es decir, como se ha descrito anteriormente, puesto que la presente divulgación se dirige a establecer eficazmente en un tiempo corto un sistema por el cual el gen DHFR portado en un vector se amplifica y selecciona transformando células animales deficientes en DHFR con un vector de expresión según la presente divulgación y dosificando las células con un inhibidor de DHFR de modo que se amplifique un gen recombinante.

En una forma de realización preferida, la concentración del inhibidor de DHFR que se usa es preferiblemente tan baja como sea posible durante un periodo corto de tiempo por el bien del coste de producción y la estabilidad de las líneas celulares. Es decir, el uso de una baja concentración del inhibidor de DHFR asegura la producción en masa estable de la proteína de interés y reduce el tiempo que lleva desarrollar una línea celular de expresión. En detalle, la presente divulgación proporciona un método de producir un factor de coagulación VII humano transformando células CHO deficientes en DHFR con el vector de expresión de la proteína recombinante y dosificando las células con menor de 100 nM de metotrexato, y preferiblemente menos de 50 nM de metotrexato.

La proteína recombinante de interés requiere células animales para su expresión. A la luz del fin de la presente divulgación, los ejemplos de células animales adecuados incluyen células de carcinoma ovárico de hámster chino (CHO), células de riñón de mono (COS7), células NSO, células SP2/0, células W138, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células MDCK, células de mieloma, células HuT 78, y células 293, pero no están limitadas a las mismas. Los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente una línea de células animales adecuada para uso

en el sistema de amplificación basado en DHFR según la presente divulgación. En la presente divulgación puede ser preferible una célula deficiente en dihidrofolato reductasa.

El término "célula huésped transformada con un vector recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula huésped que ancla en la misma un vector recombinante que lleva un gen de interés. La célula huésped adecuada para uso en la presente divulgación se puede originar de células de roedores o células de mamífero, preferiblemente células animales o células derivadas de animal, y lo más preferiblemente células CHO. Cuando el fin es expresar establemente el gen de interés y amplificar el número de copia del gen en una célula, se puede introducir un vector (por ejemplo, pCHO1) que tiene un gen DHFR que compensa la deficiencia en una célula CHO deficiente en rutas sintéticas de ácidos nucleicos, y amplificar con metotrexato (MTX).

El término "huésped" en la presente divulgación abarca un animal. Para animales, están disponibles varios sistemas de producción que utilizan un mamífero o un insecto. El mamífero incluye cabras, cerdos, ovejas, ratones y ganado (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Además, el mamífero también puede incluir un animal transgénico. Además, se puede usar un gusano de seda como un insecto huésped. El gusano de seda se infecta con un baculovirus en el que se ha insertado el ADN que codifica una proteína deseada. La proteína deseada se puede obtener del líquido corporal del gusano de seda (Nature, Vol. 315, p.592-594, 1985). Preferiblemente, se usan células CHO como las células huésped en la presente divulgación.

En detalle, se usó una línea de células de carcinoma ovárico de hámster chino deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (CHO/dhfr-). Es decir, las células CHO deficientes en DHFR se transformaron con un vector de expresión que lleva un gen que codifica el factor de coagulación VII humano según la presente divulgación. En las células CHO transformadas, se encontró que el gen estaba amplificado a un número de copias suficiente incluso a una concentración de metotrexato de menos de 100 nM, e incluso menor de 50 nM, que era preferible. Por tanto, la presente divulgación proporciona tal línea de células animales.

Según la presente divulgación, el paso c) aborda cultivar la línea de células animales transformada del paso b) en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa para seleccionar una línea celular que expresa factor VII con alta eficacia.

Más preferible puede ser HMF708 (KCTC 11779BP). La línea celular HMF708 se depositó con el KTCT (Centro de Recursos Genéticos, KRIBB, 111 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Corea) el 25 de octubre, 2010, con el número de registro KCTC 11779BP. La línea celular seleccionada se asimiló a cultivo en suspensión usando un medio sin suero (medio EX-CELL CHO, Sigma, EE UU, No. de cat. 14360C).

Según la presente divulgación el paso (d) aborda la adición de butirato de sodio a la línea de células animales seleccionada del paso c) para inducir la producción en masa del factor VII.

El butirato de sodio inhibe la histona diacetilasa, lo que produce hiperacetilación de histona. Tiene varios efectos en células de mamífero cultivadas incluyendo la inducción de diferenciación y expresión génica. En la presente divulgación, el compuesto se usa como un aditivo para inducir la producción en masa de factor VII. En este contexto, la cantidad del mismo la pueden determinar fácilmente los expertos en la materia y está preferiblemente en el orden de 0,1 a 3,0 mM y más preferiblemente en el orden de 0,1 a 1,5 mM.

Según una forma de realización de la misma, la presente divulgación proporciona la construcción de dos casetes inducibles de alta expresión, uno de los cuales contiene solo una de las secuencias de repetición CCGCCC del promotor de DHFR y el otro de los cuales no contiene ninguna de las mismas, y líneas celulares de E. coli transformadas con estos casetes. Los transformantes de E. coli se depositaron con la KCTC (Colección Coreana para Cultivos Tipo; Centro de Recursos Genéticos, KRIBB, 111 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Corea) el 2 de octubre, 2006, con el número de registro KCTC 10991 BP y KCT 10992 BP, respectivamente. Para inducir la alta expresión de una proteína recombinante de interés, los casetes inducibles de alta expresión se aislaron de líneas celulares de E. coli y se manipularon genéticamente para llevar un gen que codifica una proteína factor de coagulación VII humano para construir un vector de expresión recombinante. El vector pXOGC-FVII, mostrado en la figura 1, se puede usar preferiblemente como un vector de expresión que puede permitir que se produzca una proteína factor de coagulación VII humano en células CHO en un medio de cultivo suplementado con butirato de sodio.

Una secuencia de bases que codifica el factor VII producida según la presente divulgación puede ser preferiblemente la secuencia de SEQ ID NO: 3.

La proteína del factor de coagulación VII humano se puede expresar bajo el control del promotor del gen de DHFR o bajo el control de un promotor separado. Preferiblemente, la proteína del factor de coagulación VII humano se puede colocar bajo el control de un promotor independiente. Este puede ser uno bien conocido en la técnica, y se puede seleccionar fácilmente de entre, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), promotor de LTR, promotor de EF α , promotor de SV40 y promotor de TK por los expertos en la materia.

Cuando se produce el factor VII en la línea celular anteriormente mencionada, el método puede comprender además purificar el factor VII a gran escala.

Además, el método puede comprender además activar el factor VII producido a factor VIIa.

En una forma de realización de la presente divulgación, las secuencias ricas en GC del promotor de DHFR se hicieron inactivas para minimizar la expresión de DHFR, seguido por añadir un inhibidor de DHFR para inducir que el gen DHFR se amplifique. Las células transformadas en las que se produjo la amplificación génica se sometieron a dilución limitante para obtener poblaciones clonales derivadas de células individuales. Los clones de células individuales así obtenidos se cultivaron en un medio sin suero que contenía butirato de sodio a gran escala para producir factor VII. Además, se llevaron a cabo la purificación del factor VII y la activación del factor VII.

Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona una línea celular para producir factor de coagulación VII humano. Más preferible puede ser HMF708 (KCTC 11779BP).

Modo

Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente divulgación mediante los siguientes ejemplos que se muestran para ilustrar, pero no se deben interpretar como que limitan la presente divulgación.

Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión (pX0GC-FVII) para factor VII recombinante

<1-1> Amplificación del factor VII

Para uso en inducir la sobreexpresión de factor VII recombinante en células animales, se construyó un vector de expresión. Se obtuvo un gen de factor VII humano que contiene una secuencia señal usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La amplificación de un gen del factor VII se realizó usando los cebadores directo e inverso de SEQ ID NO: 1 y 2, con la genoteca de ADNc de hígado fetal humano (comprada de Clontech USA, ahora incorporada a TAKARA BIO USA) que sirve como molde. Por conveniencia de clonación, los cebadores directo e inverso se diseñaron para tener sitios de enzimas de restricción BamHI y XhoI, respectivamente. Estos cebadores se dan en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1

Cebadores para amplificar el gen del factor VII humano

Cebador de factor VII	Secuencia de bases	SEQ ID NO
Directo (VIIBHISS)	Cccggatccatggctctccaggccctcaggctcc	1
Inverso (VIIXhoIAS)	gggctcgagctagggaaatggggctcgcagg	2

Se colocó una mezcla que comprendía la genoteca de ADNc (100 ng), los cebadores, dNTP, y polimerasa pFX (Invitrogen) en un tubo de PCR y se sometió después a PCR que empezó con desnaturalización a 95°C durante 1 min y después se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos y extensión de 68°C durante 90 segundos, seguido por extensión a 68°C durante 5 minutos. El producto de PCR de 1,3 kb de longitud así obtenido se identificó que tenía la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 por secuenciación de ADN.

<1-2> Construcción del vector de expresión del factor VII recombinante (pX0GC-FVII)

Para colocarlo bajo el control de un promotor de CMV, el producto de PCR del factor VII, preparado en el ejemplo <1-1>, se ligó al vector de expresión en animales pX0GC. El vector pX0GC es un vector de expresión en el que un promotor de DHFR que carece de una o más secuencias repetitivas CCGCC está operativamente unido a un gen DHFR de modo que se induce alta expresión de una proteína recombinante de interés (referencia a la patente coreana No. 880509).

El gen del factor VII de 1,3 kb de longitud obtenido por PCR se digirió a 37°C durante 2 horas con BamHI y XhoI y se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen USA). Por separado, el vector de expresión en animales pX0GC también se digirió con las mismas enzimas de restricción, es decir, BamHI y XhoI en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y se purificó por electroforesis. Estos segmentos de ADN se ligaron entre sí en presencia de ADN ligasa de T4 para formar un vector recombinante pX0GC-FVII.

Ejemplo 2: Establecimiento de una línea celular que expresa factor VII humano

<2-1> Transformación de la línea celular

Para preparar una nueva línea celular que produce factor VII humano a gran escala, el vector de expresión del factor VII humano recombinante (pX0GC-FVII), construido en el ejemplo 1 se introdujo en la línea de células CHO que

mostraba síntesis inestable de ADN debido a la deficiencia en DHFR (CHO/dhfr-) (Urlaub et al., Somat. Cell. Mol. Genet., 12, 555-566, 1986). A este respecto, se cultivaron células DG44-CHO (deficientes en dhfr) (obtenidas del Dr. Chasin, Universidad de Columbia) en botellas T75 y cuando crecieron hasta el 80-90 de confluencia, las células se transfectoron usando Lipofectamina (Cibco, No. de cat. 18324-012). En cada uno de dos tubos se colocaron 3 ml de Opti-MEM (Gibco, No. de cat. 51985034). A continuación, los dos tubos recibieron 5 µg de ADN y 20 µl de lipofectamina, respectivamente y se dejaron reposar durante 30 min. Estas dos soluciones se mezclaron, y el complejo ADN-lipofectamina así formado se dejó caer sobre las células que se habían lavado previamente tres veces con medio Opti-MEM. Las células se incubaron a 37°C durante 18 horas en un incubador con CO₂ al 5%, se lavaron tres veces con DMEM-F12 (Gibco, no. de cat. 11330) suplementado con suero bovino fetal al 10% (BSA), y se cultivaron de nuevo durante 48 horas en un medio de cultivo. Cuando habían crecido hasta casi confluencia completa, las células se recogieron por tripsinización. Para seleccionar transformantes, las células se sembraron en nuevas botellas de cultivo que contenían un medio de selección MEM-α (WELGENE, no. cat. LM008-029) suplementado con SBF dializado al 10% y G418 1 mg/ml (Cellgro, no. cat. 61-234-RG) y libre de suplemento de HT (hipoxantina-timidina). Las células se cultivaron con un medio fresco intercambiado cada 2 o 3 días hasta que las células transformadas sobrevivieron para formar colonias.

<2-2> Identificación de expresión de factor VII humano usando inmunoensayo enzimático

Las células transformadas del ejemplo <2-1> se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Cuando las células habían crecido hasta casi confluencia completa, CHO-A-SFM sin suero (Gibco, No. de cat. 05-5072EF) suplementado con butirato de sodio 0,3 mM (Sigma, No. de cat. B5887) se alicoteó en una cantidad de 200 µl/pocillo, seguido por incubación a 33°C durante 48 horas en un incubador con CO₂ al 5%. El cultivo celular se transfirió a tubos de 1,5 ml y se centrifugó. Se midieron los niveles de expresión del factor VII humano en los sobrenadantes tomando medidas usando un kit de inmunoensayo enzimático (American Diagnostica, no. de cat. 877) según las instrucciones del fabricante. En detalle, el cultivo celular y la sustancia estándar contenida en el kit se diluyeron a ciertas concentraciones en solución salina fisiológica que contenía Tween-20 al 0,05%, y las diluciones se añadieron en una cantidad de 100 µl a cada pocillo del kit y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante una hora en un agitador de placas. Después de lavarlos cuatro veces con la solución de lavado contenida en el kit, cada uno de los pocillos se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl de un anticuerpo anti-factor VII humano en un agitador de placas. Cada pocillo se lavó de nuevo cuatro veces con la solución de lavado y después se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con 100 µl de un anticuerpo conjugado de HRP (peroxidasa de rábano) contra el anticuerpo anti-factor VII humano. Posteriormente, los pocillos se lavaron cuatro veces, y se incubaron con 100 µl de un sustrato por pocillo a temperatura ambiente. Cinco minutos después, se añadieron 50 µl de una solución de parada a cada pocillo, seguido por medir la absorbancia a 450 nm. Se obtuvieron una curva estándar y una función de las concentraciones de la solución estándar y los valores de absorbancia obtenidos. La curva se usó para cuantificar el factor VII humano, que indica que las células seleccionadas expresaban un cierto nivel de factor VII humano.

<2-3> Selección de una línea celular que expresa factor VII humano

Para aumentar el nivel de expresión de factor VII humano en las células que se identificaron que expresaban factor VII humano en el ejemplo <2-2>, las células seleccionadas por un medio de selección que contenía MTX 10 nM (metotrexato, Sigma, No. de cat. M8407) se cultivaron durante dos semanas en botellas de cultivo T75 con un pase cada tres días. Una parte de las células en cada pocillo se transfirieron a placas de 24 pocillos y se incubaron de la misma manera que en ejemplo <2-2> antes de la determinación de los niveles de expresión de factor VII humano. Puesto que el nivel de expresión del factor VII humano no aumentó a una concentración de 10 nM o mayor, se aislaron clones de células individuales por el método de la dilución limitante para reducir la heterogeneidad en este punto. Es decir, se separaron clones con niveles de expresión heterogéneos de factor VII humano en clones de células individuales cuyo factor VII humano tenía un nivel de expresión homogéneo y que mostraron alta productividad. A este respecto, las células en el pocillo que se habían identificado como que muestran el mayor nivel de expresión entre las células de las placas de 6 pocillos se diluyeron a una densidad de no más de una célula por pocillo de placas de 96 pocillos, y solo una célula sembrada por pocillo se cultivó durante 2-3 semanas. Después de ello, las células se aislaron de las placas de pocillos donde se formaron colonias, y se subcultivaron antes de determinar el nivel de expresión de factor VII humano por un método de inmunoensayo enzimático (figura 2). Entre las líneas celulares separadas por el método de la dilución limitante, una CHO recombinante que mostró un rasgo de proliferación estable y alta productividad de factor VII humano en presencia de MTX 10 nM se seleccionó finalmente y se nombró HMF708. La cepa HMF708 se depositó con el KTCT (Centro de Recursos Genéticos, KRIBB, 111 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Corea) el 25 de octubre, 2010, con el número de registro KCTC 11779BP. La línea celular seleccionada se asimiló a un cultivo en suspensión usando un medio sin suero (medio EX-CELL CHO, Sigma, EE UU, No. de cat. 14360C).

Ejemplo 3: Crecimiento de la línea celular en presencia de butirato de sodio y medida del nivel de hVII (1)

<3-1> Siembra y cultivo principal

Se tomó un vial (1×10^7 células/ml) de la línea celular que expresa hFVII que se había seleccionado y asimilado a un cultivo en suspensión en el ejemplo <2-3> de un tanque de nitrógeno líquido y se descongeló tan rápido como fue posible en un baño a 37°C. Después de lavarlas una vez con un medio de cultivo de siembra (medio EX-CELL CHO, (Sigma, No. de cat. 63225C) suplementado con glutamina 0,3 g/l), el cultivo celular se centrifugó a 90×g durante 5 min y después se inoculó en 50 ml de un medio de cultivo de siembra en un matraz Erlenmeyer (Corning, EE UU cat# 431144). Cuando habían crecido durante 1-2 días a una densidad de 10×10^5 células/ml en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%), las células se centrifugaron otra vez de la misma manera y después se subcultivaron en 100 ml de un medio de cultivo de siembra fresco en un matraz Erlenmeyer nuevo. El pase de doble volumen siguió hasta que hubo un número suficiente de células.

<3-2> Crecimiento de la línea celular en medio de producción que contiene butirato de sodio y medida del nivel de hFVII

Se examinó el efecto del butirato de sodio en la producción de hFVII. Para esto, primero, la línea celular CHO recombinante que se había cultivado se inoculó a una densidad de $5,0 \times 10^6$ células/ml en 50 ml de un medio de producción en cada uno de tres matraces Erlenmeyer que contenían butirato de sodio (No. de cat. B5887, SIGMA, EE UU) a concentraciones de 0,3, 1,0 y 1,5 mM, respectivamente. Las células que crecieron en presencia de butirato de sodio 0,3 mM se usaron como control para comparación. Las células se cultivaron a 30,0°C durante cuatro días para producir hFVII. El día 4, se examinaron la concentración de células y actividad celular de los cultivos celulares. No hubo cambios en la densidad celular y actividad celular entre los cultivos celulares de diferentes concentraciones de butirato.

Además, después de la centrifugación de los cultivos celulares el día 4, los niveles de hFVII en los sobrenadantes se midieron usando un método de inmunoensayo enzimático como en el ejemplo <2-2>. Las medidas se expresan como % de producción comparada con el control y se resumen en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Nivel de producción de hFVII según la concentración de butirato de sodio (%)

Conc. de butirato Na (mM)	Nivel de FVII (% comprado al control)	Densidad celular final (% comparado al control)	Actividad celular (% comparado al control)
0,3	100,0	100,0	100,0
1,0	164,9	106,8	100,2
1,5	190,1	108,5	99,9

Como se puede ver, la producción de hFVII aumentó de una manera dependiente de la dosis de butirato de sodio.

Ejemplo 4: Crecimiento de la línea celular en presencia de butirato de sodio y medida del nivel de hFVII (2)

<4-1> Siembra y cultivo principal

Se tomó un vial (1×10^7 células/ml) de la línea celular que expresa hFVII que se había seleccionado y asimilado a un cultivo en suspensión en el ejemplo <2-3> de un tanque de nitrógeno líquido y se descongeló tan rápido como fue posible en un baño a 37°C. Después de lavarlas una vez con un medio de cultivo de siembra (medio EX-CELL CHO, (Sigma, No. de cat. 63225C) suplementado con glutamina 0,3 g/l), el cultivo celular se centrifugó a 90×g durante 5 min y después se inoculó en 50 ml de un medio de cultivo de siembra en un matraz Erlenmeyer (Corning, EE UU cat# 431144). Cuando habían crecido durante 1-2 días a una densidad de 10×10^5 células/ml en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%), las células se centrifugaron otra vez de la misma manera y después se subcultivaron en 100 ml de un medio de cultivo de siembra fresco en un matraz Erlenmeyer nuevo. El pase de doble volumen siguió hasta que hubo un número suficiente de células.

<4-2> Crecimiento de la línea celular en medio de producción a escala en masa que contiene butirato de sodio y medida del nivel de hFVII

Se examinó el efecto del butirato de sodio en la producción de hFVII cuando las células se cultivaron a escala en masa. Para esto, primero, la línea de células CHO recombinante que se había cultivado se inoculó a una densidad de $1,2 \times 10^7$ células/ml en 4 l de un medio de producción en cada uno de tanques de incubación que contenían butirato de sodio (No. de cat. B5887, SIGMA, EE UU) a concentraciones de 0,3, 1,0, 1,5 y 2,0 mM, respectivamente. Las células que crecieron en presencia de butirato de sodio 0,3 mM se usaron como control para comparación. Para producir hVII, las células se cultivaron a 30,0°C durante 11-18 días con el medio alimentado continuamente a 0,5-1,0 VVD. El cultivo se paró cuando la actividad celular se redujo a menos del 80%. Durante el cultivo, un volumen predeterminado del cultivo celular se tomó a intervalos regulares de tiempo y se examinó la densidad celular y actividad celular.

Además, después de que los cultivos celulares tomados durante el cultivo se centrifugaron, los niveles de hFVII en los sobrenadantes se midieron usando un método de inmunoensayo enzimático como en el ejemplo <2-2>. Las medidas se expresan como % de producción comparada con el control y se resumen en la tabla 3, a continuación.

5 Tabla 3

Nivel de producción de hFVII según la concentración de butirato de sodio (%)

Conc. de butirato Na (mM)	Nivel de FVII (% comprado al control)	Periodo de tiempo de producción (% comparado al control)
0,3	100,0	100,0
1	154,5	83,3
1,5	157,7	72,2
2,0	127,6	61,1

10 Cuando se añadieron concentraciones mayores de butirato de sodio, como se puede ver en la tabla 3, se produjeron cantidades mayores de FVII a pesar de los periodos de tiempo reducidos de la producción de FVII, lo que indica que el butirato de sodio contribuye a una mejora en la productividad de FVII.

Ejemplo 5: Purificación de factor VII de medio de cultivo

15 Se lavó una membrana de ultrafiltración (SARTOCON Slice Cassete, PESU, Sartorius, MWCO 30 K) durante una hora con 1 L de NaOH 1 M, lavada con 5 L de agua esterilizada. A continuación, después de que se equilibrara la membrana de ultrafiltración con un tampón de equilibrio de columna de purificación primaria, se cargó el cultivo de células que expresan factor VII en la membrana y se concentró 10 veces. El concentrado se diluyó dos veces con el mismo volumen del tampón de equilibrio de la columna de purificación primaria y después se concentró a su volumen original. Este procedimiento de dilución-concentración se repitió siete veces con el tampón de equilibrio de columna de purificación primaria para la diafiltración del cultivo celular. No hubo pérdida del factor VII durante la diafiltración. Se midió que el factor VII tenía una concentración final de 0,3 mg/ml. La ultrafiltración y diafiltración se llevaron a cabo en una condición de 4°C. La solución de factor VII diafiltrada se filtró por último a través de un filtro de 0,22 µm (NALGENE, PES) y se cargó en una columna para cromatografía de intercambio aniónico. En la presente divulgación, se usó una columna rellena de resina Sepharosa Q (Fast Flow, GE Healthcare) para cromatografía de intercambio aniónico. Después de cargar las muestras en la columna, la elución se realizó con tampón de equilibrio A (Tris 20 mM pH 8,0 + benzaminida 2 mM), tampón de lavado B (Tris 20 mM pH 8,0 + benzamidina 2 mM + NaCl 0,2 M), tampón de lavado C (Tris 20 mM pH 8,0 + benzamidina 2 mM + NaCl 0,1 M) y tampón de elución D (Tris 20 mM pH 8,0 + benzamidina 2 mM + NaCl 25 mM + CaCl₂ 35 mM) de tal manera que la pureza de la proteína eluida mejoró usando elución en gradiente con un gradiente lineal desde tampón de lavado C a tampón de elución D a lo largo de 2,5 volúmenes de columna. Inmediatamente después de la elución por cromatografía de intercambio aniónico, la fracción que contenía el factor VII se sometió a cromatografía de exclusión molecular para realizar un intercambio de tampón con Tris 20 mM pH 8,0 + benzaminida 2 mM. La filtración, la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de exclusión molecular se llevaron a cabo a 4°C. La muestra en la que intercambió el tampón por cromatografía de exclusión molecular se cargó en una columna para cromatografía de intercambio aniónico. La columna se llenó con resina Sepharosa Q (High Performance, GE Healthcare). Después de equilibrar la columna con tampón de equilibrio A (Tris 20 mM pH 8,0 + benzaminida 2 mM), la muestra cargada se eluyó usando elución en gradiente con un gradiente lineal del 20%-35% de tampón de elución B (Tris 20 mM pH 8,0 + benzamidina 2 mM + NaCl 1 M) a lo largo de 15 volúmenes de columna. El eluato de factor VII se formuló con fosfato de potasio 20 mM, pH 5,5, mediante cromatografía de exclusión molecular. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Como se ha explicado anteriormente, el factor VII se puede almacenar después de purificarse como una forma inactiva. Si es necesario, el factor VII se puede convertir a la forma activa factor VIIa como se ilustra en el ejemplo 6, a continuación.

45 Ejemplo 6: Activación del factor VII purificado

Para activar el factor VII, la muestra de factor VII purificado se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico previamente equilibrada con tampón A (Tris 20 mM pH 8,0 + benzaminida 2 mM). La columna se llenó con resina Source 15Q (GE Healthcare). Después de equilibrar con tampón A, la muestra se sometió a activación en la columna usando tapón de elución B (Tris 20 mM pH 8,0 + benzamidina 2 mM + NaCl 25 mM + CaCl₂ 35 mM) a una concentración de 5%, seguido por elución isocrática usando el tampón de elución B para eluir la proteína. La activación del factor VII se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Lista de secuencias

55 <110> Hanmi Holdings Co., Ltd.

<120> Método para la producción en masa de factor VII/VIIa

ES 2 597 966 T3

<130> OPA11139PCT

<150> KR10-2010-0104403

<151> 26-10-2010

5 <160> 3

<170> KopatentIn 1.71

10 <210> 1
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador directo para VIIBHISS

<400> 1
cccggatcca tggctctcca ggcctcagg ctcc 34

20 <210> 2
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso para VIIXhoIAS

<400> 2
30 **gggctcgagc tagggaaatg gggctcgag g** 31

<210> 3
<211> 8299
<212> ADN
35 <213> Homo sapiens

<400> 3
gacggatcgg gagatccgac atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta 60
gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa 120
ccattataag ctgcaataaa caagtaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg 180
ttcaggggga ggtgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtatgg 240
ctgattatga tctctagtca aggcaactata catcaaatat tccttattaa cccctttaca 300
aattaaag ctaaaggtag acaatttttg agcatagtta ttaatagcag aactctatg 360
cctgtgtgga gtaagaaaa acagtatggt atgattataa ctggtatgcc tacttataaa 420
ggttacagaa tatttttcca taattttctt gtatagcagt gcagcttttt cctttgtggt 480
gtaaatagca aagcaagcaa gagttctatt actaaacaca gcatgactca aaaaacttag 540

ES 2 597 966 T3

caattctgaa ggaaagtcct tggggctctc tacctttctc ttcttttttg gaggagtaga	600
atggtgagag tcagcagtag cctcatcadc actagatggc atttcttctg agcaaaacag	660
gttttcctca ttaaaggcat tccaccactg ctcccattca tcagttccat agggttgaat	720
ctaaaataca caaacaatta gaatcagtag tttaacacat tatacactta aaaattttat	780
atttacctta gagcttttaa tctctgtagg tagtttgccc aattatgtca caccacagaa	840
gtaaggttcc ttcacaaaga tccaaagcca gcaaaagtcc catggtctta taaaaatgca	900
tagcttttagg aggggagcag agaacttgaa agcatcttcc tgttagtctt tcttctcgta	960
gacttcaaac ttataactga tgccttttcc ctccctggacc tcagagagga cgcctgggta	1020
ttctgggaga agtttatatt tccccaaatc aatttctggg aaaaacgtgt cactttcaaa	1080
ttctgcatg atccttgcca caaagagtct gaggtggcct ggttgattca tggcttctcg	1140
gtaaacagaa ctgcctccga ctatccaaac catgtctact ttacttgcca attccggtg	1200
ttcaataagt cttaaggcat catccaaact tttggcaaga aaatgagctc ctctggtg	1260
ttctttgagt tctctactga gaactatatt aattctgtcc tttaaaggtc gattcttctc	1320
aggaatggag aaccaggttt tccctaccat aatcaccaga ttctgtttac cttccactga	1380
agaggttggt gtcattcttt ggaagtactt gaactcgttc ctgagcggag gccaggtag	1440
gtctccgttc ttgccaatcc ccatattttg ggacacggcg acgatgcagt tcaatggtcg	1500
aaccatgatg gcagcgggga taaaatccta ccagccttca cgctaggatt gccgtcaagt	1560
ttggcgcgaa atcgcagccc tgagctgtgg atctcccgat cccctatggt gcactctcag	1620
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtatctg ctccctgctt gtgtgttggg	1680
ggtcgtgag tagtgccgga gcaaaattta agctacaaca aggcaaggct tgaccgacaa	1740
ttgcatgaag aatctgctta gggtaggcg ttttgcgctg cttcgcgatg tacgggcccag	1800
atatacgcgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt	1860
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgctg	1920
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgatgttc ccatagtaac	1980
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt	2040
ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa	2100
atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gacottatgg gactttccta cttggcagta	2160
catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg	2220
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccocattg acgtcaatgg	2280
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtaaca actccgcccc	2340
attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg	2400
gctaactaga gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actatagggg	2460

ES 2 597 966 T3

gaccaagct tggtagcgag ctccgatcca tggctctcca ggccctcagg ctccctctgcc 2520
ttctgcttgg gcttcagggc tgcctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg 2580
gogtctctgca ccggcgccgg cgcgccaacg cgttccctgga ggagctgcgg ccgggctccc 2640
tggagagggga gtgcaaggag gagcagtgtt ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg 2700
acggggagag gacgaagctg ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa 2760
gtccatgcca gaatgggggc tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgettctgcc 2820
tccctgcctt cgagggccgg aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga 2880
acgagaacgg cggctgtgag cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc 2940
ggtgccacga ggggtactct ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat 3000
atccatgtgg aaaaatacct attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa 3060
ttgtgggggg caaggtgtgc cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttgggta 3120
atggagctca gttgtgtggg gggaccctga tcaacacccat ctgggtgggtc tccgcccggc 3180
actgtttcga caaaatcaag aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc 3240
tcagcgagca cgacggggat gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca 3300
cgtacgtccc gggcaccacc aaccacgaca tcgctgtgtc ccgctgcac cagcccgtgg 3360
tcctactga ccatgtggtg cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc 3420
tggccttcgt gcgcttctca ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca 3480
cggccctgga gctcatggtc ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc 3540
agtcacggaa ggtgggagac tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact 3600
cggatggcag caaggactcc tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc 3660
ggggcacgtg gtacctgacg ggcacgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggccc 3720
actttggggg gtacaccagg gtctcccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct 3780
cagagccacg cccaggagtc ctctgcgag cccatttcc ctagctcgag catgcatcta 3840
gagggcccta ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg 3900
ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctccccg tgcttctctt gaccctggaa 3960
ggtgccactc ccaactgtcct ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt 4020
aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa 4080
gacaatagca ggcacgtgtg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggg ggaagaacc 4140
agctggggct ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4200
gtggtgggta cgcgcagcgt gaccgtaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4260
gctttcttcc ctctcttctc cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg 4320

ES 2 597 966 T3

gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4380
 tagggatgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4440
 ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4500
 atctcggctct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4560
 aatgagctga ttttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgcagttag 4620
 ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 4680
 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 4740
 tgcattctca ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgccctaa 4800
 ctccgccag ttccgccat tctccgccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag 4860
 aggccgagc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 4920
 gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatc cattttcggga tctgatcaag 4980
 agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 5040
 ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 5100
 atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagc ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 5160
 tgcctgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 5220
 cgggcgttcc ttgcccagct gtgctcagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 5280
 tattgggcca agtgcggggg caggatctcc tgcattctca ccttctcct gccgagaaag 5340
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgt tgcattcggct acctgccat 5400
 tcgaccacca agcgaacat cgcattcagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 5460
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 5520
 ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct 5580
 tgccgaatat catgggtgaa aatggccgct tttctggatt catcactgt ggccggctgg 5640
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccg tgatattgct gaagagcttg 5700
 gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc 5760
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 5820
 gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 5880
 tgaaagggtt ggcttcgga tcgttttccg ggacgcggc tgatgatcc tccagcggg 5940
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacc caacttgttt attgcagctt ataatggta 6000
 caataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 6060
 ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgct tgtataaccg cgaccttag 6120
 ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gttcctgtg tgaaattggt atccgctcac 6180
 aattccacac aacatcagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaagagt 6240

ES 2 597 966 T3

gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 6300
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcgggttgc gtattgggcg 6360
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc 6420
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 6480
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 6540
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatacaaaa aatcgacgct caagtccagag 6600
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 6660
gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacctg tccgccttcc tcccttcggg 6720
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 6780
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 6840
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 6900
tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg 6960
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 7020
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 7080
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 7140
ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 7200
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt 7260
taaatacaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 7320
tgaggcaact atctcagcga tctgtctatt tcggtcatcc atagttgcct gactccccgt 7380
cgtgtagata actacgatac gggagggcctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 7440
gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 7500
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgccg 7560
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 7620
agggatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 7680
atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc 7740
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 7800
gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 7860
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 7920
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 7980
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac 8040
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 8100

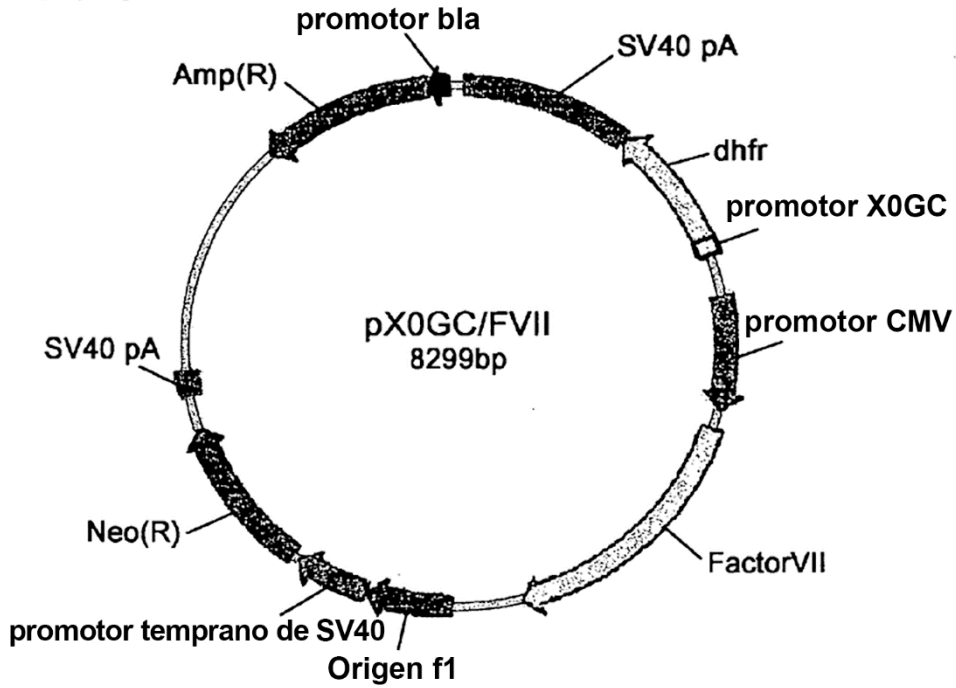
ES 2 597 966 T3

aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact	8160
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg	8220
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg	8280
aaaagtgcc cctgacgtc	8299

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción en masa de factor de coagulación VII humano, que comprende:
- 5 a) construir un vector de expresión que tiene i) un promotor de dihidrofolato reductasa que carece de una o más secuencias de repetición CCGCC de la región rica en GC del mismo y un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) operativamente unido al mismo y ii) un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen del factor de coagulación VII humano operativamente unido al mismo;
- 10 b) transfectar el vector de expresión del paso a) en una línea de células animales;
- c) cultivar la línea de células animales transfectada del paso b) en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa para seleccionar células que expresan el factor de coagulación VII humano con alta eficacia; y
- 15 d) añadir butirato de sodio a las células animales seleccionadas del paso c), en donde la línea de células animales seleccionada carece de gen de dihidrofolato reductasa y es HMF708 (No. de registro KCTC 11779BP),
- en donde el butirato de sodio del paso d) varía en concentración desde 0,1 a 3,0 mM.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el butirato de sodio varía en concentración desde 0,3 a 1,5 mM.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además purificar el factor de coagulación VII humano.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además activar el factor de coagulación VII humano.
- 25 5. Una línea celular HMF708 para producir factor de coagulación VII humano, que tiene el número de registro KCTC 11779BP.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

