

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 505**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2014 PCT/JP2014/084516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15099124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2014 E 14873182 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3088513**

54 Título: **Línea altamente productora de fibrinógeno recombinante y método para su producción**

30 Prioridad:

27.12.2013 JP 2013273145

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

10.07.2019

73 Titular/es:

**JAPAN BLOOD PRODUCTS ORGANIZATION
(100.0%)
4-1 Hamamatsucho 2-chome Minato-ku
Tokyo 105-6107, JP**

72 Inventor/es:

**UNO, SHUSEI;
OTAKI, MOMOKO;
MURAKAMI, KOUJI y
IDENO, SHOJI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 505 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

Línea altamente productora de fibrinógeno recombinante y método para su producción

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno y a un método para su producción, así como a un método de producción de un fibrinógeno recombinante utilizando dicha cepa productora (línea celular). Más particularmente, la presente invención se refiere a una cepa recombinante (línea celular) que produce un fibrinógeno de alta producción que es una cepa de células animales (línea celular) que expresa conjuntamente un fibrinógeno y un inhibidor de plasmina $\alpha 2$ (en lo sucesivo denominada en este documento también $\alpha 2$ PI) y/o un inhibidor activador del plasminógeno 2 (en lo sucesivo denominado en este documento también PAI-2) como se define en la reivindicación 1, genes que codifican la cadena A α , la cadena B β y la cadena γ del fibrinógeno, un método de producción de una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno, que incluye introducir genes que codifican $\alpha 2$ PI y/o PAI-2 en una célula animal, y expresar conjuntamente el fibrinógeno y $\alpha 2$ PI y/o PAI-2 en la célula animal, y un método de producción de un fibrinógeno recombinante que comprende cultivar una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno en un medio y recuperar el fibrinógeno del cultivo obtenido.

Antecedentes de la invención

20 El fibrinógeno es una de las glicoproteínas plasmáticas producidas principalmente por los hepatocitos (parenquimatosos), y es una glucoproteína macromolecular que tiene dos de cada tres tipos diferentes de cadenas polipeptídicas denominadas cadena A α , cadena B β y cadena γ (6 cadenas en total). El peso molecular de cada cadena polipeptídica es aproximadamente 67.000 para la cadena A α , aproximadamente 56.000 para la cadena B β , y aproximadamente 47.500 para la cadena γ , y una molécula de fibrinógeno completa compuesta de estas cadenas asociadas a través de un enlace disulfuro tiene un peso molecular de aproximadamente 340.000 (documento de patente 1).

25 El fibrinógeno es una proteína importante presente en el plasma normal a 2-3 g/L, que exhibe ciertas funciones en la defensa y hemostasia en los organismos vivos induciendo, cuando los tejidos son dañados, la adhesión de las plaquetas a las heridas y la subsecuente gelificación hematológica. Por lo tanto, cuando el nivel de fibrinógenos en la sangre disminuye debido a un importante sangrado, a infecciones graves, etc., no puede evitarse que el mecanismo de hemostasia colapse y que el sangrado genere una tendencia a la hemorragia, lo cual es potencialmente mortal.

30 La preparación del fibrinógeno es eficaz para prevenir el sangrado grave aumentando la concentración de fibrinógeno en sangre por vía intravenosa, etc., y se aplica extensamente a una terapia de reemplazo de deficiencia congénita y adquirida del fibrinógeno, etc. También, el fibrinógeno es ampliamente utilizado como un componente principal de la adhesión de la fibrina que se utilizará para la adhesión y el cierre del tejido durante cirugía.

35 En la actualidad, cuando se utiliza el fibrinógeno como producto farmacéutico, éste se prepara principalmente a partir del plasma humano recogido y extraído de un gran número de donantes de sangre no específicos (varios miles o más), y se somete a diversos métodos desactivantes y eliminadores de agentes patógenos, tal como el tratamiento de fosfato de tri-n-butilo (TNBP)/polisorbato 80, un tratamiento de filtración con una membrana de eliminación de virus, un tratamiento térmico, etc. en un intento de eliminar el riesgo de contaminación con agentes infecciosos, tal como el virus de la hepatitis (p. ej., VHC, etc.), virus de la inmunodeficiencia (p. ej., VIH, etc.), priones anormales, etc. Sin embargo, no importa cuántas medidas de seguridad se tomen, el riesgo de transmisión de la enfermedad debido al uso de la sangre como material de partida no se puede eliminar por completo. Por lo tanto, cuando se utiliza una preparación de fibrinógeno derivada de plasma humano recogido, es necesario considerar el efecto proporcionado y el riesgo de transmisión de la enfermedad, etc., estudiar suficientemente la necesidad del mismo, utilizarlo sólo en la cantidad mínima necesaria, y observar suficientemente el progreso después de la administración.

45 Además, puesto que el plasma recogido humano es suministrado principalmente por la donación de sangre, también se cuestiona el abastecimiento estable de fibrinógeno en el futuro.

50 Para resolver estos problemas, se ha intentado la producción de fibrinógeno mediante la utilización de una técnica de recombinación génica. Sin embargo, el fibrinógeno no se ha colocado en el mercado como un producto farmacéutico recombinante, aunque proteínas plasmáticas como el factor VIII, el factor IX, la albúmina, etc. ya se han puesto en el mercado como productos farmacéuticos recombinantes.

55 Una de las causas que impiden el desarrollo es el hecho de que el fibrinógeno es una enorme molécula proteica en asociación con 6 cadenas polipeptídicas y una molécula de fibrinógeno funcional es difícil de producir, incluso cuando las 3 proteínas de fibrinógeno cadena A α , cadena B β y cadena γ se expresan simultáneamente en *Escherichia coli*, y porque una molécula funcional de fibrinógeno se puede producir en levadura y células animales, pero la producción en una cantidad suficiente no es posible; lo cual, a su vez, hace inviable el aspecto de los costes de producción (documento no de patente 1, documentos de patente 1 y 2).

Otra causa es el hecho de que, cuando el fibrinógeno se expresa y se cultiva en las células animales, la degradación

del fibrinógeno progresa marcadamente en la etapa más tardía del cultivo. En general, las células cultivadas crecen en el orden de la fase de retardo, fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria y fase de muerte, y el número de células cultivadas y la cantidad de producción de proteína recombinante se correlacionan. Por lo tanto, cuando se produce una proteína recombinante, se considera que una extensión del período de la fase estacionaria cuando el número de células cultivadas alcanza el pico, es decir, en la etapa más tardía del cultivo, conduce a un aumento en la cantidad de producción de la proteína recombinante. La degradación notable del fibrinógeno en la etapa más tardía del cultivo es un problema fatal para la producción en masa de fibrinógeno, y hace aún más difícil la producción de fibrinógeno recombinante de alta calidad en un alto rendimiento. En particular, el documento 3 se refiere a la protección de las proteínas (p. ej. fibrinógeno) expresado en leche de mamíferos no humanos transgénicos por expresión conjunta de un inhibidor de la serina proteinasa (p. ej. alfa 1-antitripsina AAT) en la leche de los mamíferos transgénicos no humanos.

La plasmina es una serina proteasa que hidroliza el fibrinógeno y la fibrina producida a partir del fibrinógeno (disolución de la fibrina: fibrinólisis). En el sistema fibrinolítico, el plasminógeno es degradado restrictivamente por un activador del plasminógeno para ser una plasmina que tiene una actividad enzimática, que demuestra una función para disolver principalmente el trombo de la fibrina.

Un inhibidor de plasmina $\alpha 2$ ($\alpha 2$ PI) es un factor inhibitorio principal de la plasmina que se encarga del sistema fibrinolítico, y es una proteína que se une específicamente a la plasmina en una proporción de 1:1 para formar un complejo de plasmina- $\alpha 2$ PI (PIC), que desactiva rápidamente la actividad de plasmina.

Los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI)-1 y PAI-2 son inhibidores pertenecientes a la superfamilia del inhibidor de la serina proteasa (SERPIN) y que están presentes in vivo. Es una proteína que suprime la generación de plasmina del plasminógeno inhibiendo el activador del plasminógeno. Se ha demostrado que el PAI-1 está presente en el plasma normal a una concentración de aproximadamente 20 ng/mL, mientras que el PAI-2 es generalmente indetectable en el plasma de mujeres no embarazadas (documento 2 no de patente).

Sin embargo, la relación entre $\alpha 2$ PI y/o PAI-2 y el efecto potenciador de la producción del fibrinógeno en células productoras de fibrinógeno recombinantes no ha sido demostrado hasta el momento y sus efectos son desconocidos.

[Lista de documentos]

[Documentos de patente]

documento de patente 1: patente estadounidense no. 6037457

documento de patente 2: JP-A-2004-16055

documento de patente 3: WO 00/30436

[documentos distintos de patentes]

documento distinto de patente 1: Binnie et al., Biochemistry 32, 107 (1993)

documento distinto de patente 2: Wright JG et al., Br J Haematol 69, 253 (1988)

Compendio de la invención

Problemas que resuelve la invención

Dado que el fibrinógeno utilizado actualmente como producto farmacéutico se prepara principalmente a partir del plasma extraído en humanos, no se puede asegurar una seguridad suficiente y también se cuestiona la capacidad de que pueda existir un suministro estable. Para resolver estos problemas, se ha intentado la producción de fibrinógeno mediante una técnica de recombinación génica, pero no se han generado cantidades productivas suficientes, y su puesta en práctica no se ha realizado debido a los costes de producción que acarrea.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno y un método de producción de ésta como se define en las reivindicaciones, que pueda suministrar fibrinógeno estable sin riesgo de contaminación por agentes infecciosos en una cantidad de producción suficiente, así como un método de producción de un fibrinógeno recombinante mediante el uso de la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención, como se define en las reivindicaciones.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos teniendo presente el objeto anteriormente mencionado y han encontrado que no sólo la degradación del fibrinógeno puede ser fuertemente suprimida incluso en las etapas posteriores del cultivo, cuando la degradación del fibrinógeno procede generalmente en células

animales, mediante la expresión conjunta de fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2, sino que también la cantidad de producción del fibrinógeno puede aumentar independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno, y su efecto sinérgico puede aumentar sorprendentemente la cantidad de producción de fibrinógeno recombinante, que se produce con el logro de la presente invención.

5 Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente como se define en las reivindicaciones.

[1] una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que es una línea celular animal que expresa conjuntamente el fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 obtenidos introduciendo genes que codifican cadena $A\alpha$, cadena $B\beta$ y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en las células animales.

10 [2] la línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno del antedicho [1], en donde el fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 son fibrinógenos humanos y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2.

[3] la línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno del antedicho [1] o [2], en donde la línea celular animal es la célula CHO.

15 [4] un método de producción de una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que comprende introducir genes que codifican la cadena $A\alpha$, cadena $B\beta$ y γ la cadena de fibrinógeno, y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en una célula animal, y que expresa conjuntamente el fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en la célula animal.

[5] el método del antedicho [4], que comprende expresar el fibrinógeno en la célula animal usando un solo vector de expresión que comprende todos los genes que codifican la cadena $A\alpha$, cadena $B\beta$ y cadena γ del fibrinógeno.

20 [6] el método de los antes mencionados [4] o [5], que comprende expresar $\alpha 2PI$ y PAI-2 en la célula animal mediante el uso de un vector de expresión único que comprende un gen que codifica $\alpha 2PI$ y un gen que codifica PAI-2.

[7] el método de cualquiera de los antes mencionados [4]-[6], en donde los genes que codifican la cadena $A\alpha$, cadena $B\beta$ y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 son cada uno un gen humano.

[8] el método de cualquiera de los antes mencionados [4]-[7], donde la célula animal es una célula CHO.

25 [9] un método de producción de un fibrinógeno recombinante, que comprende cultivar la línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno de cualquiera de los mencionados [1]-[3] o una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que se obtiene por el método de cualquier de los mencionados [4]-[8], en un medio, y recuperar el fibrinógeno del cultivo obtenido.

[Efecto de la invención]

30 La cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención que suprime fuertemente la degradación del fibrinógeno incluso en la etapa más tardía del cultivo, cuando la degradación del fibrinógeno generalmente procede, no sólo puede aumentar la relación residual de la cadena $A\alpha$ en no menos de aproximadamente 2,5 veces en comparación, por ejemplo, con la expresión del fibrinógeno solo, sino que también puede aumentar la cantidad de producción de fibrinógeno, independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno. Como resultado del efecto sinérgico de estos, la cantidad de producción de fibrinógeno no es inferior a 4 veces la de una cepa celular (línea celular) que expresa el fibrinógeno solo. Por lo tanto, utilizando la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención, un fibrinógeno recombinante puede ser producido en una gran cantidad, un fibrinógeno recombinante puede ser formulado a un nivel práctico, y el suministro estable de fibrinógeno al mercado puede ser asegurado.

35 Además, dado que el fibrinógeno obtenido por la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención es producido por una técnica de recombinación génica, el riesgo de contaminación con agentes infecciosos, que es un problema específico de las preparaciones derivadas de sangre, se puede eliminar por completo, y se puede asegurar una seguridad suficiente. Consecuentemente, se puede utilizar el fibrinógeno en una cantidad suficiente para un tratamiento con precaución y de forma segura para un largo plazo.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra el vector de expresión de fibrinógeno pNT60.

La Fig. 2 muestra la mutagénesis específica del sitio de la unidad de expresión de pcDNA 3.3-TOPO/lacZ.

La Fig. 3 muestra un método de construcción de pcDNA 3.3-Modificado.

La Fig. 4 muestra un método de construcción de $\alpha 2PI$ /PAI-2/pcDNA 3.3-Modificado.

50 La Fig. 5 muestra un método de construcción de m-pEE.

La Fig. 6 muestra un método de construcción de $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$.

La Fig. 7 muestra una transferencia Western que confirma la expresión de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 después del cultivo de la línea celular que expresa fibrinógeno T233, y que expresa conjuntamente líneas celulares $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 durante 10 días.

5 La Fig. 8 muestra el modo de expresión del ARNm por transgén en las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 15, N°. 8 y N°. 68. Se utilizaron 67 células para una reacción. El nivel de expresión del ARNm del fibrinógeno fue calculado como la cantidad por pNT60 usando, como control, una muestra, en donde el vector pNT60 de expresión del fibrinógeno fue diluido en 4 etapas desde 100 pg/mL a 0,1 pg/mL por una dilución de 10 veces. Del mismo modo, el nivel de expresión de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 se calculó como la cantidad por el vector de expresión $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{pcDNA3.3-Modificado}$ ($\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 15) o $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$ ($\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 8 y N°. 68). Para permitir valores entre las respectivas células, el valor de cada célula se calculó basándose en el nivel de expresión de GAPDH en la célula T233 como 1 y se normalizó multiplicando el valor de cada muestra por el número inverso del mismo.

15 La Fig. 9 muestra la supresión de la degradación del fibrinógeno en las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15. La línea celular que expresa fibrinógeno T233, y que expresa conjuntamente las líneas celulares $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 fueron cultivadas durante 2 días, 8 días y 14 días, los sobrenadantes del cultivo fueron sometidos a SDS-PAGE bajo condiciones de reducción, y el gel después de la electroforesis fue teñido con una solución de coloración de Instant Blue (fabricado por Funakoshi Co., Ltd., ISB1L) durante 15 min, y la Fig. 9A muestra las imágenes teñidas. El gel teñido fue escaneado por un densitómetro (fabricado por Bio-Rad, densitómetro calibrado GS-800), y la variación en la cadena A α del fibrinógeno se muestra por valores numéricos en la Fig. 9B. pFbg muestra el fibrinógeno (fabricado por CALBIOCHEM, 341576) derivado del plasma. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo cuando la relación de la cadena A α frente a la cadena γ de pFbg es 100% se muestra como la relación residual de la cadena A α .

25 La Fig. 10 muestra la supresión de la degradación del fibrinógeno en las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 8 y N°. 68. La línea celular que expresa fibrinógeno T233 y que expresa conjuntamente las líneas celulares $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 8 y N°. 68 fueron suspendidas cada una en el medio del lote de alimentación a 1×10^6 células/mL, fueron sembrados 20 mL en un matraz de 125 mL, y el cultivo del matraz con agitación fue realizado durante 12 días (37°C, 5% CO₂, 120-140 rpm). Se analizaron los sobrenadantes del cultivo los días 4, días 8, días 10 y días 12. El sobrenadante del cultivo (5 μL) se sometió a SDS-PAGE en condiciones de reducción, y el gel después de la electroforesis se teñió con una solución de tinción Instant Blue (fabricada por Funakoshi Co., Ltd., ISBIL) durante 15 min, y la Fig. 10A muestra las imágenes teñidas. El gel teñido fue escaneado por un densitómetro (fabricado por Bio-Rad, densitómetro calibrado GS-800), y la variación en la cadena A α del fibrinógeno se muestra por valores numéricos en la Fig. 10B. Utilizando el software adjunto "Quantity One", se midió el volumen de la banda (concentración de banda x área). pFbg muestra el fibrinógeno (fabricado por CALBIOCHEM, 341576) derivado del plasma. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo, cuando la relación cadena A α frente a cadena γ de pFbg es 100%, se muestra como la relación residual de la cadena A α .

40 La Fig. 11 muestra una actividad de proteasa del tipo plasmina en el sobrenadante de cultivo después del cultivo la línea celular que expresa el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 durante 14 días. La absorbancia de las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 se muestra como un valor relativo cuando la absorbancia de la línea celular que expresa el fibrinógeno T233 es 1.

La Fig. 12 muestra los cambios en el transcurso de tiempo de la cantidad de producción de fibrinógeno cuando la línea celular que expresa el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 fueron cultivadas bajo condiciones de supresión para la degradación del fibrinógeno durante 0-10 días.

45 La Fig. 13 muestra los cambios en el transcurso de tiempo del número de células viables, la tasa de supervivencia celular y la cantidad de producción de fibrinógeno cuando la línea celular que expresa el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 8 y N°. 68 fueron cultivadas bajo condiciones de supresión para la degradación del fibrinógeno durante 0-10 días.

50 La Fig. 14 muestra la variación en la cadena A α del fibrinógeno en valores numéricos cuando la línea celular que expresa conjuntamente T233 era cultivada durante 10 días, se añadieron $\alpha 2\text{PI}$, PAI-1 y PAI-2 al sobrenadante de cultivo y se mantuvieron a 37°C durante 3 días, mostrándose un efecto supresor respecto a la degradación del fibrinógeno mediante la adición de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo, cuando la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en la cepa celular que expresa fibrinógeno T233 en el día 10 del cultivo es 100%, se muestra como la relación residual de la cadena A α .

55 Descripción de las realizaciones

En una realización, la presente invención proporciona una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno, que es una cepa de células animales (línea celular) que expresa conjuntamente el fibrinógeno y $\alpha 2\text{PI}$ y/o PAI-2, tal como se define en la reivindicación 1.

En la presente memoria descriptiva, una "cepa" o "línea" significa una célula utilizada indistintamente con una "cepa celular" o "línea celular", y cultivada o mantenida in vitro.

5 En la presente memoria descriptiva, una "expresión conjunta de la cepa de células animales (línea celular)" abarca no sólo un estado en el que un gen que codifica la proteína diana se introduce en una célula animal y se expresa en ella, sino también un estado en el que dicho gen está integrado con el genoma de la célula animal y que expresa constitutivamente la proteína diana.

10 En la presente memoria descriptiva, un "gen" puede ser de ADN o ARN, incluyendo el ADN al menos ADN genómico, ADNc, e incluyendo el ARN ARNm, ARN sintético, etc. En la presente memoria descriptiva, un "gen" puede ser un fragmento de ácido nucleico con una secuencia base libre de un codón de iniciación y un codón de parada, o que opcionalmente contiene una secuencia de señal, una secuencia de región no traducida (UTR), etc. En una realización preferible, el "gen" es ADNc.

15 En la presente memoria descriptiva, una "cepa de células animales (línea celular) que expresa conjuntamente fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2" significa una cepa de células animales (línea celular) obtenida introduciendo genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 en una célula animal.

Por lo tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un método de producción de una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno, que comprende introducir genes que codifican la cadena A α , cadena B β y la cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 en una célula animal, y la expresión conjunta de fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2 en la célula animal.

20 Como genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno, que deben utilizarse en la presente invención, se pueden utilizar de manera similar no sólo los genes que codifican una cadena de fibrinógeno natural de longitud completa, sino también, por ejemplo, los genes que codifican cualquier forma de una cadena de fibrinógeno, como el polimorfismo genético natural, la diferencia en la glicosilación y fosforilación, el empalme alternativo, etc.,
 25 variantes (p. ej., cadena α E, cadena γ' , etc.) debido a una variante artificialmente inducida por un método conocido per se, etc., siempre y cuando el producto de expresión final pueda constituir un fibrinógeno funcional. Además, la especie animal del gen de fibrinógeno no está particularmente limitada, y puede ser utilizado un gen del fibrinógeno de cualquier especie animal, que es preferiblemente un gen de codificación de mamífero, más preferiblemente de fibrinógeno humano.

30 En la presente memoria descriptiva, un "fibrinógeno funcional" significa un fibrinógeno con una actividad cualitativamente igual a la actividad fisiológica (por ejemplo, la capacidad de coagulación de la sangre, etc.) de un fibrinógeno natural, y los factores cuantitativos como el nivel de actividad, peso molecular, etc. pueden ser diferentes.

35 Como el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 que se utilizarán en la presente invención, no sólo los genes que codifican el α 2PI y/o PAI-2 natural de longitud completa, sino también, por ejemplo, los genes que codifican cualquier forma de α 2PI y/o PAI-2 tales como la variante natural, la variante artificial inducida, etc., se pueden utilizar semejantemente, siempre que su producto de expresión tenga una actividad substancialmente cualitativa igual a la del α 2PI y/o PAI-2 natural. Además, las especies animales de los genes α 2PI y/o PAI-2 no son particularmente limitadas, y se pueden utilizar los genes de α 2PI y/o PAI-2 de cualquier especie animal, que es preferiblemente un gen que codifica en mamífero, más preferiblemente α 2PI y/o PAI-2 humanos.

40 En la presente memoria descriptiva, tener "una actividad sustancialmente cualitativamente igual a la α 2PI y/o PAI-2 natural" significa que la actividad sea cualitativamente la misma que la actividad fisiológica α 2PI y/o PAI-2 natural (p. ej., actividad inhibitoria de la plasmina de α 2PI, actividad inhibitoria del activador del plasminógeno de PAI-2, etc.), donde los factores cuantitativos tales como el nivel de actividad, el peso molecular, etc., pueden ser diferentes.

45 En una realización preferible, los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 son cada uno un gen humano.

50 Los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 se pueden obtener mediante algún método conocido per se. Por ejemplo, pueden obtenerse preparando cebadores para PCR utilizando las bases de datos genéticas existentes como el GENBANK, etc., y realizando la PCR usando un ADNc de longitud completa derivado de una célula o tejido adecuado que exprese la proteína diana como plantilla. Para facilitar la subclonación a un vector, los cebadores de la PCR pueden tener una secuencia de un sitio apropiado de división con enzimas de restricción en ambos extremos, u opcionalmente tener una secuencia KOZAK en el extremo 5' para mejorar la eficiencia de la expresión. Un ADNc de longitud completa derivado de una célula o tejido adecuado puede obtenerse mediante un método conocido por sí, por ejemplo, purificando el ARNm del ARN total y convirtiéndolo en ADNc, o se puede utilizar una biblioteca de ADNc disponible comercialmente.

55 Alternativamente, los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 se pueden comprar como un clon de ADNc que codifica sólo la secuencia genética deseada. Por ejemplo, cada ADNc de α 2PI y PAI-2 están disponibles comercialmente en Promega KK (fabricado por

Promega, ORS09380 (α 2PI) y ORS08641 (PAI-2)).

En la presente invención, los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 se introducen en una célula animal mediante el uso de un vector de expresión. Un vector de expresión que utiliza la célula animal como un huésped no está particularmente limitado, y un vector de expresión conocido por sí mismo como vector plásmido, virus de vector, etc. se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el objeto.

Un promotor que va a estar contenido en un vector de expresión del fibrinógeno no está particularmente limitado siempre que funcione eficientemente en la célula animal del huésped que se va a utilizar, y que finalmente va a proporcionar el fibrinógeno funcional. Por ejemplo, se pueden mencionar el promotor SV40, el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor del VRS, el promotor de actina β , etc. También es posible combinar un promotor con un potenciador adecuado.

Un gen selectivo del marcador contenido opcionalmente en un vector de expresión del fibrinógeno no está particularmente limitado, y un gen selectivo del marcador conocido per se, tal como el gen de la resistencia a la neomicina, el gen de la resistencia a la puromicina, el gen de la resistencia a la higromicina, el gen de la reductasa (DHFR), el gen de la glutamina sintasa (GS), etc. se pueden seleccionar apropiadamente según el objeto.

Otro elemento constituyente vectorial (p. ej., el terminador, etc.) contenido opcionalmente en un vector de expresión de fibrinógeno no está particularmente limitado, y cualquiera en sí mismo conocido puede ser utilizado según corresponda.

En una realización, el vector de expresión de fibrinógeno de la presente invención es un vector de expresión único que comprende todos los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno. En otra realización, el vector de expresión de fibrinógeno de la presente invención está compuesto por un vector de expresión que tiene dos genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ del fibrinógeno (p. ej., la cadena A α y la cadena γ , la cadena B β y la cadena γ , etc.) y un vector de expresión que tiene el restante. En otra realización, el vector de la expresión del fibrinógeno de la presente invención se compone de 3 vectores de expresión, cada uno conteniendo los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ del fibrinógeno. La relación de constitución de los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y la cadena γ del fibrinógeno no está particularmente limitada, y, por ejemplo, 1:1:1-6, etc., se puede seleccionar apropiadamente según el objeto. Cuando el fibrinógeno se expresa utilizando dos o más vectores de expresión, los vectores de expresión respectivos pueden introducirse simultáneamente en una célula animal, o introducirse secuencialmente en diferentes momentos utilizando, por ejemplo, un marcador selectivo diferente, donde el orden de introducción no está particularmente limitado. En una realización preferible, el vector de expresión del fibrinógeno de la presente invención es un vector de expresión único que contiene todos los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y la cadena γ del fibrinógeno en un relación de constitución de 1:1:1.

Un ejemplo preferible del vector de expresión único que contiene todos los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno es uno que tiene 3 casetes de expresión en el que cada gen que codifica la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno está bajo la regulación de diferentes promotores. Los promotores que regulan la expresión de cada gen pueden ser iguales o diferentes, y el mismo promotor (por ejemplo, el promotor de CMV) se utiliza preferentemente. Ejemplos de estos incluyen, entre otros, pNT60 (vector de expresión que ha modificado el gen del promotor CMV/GS) (véase la Fig. 1), donde el ADNc de la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno se inserta en un vector obtenido por ligación de las tres unidades de expresión del vector de expresión pEE14.1 fabricado por Lonza, por un método conocido per se.

Alternativamente, dos o más genes que codifican la cadena A α , cadena B β y la cadena γ de fibrinógeno pueden estar bajo la regulación de un solo promotor. En este caso, se inserta una secuencia que habilita la expresión policistrónica (por ejemplo, la secuencia de IRES, la secuencia 2A derivada del virus de la fiebre aftosa, etc.) entre cada gen bajo el control de un solo promotor.

Un promotor contenido en el vector de expresión α 2PI y/o PAI-2 no está particularmente limitado, siempre que funcione eficientemente en la célula animal huésped que se utilizará y, por ejemplo, se pueden mencionar el promotor SV40, el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor de RSV, promotor de actina β , etc. Además, un promotor puede combinarse con un potenciador adecuado.

El vector de expresión α 2Pi y/o PAI-2 opcionalmente contenido en un gen selectivo marcador no está particularmente limitado, y un gen marcador selectivo conocido per se, tal como el gen de la resistencia a la neomicina, el gen de la resistencia a la puromicina, el gen de la resistencia a la higromicina, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la glutamina sintasa (GS), etc. se pueden seleccionar apropiadamente según el objeto.

Otro elemento que constituye el vector (p. ej., el terminador, etc.) que se encuentra opcionalmente en el vector de expresión α 2PI y/o PAI-2 no está particularmente limitado, y cualquiera en sí mismo conocido puede ser utilizado según corresponda.

Cuando α 2PI y PAI-2 son expresados conjuntamente, el vector de expresión α 2PI y PAI-2 de la presente invención

puede ser un vector de expresión único que contenga un gen que codifique α 2PI y un gen que codifique PAI-2, o una combinación de un vector de expresión que contenga un gen que codifique α 2PI y un vector de expresión que contenga un gen que codifique PAI-2. Cuando α 2PI y PAI-2 se expresan mediante el uso de dos vectores de expresión, pueden introducirse simultáneamente vectores de expresión respectivos en una célula animal, o introducirse secuencialmente en diferentes momentos utilizando, por ejemplo, un marcador selectivo diferente, donde el orden de introducción no esté particularmente limitado. Cuando ambos α 2PI y PAI-2 se expresan, se utiliza preferiblemente un vector de expresión solo que contiene un gen que codifica α 2PI y un gen que codifica PAI-2.

Un ejemplo preferible de un vector de expresión único que contiene un gen que codifica α 2PI y un gen que codifica PAI-2 es uno que tiene 2 casetes de expresión en los cuales cada gen que codifica α 2PI y PAI-2 está bajo la regulación de diferentes promotores. Los promotores que regulan la expresión de cada gen pueden ser iguales o diferentes, y el mismo promotor (por ejemplo, el promotor CMV) se utiliza preferentemente. Ejemplos de estos incluyen, entre otros, α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado (vector de expresión que contiene el promotor CMV/gen de la resistencia a la neomicina) (Fig. 4), que se obtiene por ligación de las dos unidades de expresión del vector de expresión pcADN3.3-TOPO/lacZ fabricado por Invitrogen (K8300-01 fabricado por Invitrogen), e insertando ADNc de α 2PI y PAI-2 por un método conocido per se, y α 2PI/PAI-2/m-pEE (vector de expresión que contiene el promotor CMV/gen de la resistencia a la puromicina) (Fig. 6), que se obtiene por ligación de las dos unidades de expresión del vector de expresión pEE fabricado por Lonza (p. ej., pEE16.4, pEE21.4, etc.) e insertando el ADNc de α 2PI y PAI-2 por un método conocido per se.

Alternativamente, un gen que codifica α 2PI y un gen que codifica PAI-2 pueden estar bajo la regulación de un solo promotor. En este caso, se inserta una secuencia que habilita la expresión policistrónica (por ejemplo, la secuencia de IRES, la secuencia 2A derivada del virus de la fiebre aftosa, etc.) entre cada gen bajo control de un solo promotor.

El tiempo y el orden de introducción de un vector de expresión de los genes que codifican la cadena A α , cadena B β y cadena γ de fibrinógeno, y un vector de expresión del gen o los genes que codifican α 2PI y/o PAI-2 no están particularmente limitados, y pueden introducirse simultáneamente en una célula animal, o introducirse secuencialmente en diferentes momentos utilizando, por ejemplo, un marcador selectivo diferente, siempre y cuando el fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2 se puedan expresar conjuntamente en la misma célula.

Una célula animal huésped utilizada para la introducción de un vector de expresión de fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2 no está particularmente limitada, y cualesquiera células animales, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma de ratón, células BHK, células HEK293, células HeLa, células COS, etc. pueden ser utilizadas y se pueden seleccionar apropiadamente según el objeto. En una realización preferible, la célula animal en la presente invención es una célula CHO. En otra realización preferible, la célula animal de la presente invención es una célula cultivada flotante. En todavía otra realización preferible, la célula animal de la presente invención se aclimata a un medio sin suero.

Como método de transformación de una célula animal huésped, se puede utilizar un método conocido per se. Ejemplos de estos incluyen, entre otros, el método del fosfato de calcio, método del dextrano de DEAE, un método que usa un liposoma tal como la lipofectina, lipofectamina, etc., un método con protoplastos-PEG, un método de electroporación, etc.

Cuando se introduce un vector de expresión que contiene un gen marcador selectivo en una célula animal, se puede seleccionar una célula transformada mediante un método de selección conocido per se. Por ejemplo, una célula transformada se puede seleccionar fácilmente agregando una sustancia de adición para la selección (p.ej., G-418, cuando el gen marcador selectivo es el gen de la resistencia a la neomicina, metotrexato cuando es un gen DHFR, puromicina cuando es un gen de la resistencia a la puromicina, etc.) a un medio sin suero, como el medio de CD-CHO (fabricado por GIBCO), etc., un medio con suero como el medio D-MEM/F-12 de Ham (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) añadido con un 10% de suero bovino fetal (FCS), etc., y cultivando el mismo.

Después de la selección de una célula transformada, la detección o medición del nivel de expresión de la proteína diana puede realizarse utilizando, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), un método con anticuerpos enzimáticos (ELISA), método de transferencia Western (WB), etc. Cuando la proteína diana tiene alguna actividad, la actividad también se puede medir directamente.

En una realización, la presente invención proporciona un método de producción de un fibrinógeno recombinante, que comprende cultivar una cepa recombinante (línea celular) que produce un fibrinógeno altamente productivo de la presente invención en un medio y recuperar el fibrinógeno del cultivo obtenido.

La cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención no sólo suprime fuertemente la degradación del fibrinógeno incluso en la etapa más tardía del cultivo, cuando la densidad celular es alta y la degradación del fibrinógeno generalmente procede destacadamente, sino que también puede aumentar la cantidad de producción de fibrinógeno, independiente del efecto supresor sobre la degradación del fibrinógeno. Como resultado del efecto sinérgico del mismo, se puede producir fibrinógeno recombinante en una gran cantidad. Por lo tanto, se pueden utilizar sin limitación para la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de

fibrinógeno de la presente invención un método de cultivo conocido por sí, tal como un método de cultivo general (por ejemplo, un método de cultivo en lotes, etc.), así como un método de cultivo de células de alta densidad, por ejemplo, el método de cultivo de lotes de alimentación, el método de cultivo de perfusión, etc. Además, otras condiciones de cultivo, por ejemplo, el pH del medio, la temperatura de cultivo, etc. no están particularmente limitadas, y las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de las células animales y la producción de fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2 se pueden adoptar apropiadamente. Además, el medio no está particularmente limitado, y puede ser un suero que contenga medio o medio sin suero. En una realización preferible, se utiliza un medio sin suero ya que, cuando se utiliza un medio sin suero para el cultivo, se genera una producción estable de proteína con reproducibilidad independientemente de la diferencia del lote de suero, el producto se puede purificar fácilmente ya que el componente proteico derivado del suero no está contenido, etc.

El método de cultivo de una cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención en un medio y la recuperación de fibrinógeno del cultivo obtenido no están particularmente limitados, siempre y cuando el fibrinógeno se pueda recuperar del cultivo y, por ejemplo, se puedan mencionar los métodos conocidos como el fraccionamiento con etanol, fraccionamiento con glicina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio, etc.

La cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención puede suministrar de manera estable un fibrinógeno seguro sin riesgo de contaminación con agentes infecciosos en una cantidad de producción suficiente. Por lo tanto, en una realización, la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención se utiliza para la producción de fibrinógeno para su uso en una terapia de reemplazo de deficiencia de fibrinógeno congénito y adquirido, etc. En otra realización, la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención se utiliza para la producción de fibrinógeno para su uso en la adhesión y el cierre de tejidos en cirugía. En otra realización, la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención se utiliza para la producción de fibrinógeno para su uso como sellador de fibrina.

Ejemplos

La presente invención se explica con más detalle en lo siguiente con referencia a los Ejemplos, que son meras ejemplificaciones y no limitan en absoluto el alcance de la presente invención.

(Ejemplo 1: Establecimiento de la línea celular que expresa el fibrinógeno)

Fueron insertados ADNc de la cadena A α , cadena B β y cadena γ del fibrinógeno que fueron amplificados a partir de la biblioteca humana de ADNc derivado de hígado (fabricada por Takara Bio Inc., 9505) usando el cebador de la polimerización en cadena mostrado en la Tabla 1 siguiente en un vector obtenido por la ligación de las tres unidades de expresión del vector de expresión pEE14.1, fabricado por Lonza para construir el vector de expresión de fibrinógeno pNT60 (vector de expresión con el promotor CMV modificado/gen de GS) (Fig. 1). Fue introducido pNT60 en la célula CHO-K1 establecida por Lonza, cultivada en un medio sin componentes animales (medio EX-cell302GS descrito en la Tabla 3), y fueron seleccionadas las células que expresaban la cadena A α del fibrinógeno, cadena B β y la cadena γ . Entonces, una célula transformada que tenía alta capacidad de producción de fibrinógeno fue seleccionada después para establecer la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y fue confirmada la reproducibilidad de la producción del fibrinógeno.

Tabla 1

Tabla 1: Cebador de la PCR

nombre de cebador	longitud (bp)	secuencia (3'-5')
LOA α -F (SEQ ID NO: 1)	30	GGAAGCTT <u>GCCACC</u> ATGTTTTCCATGAGGA HindIII Kozak Met
LOA α -R (SEQ ID NO: 2)	30	GGCCCGGGCTAGACAGGGCGAGATTTAGCA Sma I *
LOB β -F (SEQ ID NO: 3)	30	GGAAGCTT <u>GCCACC</u> ATGAAACATCTATTAT HindIII Kozak Met
LOB β -R (SEQ ID NO: 4)	30	GGAATTCCTATTGCTGTGGGAAGAAGGGC EcoRI *
LOY-F (SEQ ID NO: 5)	30	GGAAGCTT <u>GCCACC</u> ATGAGTTGGTCCTTGC HindIII Kozak Met
LOY-R (SEQ ID NO: 6)	30	GGAATTCCTTAAACGTCTCCAGCCTGTTTG EcoR I *

*: codón de terminación

La línea celular que expresa el fibrinógeno T233 obtenida por el método mencionado anteriormente fue cultivada a gran escala por cultivo en tarro de 2 L para producir 1,8 g/L de fibrinógeno recombinante y su producto de degradación en total, en el que no menos de la mitad del mismo era un producto de degradación. Entonces, el producto de degradación fue eliminado, y fue realizada una prueba de adhesión en piel porcina usando el fibrinógeno recombinante purificado. Como consecuencia, el fibrinógeno recombinante demostró un efecto de adhesión equivalente al del fibrinógeno derivado de plasma. De los resultados anteriores, se confirmó que la línea celular T233 que expresaba fibrinógeno puede expresar de forma estable un fibrinógeno con una actividad fisiológica equivalente a la del tipo natural.

5 (Ejemplo 2: construcción del vector de expresión α 2PI/PAI-2 (α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado)-1)

Para la construcción de un vector que se utilizará para la expresión de α 2PI y PAI-2 en una célula animal, fue realizada la ligación de las dos unidades de expresión de un vector de expresión pcDNA3.3-TOPO/lacZ (manufacturado por Invitrogen, K8300-01) para la célula animal.

15 Específicamente, usando pcDNA3.3-topo/lacZ y dos clases de cebadores (BamHI-Fw: CCCTATGGTCGACTCTCATGACAATCTG (SEQ ID NO: 7) y BamHI-RV: GATCCGTCGACGTCAGGTGGCACTTTTC (SEQ ID NO: 8)), BglII fue cambiado a BamHI por un método de introducción de mutagénesis específica del sitio (kit KOD-Plus-Mutagenesis, fabricado por TOYOBO CO., LTD., SMK-101) para dar un vector modificado m-pcDNA3.3 (Fig. 2).

20 Para insertar el ADNc de α 2PI o PAI-2 entre el promotor de CMV y el TK poly(A) de m-pcDNA3.3, fue agregada una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción por un método de introducción de mutagénesis específica del sitio (kit de KOD-Plus-Mutagenesis, fabricado por TOYOBO CO., Ltd., SMK-101). La secuencia de reconocimiento de KpnI y la secuencia de reconocimiento de NspV fueron agregadas posterior al promotor CMV del m-pcDNA3.3 para α 2PI utilizando un cebador específico (base RV KPN: GCTGGTACCCGATCCTCTAGAGTCCG-GAGGCTG (SEQ ID NO: 9) y base FW NSPV: AATTCGAATACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACG (SEQ ID NO: 10)). La secuencia de reconocimiento de XhoI y la secuencia de reconocimiento de HindIII fueron introducidas posteriores al promotor CMV del m-pcDNA3.3 para PAI-2 usando un cebador específico (base RV XHO: CTTCTCGAGCGATCCTCTAGAGTCCGAGGCTG (SEQ ID NO: 11) y base FW HIND: GCTAAGCTTT-ACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACG (SEQ ID NO: 12)). Los vectores de expresión construidos eran KpnI/NspV-m-pcDNA3.3 y XhoI/HindIII-m-pcDNA3.3, respectivamente. Entonces, KpnI/NspV-m-pcDNA3.3 fue digerido con BglII (fabricado por Takara Bio Inc., 1021A) y BamHI (fabricado por Takara Bio Inc., 1010A), y el fragmento fue insertado en pcDNA3.3-TOPO (fabricado por Invitrogen) digerido por adelantado con BglII. El vector así producido fue el KpnI/NspV-m-pcDNA3.3-TOPO. Entonces, XhoI/HindIII-m-pcDNA3.3 fue tratado con BglII y BamHI, y el fragmento fue insertado en KpnI/NspV-m-pcDNA3.3-TOPO digerido por adelantado con BglII para dar pcDNA3.3-modificado (Fig. 3).

35 Usando ADNc de PAI-2 (fabricado por Promega, ORS08641) como plantilla, y cebadores específicos (PAI-2 F Xho: AACCTCGAGGCCGCCACCATGGAGGATCTTTGTGTGGCAAAC (SEQ ID NO: 13) y PAI-2 RV Hind: GGGAAGCT-TAGGGTGAGGAAAATCTGCCG (SEQ ID NO: 14)), una porción de un marco de lectura abierto (ORF) de PAI-2 fue amplificado por la polimerización en cadena (KOD-plus, fabricada por TOYOBO CO., LTD., KOD-201), y fueron agregadas la secuencia de Kozak, la secuencia de reconocimiento de XhoI y la secuencia de reconocimiento de HindIII. El fragmento amplificado y pcDNA3.3-modificado fueron digeridos con XhoI (fabricado por Takara Bio Inc., 1094A) y HindIII (fabricado por Takara Bio Inc., 1060A), y el fragmento fue insertado en XhoI-HindIII del pcDNA3.3-modificado. El vector producido de tal modo fue el PAI-2/pcDNA3.3-modificado.

45 Usando ADNc de α 2pi (fabricado por Promega, ORS09380) como plantilla, y cebadores específicos (α 2PI F KPN: AAAGGTACCGCCGCCACCATGGCGCTGCTCTGGGGGCTCC (SEQ ID NO: 15) y α 2PI RV NSP: CCCTCGA-ATCACTTGGGGCTGCCAAACTGGGGG (SEQ ID NO: 16)), la porción de ORF de α 2PI fue amplificada por polimerización en cadena, y fueron agregadas la secuencia de Kozak, la secuencia de reconocimiento de KpnI y la secuencia de reconocimiento de NspV. El fragmento amplificado y PAI-2/pcDNA3.3-modificado fueron digeridos con KpnI (fabricado por Takara Bio Inc., 1068a) y NspV (fabricado por Takara Bio Inc., 1225a), y el fragmento fue ligada con PAI-2/pcDNA3.3-modificado. El vector así construido fue el α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado (Fig. 4).

50 La construcción α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado se monta con dos casetes de expresión regulados por el promotor CMV, insertado respectivamente con el ORF de α 2PI y el ORF de PAI-2. Además, se monta un gen de la resistencia a la neomicina utilizado como marcador selectivo en las células animales, que se expresa bajo la regulación del promotor SV40. Por lo tanto, una línea celular que expresa constantemente se puede construir por selección usando G418.

(Ejemplo 3: construcción del vector de expresión α 2PI/PAI-2 (α 2PI/PAI-2/m-pEE)-2)

55 Para la construcción de un vector que se utilizará para la expresión de α 2PI y PAI-2 en una célula animal, fue realizada la ligación de las dos unidades de expresión de un vector de expresión pEE (manufacturado por Lonza) para la célula animal.

Específicamente, el vector fue modificado usando pEE16.4 y pEE21.4, fabricados por Lonza. pEE21.4 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, y se aisló un fragmento de ADN de 2,9 kb. pEE16.4 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Sall para aislar un fragmento de ADN de 6,1 kb, y el fragmento de ADN mencionado anteriormente derivado de pEE21.4 fue insertado en éste. El vector modificado fue m-pEE (Fig. 5).

5 Para insertar el ADNc de $\alpha 2\text{PI}$ o PAI-2 entre el intrón A y poly(a) de m-pEE, la porción de ORF primero fue amplificada por polimerización en cadena (KOD-plus, fabricado por TOYOBO CO., Ltd., KOD-201) usando el ADNc de PAI-2 (manufacturado por Promega, ORS08641) como plantilla y los cebadores específicos (PAI-2 F hind: AACAAAGCTTGCCGCCACCATGGAGGATCTTTGTGTGGCAAAC (SEQ ID NO: 19) y PAI-2 RV nsp: GGGTTCGAATTAGGGTGAGGAAAATCTGCCG (SEQ ID NO: 20)), y fueron agregadas la secuencia de Kozak, la
10 secuencia de reconocimiento de HindIII y la secuencia de reconocimiento NspV. El fragmento amplificado fue digerido con HindIII (fabricado por Takara Bio Inc., 1060A) y BspT104I (fabricado por Takara Bio Inc., 1225A) y fue insertado entre HindIII-NspV de m-pEE. El vector producido de tal modo fue el PAI-2/m-pEE.

Entonces, la porción de ORF fue amplificada por PCR usando el ADNc de $\alpha 2\text{PI}$ (fabricado por Promega, ORS09380) como plantilla y los cebadores específicos (a2PI F Xho: AACCTCGAGGCCGCCACCATGGTGCTGCTCTGGGGGCTCC (SEQ ID NO: 17) y a2PI RV Kpn: CCCGGTACCTCACTTGGGGCTGCCAAACTGGGGG (SEQ ID NO: 18)), y fueron agregadas la secuencia de Kozak, la secuencia de reconocimiento XhoI y la secuencia de reconocimiento KpnI. El fragmento amplificado fue digerido con XhoI (fabricado por Takara Bio Inc., 1094A) y KpnI (fabricado por Takara Bio Inc., 1068A), y ligado a PAI-2/m-pEE. El vector así construido fue $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$ (Fig. 6). La siguiente Tabla 2 muestra las secuencias de cebadores de la PCR utilizados en este Ejemplo.

20 Tabla 2

Tabla 2: cebador de la PCR

nombre de cebador	longitud (bp)	secuencia (3'-5')
a2PI F Xho (SEQ ID NO: 17)	40	AACCTCGAGGCCGCCACCATGGTGCTGCTCTGGGGGCTCC Xho I Kozak Met
a2PI RV Kpn (SEQ ID NO: 18)	34	CCCGGTACCTCACTTGGGGCTGCCAAACTGGGGG KPN I *
PAI2 F hind (SEQ ID NO: 19)	42	AACAAGCTTGCCGCCACCATGGAGGATCTTTGTGTGGCAAAC HindIII Kozak Met
PAI2 RV NSP (SEQ ID NO: 20)	31	GGGTTCGAATTAGGGTGAGGAAAATCTGCCG Nsp V *
*: codón de terminación		

La construcción $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$ está montada con dos casetes de expresión regulados por el promotor CMV, insertados respectivamente con ORF de $\alpha 2\text{PI}$ y ORF de PAI-2. Además, se monta un gen de la resistencia a la puromicina utilizado como marcador selectivo en células animales, que se expresa bajo la regulación del promotor SV40. Por lo tanto, una línea celular que expresa constantemente se puede construir por selección usando puromicina.

(Ejemplo 4: establecimiento de fibrinógeno y la línea celular que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2)

La línea celular T233 que expresa fibrinógeno obtenida en el Ejemplo 1 fue suspendida en medio F-12 de D-MEM/Ham (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 048-29785) conteniendo FCS (fabricado por Hyclone, SH3088) al 10% a una densidad celular de $0,5-2,5 \times 10^5$ células/mL, y fue sembrada en una placa de 6 pocillos a 2 mL por pocillo. Después, las células fueron incubadas a 37°C, CO₂ al 5% durante aproximadamente 16 horas. Después de intercambiar con un medio nuevo (1 mL), los genes $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 fueron introducidos usando Lipofectamina 2000 (fabricado por Invitrogen, 11668). Específicamente, fueron linearizados $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{pcDNA3.3}$ -modificado (4,0 μg) o $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$ (4,0 μg) por digestión con Scal (fabricado por Takara Bio Inc., 10844) y fueron disueltos en 80 μL de Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, 31985-070) para dar una SOLUCIÓN A y se añadieron 4 μL de Lipofectamina 2000 a 80 μL de Opti-MEM para dar la SOLUCIÓN B y cada una se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. La SOLUCIÓN A y la SOLUCIÓN B se mezclaron y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla se añadió al pocillo como 160 μL por pocillo y se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 h. Los genes $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 fueron introducidos en la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, que fue lavada con PBS (-) y tratada con tripsina (fabricada por Invitrogen, 12604), y las células fueron recuperadas.

En cuanto a la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno introducida con los genes $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 utilizando $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{pcDNA3.3}$ -modificado, las células fueron suspendidas en medio F-12 de D-MEM/Ham conteniendo FCS al 10% agregado con 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (manufacturado por CALBIOCHEM, 345812), y fueron sembradas en una

ES 2 719 505 T3

placa de 96 pocillos a una densidad celular de 1×10^3 células/pocillo. Después de un cultivo durante aproximadamente 2 semanas (37°C , CO_2 al 5%), se seleccionó la línea celular de la resistencia a G418 (líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15).

5 En cuanto a la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno introducida con los genes $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 utilizando $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{m-pEE}$, las células fueron suspendidas en medio F-12 de D-MEM/Ham conteniendo FCS al 10% agregado con $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina (manufacturado por Invivogen, anti-pr-1), y fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 1×10^2 células/pocillo, 1×10^3 células/pocillo, 1×10^4 células/pocillo. Después del cultivo durante aproximadamente 2 semanas (37°C , CO_2 al 5%), se seleccionó la línea celular de resistencia a puromicina (líneas celulares que expresa conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 8 y N°. 68).

10 (Ejemplo 5: confirmación de la expresión de $\alpha 2\text{PI}$, PAI-2 y cadenas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ de fibrinógeno

1. confirmación de la expresión proteica de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2

15 Fueron suspendidas la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 cada una en el medio del lote de alimentación (Tabla 3) a una densidad celular de 1×10^6 células/mL, 5 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 125 mL y cultivadas agitando el matraz durante 10 días (37°C , CO_2 al 5%, 120-140 rpm). Se sometió a $10 \mu\text{L}$ del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE, y el gel después de la electroforesis se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (fabricado por Invitrogen, IB301001) mediante el uso del dispositivo de transferencia de gel iBlot (fabricado por Invitrogen, IB1001). El filtro se bloqueó con un tampón de bloqueo (3% leche desnatada (fabricada por Nacalai Tesque) conteniendo TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, pH = 8,0)) durante 30 min. El anticuerpo anti- $\alpha 2\text{PI}$ (fabricado por Santa Cruz, SC-73658) o el anticuerpo anti-PAI-2 (fabricado por Santa Cruz, SC-25745) diluido 200 veces con tampón de bloqueo se añadió y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El filtro se lavó 3 veces con TBS conteniendo Tween 20 al 0,02% (p/v) durante 10 min. Se añadió el complejo IgG [H + L] anti-ratón (ratón)- HRP (fabricado por Nacalai Tesque, 01803-44) 10.000 veces diluido con tampón de bloqueo al filtro tratado con anticuerpo anti- $\alpha 2\text{PI}$, y el complejo anti-conejo IgG [H + L] (cabra)-HRP (fabricado por Nacalai Tesque, 01827-44) 10.000 veces diluido con el tampón de bloqueo se añadió al filtro tratado con anticuerpos anti-PAI-2, y cada uno de ellos se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los filtros fueron lavados 3 veces con TBS conteniendo Tween 20 al 0,02% (p/v) durante 10 min, y la expresión de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 se detectaron utilizando el sustrato de duración extendida Super Signal West Dura (fabricado por Thermo, 34075).

20 Como resultado, la expresión de $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 transfectados fue confirmada para cada uno en los sobrenadantes del cultivo de las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 9 y N°. 15 (Fig. 7). En cuanto a PAI-2, PAI-2 derivado de la célula animal huésped (célula CHO) también fue expresado en la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233, y fue confirmado un aumento en el nivel de expresión por la introducción del gen de PAI-2.

Tabla 3

35 Tabla 3: EX-Cell 302GS (60756 modificado, fabricado por Nichirei Biosciences Inc., 5542-40 L4475)

composición del medio (g/L)

Reactivo	medio de lote	medio de lote de alimentación
EX-Cell 302GS (modificado 60756)	12,84	12,84
D-glucosa	2,92	2,92
L-glutamato de sodio	1,04	1,04
cloruro sódico	6,00	-
rojo de fenol	0,0066	0,0066
hidrogenocarbonato de sodio	1,6	-
L-tirosina 2Sodium	-	1,2
penicilina y estreptomina: 10.000 U/ml penicilina 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomina	cantidad 1/100	
12,5 mM de metionina sulfoximina (MSX)	cantidad 1/500	

La presión osmótica del medio lote de alimentación se ajustó como en una solución salina.

2. confirmación de la expresión de ARNm de $\alpha 2\text{PI}$, PAI-2 y cadenas de $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ de fibrinógeno

40 La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y la línea celular que expresaba conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N°. 15 establecida usando $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{pcDNA3.3}$ -modificado, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente

α 2PI/PAI-2/T233 N°. 8 y N°. 68 establecidas usando α 2PI/PAI-2/m-pEE fueron suspendidas en el medio del lote (Tabla 3) a una densidad celular de 1×10^6 células/mL, 125 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 20 mL y cultivadas agitando el matraz durante 6 días (37°C, CO₂ al 5%, 120-140 rpm). La cantidad de ARNm en las células cultivadas fue medida por la polimerización en cadena cuantitativa, y la expresión del transgén fue confirmada.

5 La extracción del ARN y la reacción de transcripción inversa se realizaron de la siguiente manera según el protocolo adjunto mediante el uso del kit de células de expresión génica a CTTM de TaqMan (marca registrada) (fabricado por Applied Biosystems, 4399002). Las células, el día 6 del cultivo, se lavaron con PBS (-) frío y se preparó PBS (-) frío a $2,0 \times 10^6$ células/mL. 5 μ L de la suspensión de las células se colocó en un microtubo, y fueron añadidos 50 μ L de la solución de lisis conteniendo 0,5 μ L de DNaseI. La mezcla de reacción se pipeteó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió solución de parada (5 μ L), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min, y se preparó el extracto de ARN. 40 μ L de RT MASTER MIX (2 \times RT buffer 25 μ L, 20 \times RT Enzyme MIX 2,5 μ L, agua sin nucleasa 12,5 μ L) y 10 μ L de extracto de ARN fueron mezclados, y se realizó la reacción de transcripción inversa (incubación a 37°C durante 30 min, y luego a 95°C durante 5 min).

15 La PCR cuantitativa se realizó utilizando el sistema de análisis de la PCR a tiempo real HRM (fabricado por Bio-Rad, 185-5196-J4CAM), y se midió la cantidad de ADN transcrito de manera inversa. Concretamente, se realizó de la siguiente manera según el protocolo adjunto y utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (fabricado por Applied Biosystems, 4304437) y TaqMan Primer & Probe Mix (x20) (Tabla 4). Se mezclaron la TaqMan Universal PCR Master Mix (10 μ L), la TaqMan Primer & Probe Mix (1 μ L), la mezcla de reacción de transcripción inversa (2 μ L) y el agua destilada esterilizada (7 μ L). La reacción PCR incluyó un pre-tratamiento que implicaba una incubación a 50°C durante 2 min, seguido de una incubación a 95°C durante 10 min, y 40 repeticiones de la reacción a 95°C durante 15 s, y 60°C durante 1 min.

[Tabla 4]

Tabla 4: ID de ensayo del ensayo TaqMan (Primer & Probe Mix (x20))

Nombre	Ensayo ID
Cadena alfa de fibrinógeno	Hs00241027
Cadena beta de fibrinógeno	Hs00905942
Cadena gamma de fibrinógeno	Hs00241037
Inhibidor de la peptidasa de serpin, clado B (ovalbúmina), miembro 2	Hs01010736
Inhibidor de la peptidasa de serpin, clado F (antiplasmina alfa-2, factor derivado del pigmento de epitelio), miembro 2	Hs00168686

25 En cuanto al nivel de expresión del ARNm el día 6 del cultivo, las expresiones de α 2PI y PAI-2 no fueron detectadas en las células de la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, mientras que fue detectada una expresión clara en las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 15, N°. 8 y N°. 68, por lo que fue demostrado que el vector de expresión introducido funcionaba (Fig. 8). En las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 8 y N°. 68 establecidas usando α 2PI/PAI-2/m-pEE, fue detectado aproximadamente un nivel de ARNm de PAI-2 10 veces más alto en comparación con la línea celular que expresaba conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 15 establecida usando α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado, y fue confirmada una diferencia en el nivel de expresión debido al vector. En cuanto al nivel de expresión del ARNm de α 2PI, la línea celular que expresaba conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 8 y la línea celular que expresaba conjuntamente el α 2PI/PAI-2/T233 N°. 15 demostró una expresión equivalente. Sin embargo, el nivel de expresión fue 1/10 en la línea celular que expresaba conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 68, mostrando así una diferencia en el nivel de expresión entre las líneas celulares. Por otro lado, en cuanto al fibrinógeno, la expresión de la cadena A α , cadena B β y cadena γ se confirmó en todas las líneas celulares. El nivel de expresión no fue diferente entre la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N°. 15, N°. 8 y N°. 68 (Fig. 8).

40 (Ejemplo 6: supresión de la degradación de la cadena A α del fibrinógeno en el cultivo)

En general, las células cultivadas crecieron en el orden de fase de retardo, fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria y fase de muerte, donde se correlacionan el número de células cultivadas y la cantidad de producción de proteína recombinante. Por lo tanto, cuando se produce una proteína recombinante, se considera que una extensión del período de la fase estacionaria, cuando el número de células cultivadas alcanza el pico, es decir, en la etapa más tardía del cultivo, conduce a un aumento en la cantidad de producción de proteína recombinante, y el progreso de degradación del fibrinógeno en la etapa más tardía del cultivo cuando la densidad celular es alta plantea un problema fatal para la producción a gran escala del fibrinógeno. Por lo tanto, fue examinado si la degradación del fibrinógeno se podía suprimir bajo condiciones de cultivo de alta densidad celular.

1. supresión de la degradación de la cadena A α de fibrinógeno en la línea celular que expresa conjuntamente establecida usando α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 fueron suspendidas en un medio de lote de alimentación (Tabla 3) con una densidad celular alta de 1×10^6 células/mL, 5 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 125 mL y se cultivaron agitando el matraz durante 2 semanas (37°C, CO $_2$ al 5%, 120-140 rpm). Los sobrenadantes del cultivo (10 μ L) el día 2, día 8 y día 14 fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones reductores, y el gel después de la electroforesis se tiñó con una solución de tinción Instant Blue (fabricada por Funakoshi Co., Ltd., ISB1L) durante 15 min. En el fibrinógeno, en el sobrenadante del cultivo la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233, la proporción de cadena A α (67kDa) disminuyó junto con un número creciente de días de cultivo en comparación con la cadena B β del fibrinógeno (56kDa) y la cadena γ (48kDa), y se demostró que la degradación de la cadena A α del fibrinógeno procedía según el período de cultivo se hacía más largo (Fig. 9A). Por otro lado, la cadena γ de fibrinógeno apenas se degradó independientemente del número alto/bajo de periodos de cultivo y, por lo tanto, el gel teñido fue escaneado por un densitómetro (fabricado por Bio-Rad, densitómetro calibrado GS-800), y la variación de la cadena A α en relación con la cadena γ se mostró en valores numéricos. Concretamente, utilizando el software adjunto "Quantity One", se midió el volumen de la banda (concentración de banda x área) de la cadena A α , cadena B β y la cadena γ , y la proporción de la cadena A α se calculó dividiendo el volumen de la banda de la cadena A α por el volumen de la banda de la cadena γ (peso molecular: cadena A α 67kD, cadena γ 48kD). La relación de la cadena A α frente a la cadena γ en el fibrinógeno derivado del plasma (pFbg: fabricado por CALBIOCHEM, 341576) sometido simultáneamente a electroforesis como un control en cada gel fue utilizado como índice de degradación. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo, cuando la relación de la cadena A α frente a la cadena γ de pFbg es 100%, se muestra como la relación residual de la cadena A α (Fig. 9B).

Por lo tanto, el día 2 del cultivo, el cociente residual de la cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 fue igual a la relación residual de la cadena A α del control pFbg, y la degradación de la cadena A α del fibrinógeno no se observó en ninguna línea celular. Sin embargo, el día 8 del cultivo, la relación residual de la cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 disminuyó a no más de la mitad (47%) de la relación residual de la cadena A α del control pFbg, y fue encontrada una notable degradación de la cadena A α del fibrinógeno. La relación residual de la cadena A α de las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 se mantuvo al menos al mismo nivel (97-106%) como la relación residual de la cadena A α del control pFbg, similar al del día 2 del cultivo, y apenas se encontró la degradación de la cadena A α del fibrinógeno. El día 14 del cultivo, el cociente residual de la cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 disminuyó a aproximadamente 1/3 (33%) de la relación residual de la cadena A α del control pFbg, y la degradación de la cadena A α del fibrinógeno progresó más allá del día 8 del cultivo. La relación residual de la cadena A α de las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 disminuyó levemente (80-85%) en comparación con el día 8 del cultivo (97-106%) pero aun así mantuvo la alta relación residual de la cadena A α . La relación residual de la cadena A α no fue inferior a aproximadamente 2,5 veces que (33%) la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 en las mismas condiciones (Fig. 9B).

A partir de los resultados anteriores, se demostró que la relación residual de la cadena α aumentaba en no menos de aproximadamente 2,5 veces, incluso en la etapa más tardía del cultivo cuando la densidad celular era alta y la degradación del fibrinógeno procedía de forma general notablemente, ya que la degradación de la cadena A α del fibrinógeno en el cultivo se suprime fuertemente en comparación con la expresión del fibrinógeno solo, por la expresión conjunta del fibrinógeno y α 2PI y/o PAI-2.

2. supresión de la degradación de la cadena A α del fibrinógeno en la expresión conjunta de la línea celular establecida usando α 2PI/PAI-2/m-pEE

Fue examinado si la degradación del fibrinógeno se podía suprimir en altas condiciones de cultivo con alta densidad celular en la expresión conjunta de una línea celular establecida mediante un vector de expresión α 2PI/PAI-2/m-pEE diferente del α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado.

Similar al método descrito en el mencionado ejemplo 6, 1., la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 8 y N $^{\circ}$. 68 fueron suspendidas cada una en el medio del lote de alimentación (Tabla 3) con una densidad celular alta de 1×10^6 células/mL, 20 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 125 mL y cultivadas agitando el matraz durante 12 días (37°C, CO $_2$ al 5%, 120-140 rpm). Los sobrenadantes del cultivo (5 μ L) en el día 4, día 8, día 10 y día 12 fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones de reducción, y el gel, después de la electroforesis, se tiñó con una solución de tinción Instant Blue (fabricada por Funakoshi Co., Ltd., ISB1L) durante 15 min. Como resultado, similar a los resultados anteriormente mencionados en 1., en fibrinógeno, en el sobrenadante del cultivo de las líneas celulares T233 que expresan el fibrinógeno, la relación de la cadena A α (67kDa) disminuyó junto con un número creciente de días de cultivo en comparación con la cadena B β (56kDa) y la cadena γ (48kDa) del fibrinógeno, y se demostró que la degradación de la cadena A α del fibrinógeno procedía según el período de cultivo se hacía más largo (Fig. 10A). Por otro lado, la cadena γ del fibrinógeno apenas se degradó independientemente del alto/bajo número de periodos de cultivo y, por lo tanto, el gel teñido fue escaneado por un densitómetro (fabricado por Bio-Rad, densitómetro calibrado GS-800), y

la variación de la cadena A α en relación con la cadena γ se mostró en valores numéricos. Concretamente, utilizando el software adjunto "Quantity One", el volumen de la banda (concentración de banda x área) de la cadena A α , cadena B β y la cadena γ se midió, y la proporción de la cadena A α se calculó dividiendo el volumen de la banda de la cadena A α por el volumen de la banda de la cadena γ . La relación de la cadena A α frente a la cadena γ en el fibrinógeno derivado de plasma (pFbg: fabricado por CALBIOCHEM, 341576) sometido simultáneamente a electroforesis como control en cada gel fue utilizado como índice de degradación. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo, cuando la relación de la cadena A α frente a la cadena γ de pFbg es del 100%, se muestra como la relación residual de la cadena A α (Fig. 10B).

Por lo tanto, el día 4 y el día 8 de cultivo, el cociente residual de la cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 8 y N $^{\circ}$. 68 no fue inferior al 80%, y apenas se observó degradación de la cadena A α del fibrinógeno en ninguna línea celular. Sin embargo, el día 10 del cultivo, la relación residual de la cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 disminuyó a no más de la mitad (40%) de la relación residual de la cadena A α del control pFbg, y fue encontrada una notable degradación de la cadena A α del fibrinógeno. La relación residual de la cadena A α de las líneas celulares que expresa conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 8 y N $^{\circ}$. 68 mantuvieron al menos el mismo nivel (100% o más) que la relación residual de la cadena A α del control pFbg, y apenas se encontró degradación de la cadena A α del fibrinógeno. La relación residual de la cadena A α no fue inferior a aproximadamente 2,5 veces la de la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno en las mismas condiciones (Fig. 10B).

El efecto supresor en la degradación del fibrinógeno en la línea celular que expresaba conjuntamente establecida con el α 2PI/PAI-2/m-pEE estaba en línea con el efecto en la línea celular que expresaba conjuntamente establecida usando α 2PI/PAI-2/pcDNA3.3-modificado.

Cuando el fibrinógeno se expresó conjuntamente con α 2PI y PAI-2, los niveles de expresión del ARNm de α 2PI y PAI-2 variaron debido a la diferencia en los vectores transgénicos α 2PI y PAI-2, o la diferencia en las líneas celulares obtenidas (Ejemplo 5). Sin embargo, la relación residual de fibrinógeno de la cadena A α en la línea celular de la expresión conjunta fue igualmente alta (aproximadamente 2,5 veces) en comparación con la relación residual de cadena A α de la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 en las mismas condiciones, independientemente del vector utilizado y en cualquier línea celular, en las mismas condiciones.

Estos resultados demuestran que el efecto supresor en la degradación de la cadena A α del fibrinógeno en la línea celular que expresa conjuntamente no está influenciada de forma significativa por el nivel alto o bajo de la expresión del ARNm de α 2PI y PAI-2, o la diferencia en los vectores de expresión y las líneas celulares.

(Ejemplo 7: supresión de la actividad de la proteasa tipo plasmina en el sobrenadante del cultivo)

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 se cultivaron bajo las mismas condiciones que en el ejemplo 6, y la actividad tipo plasmina en el sobrenadante del cultivo se midió el día 14 del cultivo mediante el uso de un kit PLG 2 de Test Team (marca registrada) (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD., 439-9091). Concretamente, se mezclaron el sobrenadante del cultivo (50 μ L) y el sustrato sintético cromogénico S-2251 para la plasmina (altamente específico para la sustancia activa tipo plasmina) (50 μ L) y la mezcla se mantuvo a 37 $^{\circ}$ C durante 24 horas. Se añadió un líquido de inactivación de la reacción (1 mL), y la absorbancia se midió mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La absorbancia de las líneas celulares que expresa conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15, cuando la absorbancia la línea celular que expresaba el fibrinógeno T233 era 1, se muestra como valor relativo (Fig. 11).

Por lo tanto, la absorbancia relativa de las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 frente a la absorbancia de la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno estaba entre 0,5 y 0,2, respectivamente, y fue demostrado que la actividad de la proteasa tipo plasmina en el sobrenadante del cultivo era suprimida por lo menos a la mitad.

En las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15, la degradación de la cadena A α del fibrinógeno se suprimió fuertemente incluso en la etapa más última del cultivo cuando la densidad celular era alta y la degradación del fibrinógeno procedía en general notablemente (Fig. 9), y la actividad tipo plasmina también fue suprimida (Fig. 11). Por lo tanto, se sugirió la posibilidad de que la degradación de la cadena A α del fibrinógeno fue suprimida puesto que la producción y la actividad de plasmina presentes en el sobrenadante del cultivo fue inhibida por los α 2PI y PAI-2 expresados conjuntamente.

(Ejemplo 8: producción de fibrinógeno en líneas celulares que expresa conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15)

Como se mencionó anteriormente, la degradación del fibrinógeno generalmente progresa notablemente en las etapas posteriores del cultivo cuando la densidad celular es alta, y apenas progresa en las etapas iniciales cuando la densidad celular es baja. Por lo tanto, la línea celular que expresaba conjuntamente T233, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N $^{\circ}$. 9 y N $^{\circ}$. 15 se cultivaron bajo condiciones de cultivo con baja densidad celular, en la que la degradación del fibrinógeno no se produce fácilmente, y fue examinado si la expresión conjunta de fibrinógeno y α 2PI y PAI-2 influía en la capacidad de producción del fibrinógeno, independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno.

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 9 y N^o. 15 fueron suspendidas en el medio del lote (tabla 3) a una densidad celular baja de $1,2 \times 10^5$ células/mL, 30 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 125 mL, y cultivadas agitando el matraz durante 10 días (37°C, CO₂ al 5%, 120-140 rpm). Fueron tomadas alícuotas del sobrenadante del cultivo a 0,4 mL por día, y se agregó medio del lote de alimentación al 5% (v/v) el día 4 del cultivo. Entonces, la cantidad de fibrinógeno en el sobrenadante del cultivo se midió de la siguiente manera por el método ELISA.

Fue diluido anticuerpo policlonal de conejo · fibrinógeno anti-humano (manufacturado por DAKO, A0080) (6 mg/ml) 1.200 veces con Coating Solution (fabricada por KPL, 50-84-01), agregada a una placa de 96 pocillos (fabricada por Coster, 3590) a 100 μL por pocillo y fue mantenido a 4°C durante la noche. Entonces, fue agregada una solución del diluyente/bloqueo de BSA (fabricada por KPL, 50-61-01) a 300 μL por pocillo, y la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Se produjo y utilizó una serie de dilución de fibrinógeno derivado de plasma (pFbg: fabricado por CALBIOCHEM, 341576) como patrón (440 ng/ml, 220 ng/ml, 110 ng/ml, 55 ng/ml, 27,5 ng/ml, 13,75 ng/ml, 6,88 ng/ml, 3,44 ng/mL, 0 ng/mL). Una muestra estándar y de medida fue agregada a 100 μL por pocillo, y la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces, la placa fue lavada con solución de lavado (300 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$, 5 veces, usando un lavador de placa), fue agregada la solución secundaria del anticuerpo diluida 10.000 veces con solución de diluyente/bloqueo de BSA a 100 μL por pocillo, y la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con solución de lavado (Tween 80 al 0,05%, NaCl al 0,9%), fue añadida solución de detección (fabricada por KPL, 50-62-00) a 100 μL por pocillo, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Fue añadida solución de parada de peroxidasa (fabricada por KPL, 50-85-01) a 100 μL por pocillo, y la reacción fue descontinuada. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 405 nm.

Por lo tanto, la cantidad de fibrinógeno en el sobrenadante de cultivo mostró una tendencia similar hasta el día 5 del cultivo en toda la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 9 y N^o. 15, y la cantidad de fibrinógeno el día 4 del cultivo fue de aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 12). Sin embargo, el día 8 del cultivo, la cantidad de fibrinógeno en la línea celular que expresaba conjuntamente T233 fue de aproximadamente 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la cantidad de fibrinógeno en las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 9 y N^o. 15 alcanzaron aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostrando así aproximadamente una cantidad de fibrinógeno 2 veces mayor en comparación con la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno. Puesto que la degradación del fibrinógeno progresa apenas bajo condiciones de cultivo de densidad celular baja en este ejemplo, fue demostrado a partir de los resultados que la expresión conjunta del fibrinógeno y $\alpha 2\text{PI}$ y/o PAI-2 aumenta drásticamente (aproximadamente 2 veces) la cantidad de producción de fibrinógeno independientemente del efecto supresor respecto a la degradación del fibrinógeno.

(Ejemplo 9: producción de fibrinógeno en líneas celulares que expresan conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68)

En cuanto a las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68 establecidas utilizando un vector diferente a partir de las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 9 y N^o. 15, la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68 se cultivaron bajo condiciones de cultivo con baja densidad celular, en la que no se produce fácilmente la degradación del fibrinógeno y fue examinada si la expresión conjunta de fibrinógeno y $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 influían en la capacidad de producción del fibrinógeno, independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno.

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68 fueron suspendidas en el medio del lote (Tabla 3) a una densidad celular baja de 2×10^5 células/mL, 20 mL de éstas fueron sembradas en un matraz de 125 mL, y cultivadas agitando el matraz durante 8 días (37°C, CO₂ al 5%, 120-140 rpm). Se tomaron alícuotas del sobrenadante de cultivo de 0,4 mL por día, y se agregó una cantidad igual de medio del lote de alimentación.

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno, y las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68 no mostraron una gran diferencia en el perfil del número de células viables y en la tasa de supervivencia (Fig. 13).

Entonces, por un método similar al del ejemplo 8, con el método ELISA se midió la cantidad de fibrinógeno en el sobrenadante del cultivo. Como consecuencia, la cantidad de fibrinógeno en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares que expresaban conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8 y N^o. 68 fue diferente respecto al perfil del número de células viables, y un perfil de altas cantidades de fibrinógeno fue observado a partir del día 3 del cultivo, en comparación con la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno. El día 8 del cultivo, la cantidad de la línea celular T233 que expresaba fibrinógeno fue de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que fue de aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la línea celular que expresaba conjuntamente $\alpha 2\text{PI}/\text{PAI-2}/\text{T233}$ N^o. 8, y aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en N^o. 68, mostrando así una cantidad de fibrinógeno de aproximadamente 1,5 a 2 veces en comparación con la línea celular que expresaba conjuntamente T233.

Estos resultados demuestran que la expresión conjunta del fibrinógeno con $\alpha 2\text{PI}$ y PAI-2 puede realzar la productividad del fibrinógeno independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno. Además, se

demonstró que el efecto estaba libre de la influencia de una diferencia entre vectores y líneas celulares.

A partir de lo anterior se demostró que la línea recombinante altamente productora de fibrinógeno generada por el método de la presente invención suprime fuertemente la degradación del fibrinógeno incluso en la etapa más tardía del cultivo cuando la degradación del fibrinógeno generalmente progresaba, consecuencia de lo cual aumenta la relación residual de la cadena A α de fibrinógeno en aproximadamente 2,5 veces o más en comparación, por ejemplo, con una línea celular que expresa el fibrinógeno solo, así como aumenta (aproximadamente de 1,5 a 2 veces) la cantidad de producción de fibrinógeno independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno. Debido al efecto sinérgico de éstas, puede lograrse al menos no menos de 4 veces la cantidad de producción de fibrinógeno en comparación con una línea celular que expresa el fibrinógeno solo.

(Ejemplo 10: efecto supresor de la degradación del fibrinógeno por la adición de α 2PI, PAI-1 y PAI-2)

Los resultados del ejemplo 6 han demostrado que la expresión conjunta del fibrinógeno con α 2PI y PAI-2 puede suprimir fuertemente la degradación del fibrinógeno en la etapa más tardía del cultivo. Para confirmar si los dos tipos de proteínas expresadas conjuntamente ambos ofrecían un efecto supresor en la degradación, y si el uso de PAI-1 tenía un mecanismo de acción similar cuando PAI-2 proporciona un efecto supresor en la degradación del fibrinógeno, α 2PI, PAI-1 y PAI-2 fueron agregados cada uno al sobrenadante del cultivo de la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno en la etapa más tardía del cultivo, y fue examinada la variación en el cociente de la cadena A α frente a la cadena γ del fibrinógeno.

La línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno se suspendió en el medio del lote de alimentación (Tabla 3) con una densidad celular alta de 1×10^6 células/mL, 5 mL de éstas se sembraron en un matraz de 125 mL y se cultivaron agitando el matraz durante 10 días (37°C, CO₂ al 5%, 120-140 rpm). Se añadieron α 2PI (fabricado por Abcam, ab90921), PAI-1 (fabricado por pepro Tech, 140-04) o PAI-2 (fabricado por Peppo Tech, 140-06) al sobrenadante de cultivo (100 μ L) el día 10 del cultivo, o sin adición de estos, y las células se mantuvieron a 37°C durante 3 días. La cantidad de α 2PI y PAI-2 añadida equivalía a la cantidad expresada en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares que expresaban conjuntamente α 2PI/PAI-2/T233 N^o. 9 y N^o. 15 el día 10 del cultivo. La cantidad de PAI-1 agregada siguió la cantidad de PAI-2. El valor relativo de la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en cada muestra de cultivo, cuando la relación de la cadena A α frente a la cadena γ en la línea celular que expresaba conjuntamente T233 el día 10 del cultivo era del 100%, se muestra como la relación residual de la cadena A α (Fig. 14).

Como consecuencia, la degradación progresaba cuando la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno el día 10 de cultivo se mantenía bajo condiciones de no adición a 37°C durante 3 días, alcanzando la relación residual de la cadena A α un 48%. Cuando se agregaba α 2PI o PAI-2 a la línea celular T233 que expresaba el fibrinógeno el día 10 del cultivo y se mantenía a 37°C durante 3 días, el cociente residual de la cadena A α alcanzaba un 72-84%, y la degradación del fibrinógeno se suprimía en comparación con la no-adición (48%). Dado que ambos α 2PI y PAI-2 suprimieron la degradación del fibrinógeno, se demostró que cada uno tenía un efecto supresor en la degradación de la cadena A α del fibrinógeno. Por otro lado, el cociente residual de la cadena A α cuando se añadía PAI-1, que es una proteína similar a PAI-2, y la mezcla era mantenida a 37°C durante 3 días era del mismo nivel (44-48%) que la no adición (48%), y no se encontró ningún efecto supresor respecto a la degradación del fibrinógeno en PAI-1 (Fig. 14).

Tanto PAI-1 como PAI-2 son inhibidores pertenecientes a SERPIN y están presentes in vivo, lo que suprime la producción de plasmina del plasminógeno inhibiendo un activador del plasminógeno. La gran diferencia en los efectos por la adición de proteínas inhibitorias de proteasa, PAI-1 y PAI-2, que tienen un mecanismo de acción similar indica que el mecanismo involucrado en la degradación de la cadena A α del fibrinógeno tiene una especificidad exacta.

[Aplicabilidad industrial]

La cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención que suprime fuertemente la degradación del fibrinógeno incluso en la etapa más tardía del cultivo, cuando la degradación del fibrinógeno generalmente se produce, no sólo puede aumentar el cociente residual de la cadena A α del fibrinógeno en no menos de aproximadamente 2,5 veces en comparación, por ejemplo, con una cepa celular (línea celular) que expresa el fibrinógeno solo, sino que también puede aumentar (aproximadamente de 1,5 a 2 veces) la cantidad de producción de fibrinógeno, independientemente del efecto supresor en la degradación del fibrinógeno. Como consecuencia del efecto sinérgico de ésta, la cantidad de producción de fibrinógeno no es inferior a 4 veces la de una cepa celular (línea celular) que expresa el fibrinógeno solo. Por lo tanto, utilizando la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención, un fibrinógeno recombinante puede ser producido en una gran cantidad, un fibrinógeno recombinante puede ser formulado a un nivel práctico, y el suministro estable de fibrinógeno al mercado puede ser asegurado.

Además, dado que el fibrinógeno obtenido por la cepa recombinante (línea celular) altamente productora de fibrinógeno de la presente invención es producido por una técnica de recombinación génica, el riesgo de contaminación con agentes infecciosos, que es un problema específico en las preparaciones derivadas de la sangre, se puede eliminar por completo, y se puede asegurar una seguridad suficiente. Consecuentemente, se puede utilizar con seguridad el fibrinógeno en una cantidad suficiente para el tratamiento y, de forma segura, para un largo plazo.

Lista de secuencias

- <110> Japan Blood Products Organization
- <120> Línea altamente productora de fibrinógeno recombinante y método para su producción
- <130> 092253
- 5 <150> JP 2013-273145
<151> 2013-12-27
- <160> 20
- <170> PatentIn version 3.5
- 10 <210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> cebador
- 15 <400> 1
ggaagcttgc caccatgttt tccatgagga 30
- <210> 2
<211> 30
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> cebador
- <400> 2
ggcccgggct agacagggcg agatttagca 30
- 25 <210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> cebador
- <400> 3
ggaagcttgc caccatgaaa catctattat 30
- <210> 4
<211> 30
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> cebador
- <400> 4
gggaattcct attgctgtgg gaagaagggc 30
- <210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> cebador
- <400> 5
ggaagcttgc caccatgagt tggccttgc 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 gggaattctt aaacgtctcc agcctgtttg 30

10 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 7
 ccctatggtc gactctcagt acaatctg 28

<210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 8
 gatccgtcga cgtcaggtag cacttttc 28

25 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 9
 gctggtacct gatcctctag agtccggagg ctg 33

<210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 10
 aatttcgaat accggttagt aatgagttta aacg 34

<210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 ctctcgagc gatcctctag agtccggagg ctg 33

50 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 5 gctaagcttt accggttagt aatgagttta aacg 34
 <210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 aacctcgagg cgcaccat ggaggatctt tgtgtggcaa ac 42
 <210> 14
 15 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 14
 gggaagctta ggtgaggaa aatctgccg 29
 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 aaaggtaccg cgcaccat ggcgtgctc tgggggctcc 40
 30 <210> 16
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 16
 ccctcgaat cactggggc tgccaaactg gggg 34
 <210> 17
 <211> 40
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 45 aacctcgagg cgcaccat ggtgctgctc tgggggctcc 40
 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>

ES 2 719 505 T3

<223> cebador

<400> 18

cccggtagct cacttggggc tgccaaactg gggg 34

<210> 19

5 <211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

10 <400> 19

aacaagctg ccgccacat ggaggatctt tgtgtggcaa ac 42

<210> 20

<211> 31

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 20

gggttcgaat tagggtgagg aaaatctgcc g 31

20

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que es una línea celular animal que expresa conjuntamente fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 obtenida introduciendo genes que codifican la cadena A α , la cadena B β y la cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en una célula animal.
- 5 2. La línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno según la reivindicación 1, en la que el fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 son fibrinógeno humano y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 humanos.
3. La línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la célula animal es una célula CHO.
- 10 4. Un método de producción de una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que comprende introducir genes que codifican la cadena A α , la cadena B β y la cadena γ del fibrinógeno, y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en una célula animal, y expresar conjuntamente el fibrinógeno y $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 en la célula animal.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende expresar fibrinógeno en la célula animal utilizando un único vector de expresión que comprende todos los genes que codifican la cadena A α , la cadena B β y la cadena γ del fibrinógeno.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, que comprende expresar $\alpha 2PI$ y PAI-2 en la célula animal usando un único vector de expresión que comprende un gen que codifica $\alpha 2PI$ y un gen que codifica PAI-2.
- 20 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que los genes que codifican la cadena A α , la cadena B β y la cadena γ de fibrinógeno y el gen o los genes que codifican $\alpha 2PI$ y/o PAI-2 son cada uno un gen humano.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la célula animal es una célula CHO.
- 25 9. Un método de producción de un fibrinógeno recombinante, que comprende cultivar la línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una línea celular recombinante altamente productora de fibrinógeno, que se obtiene mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en un medio, y recuperar el fibrinógeno del cultivo obtenido.

Fig. 1

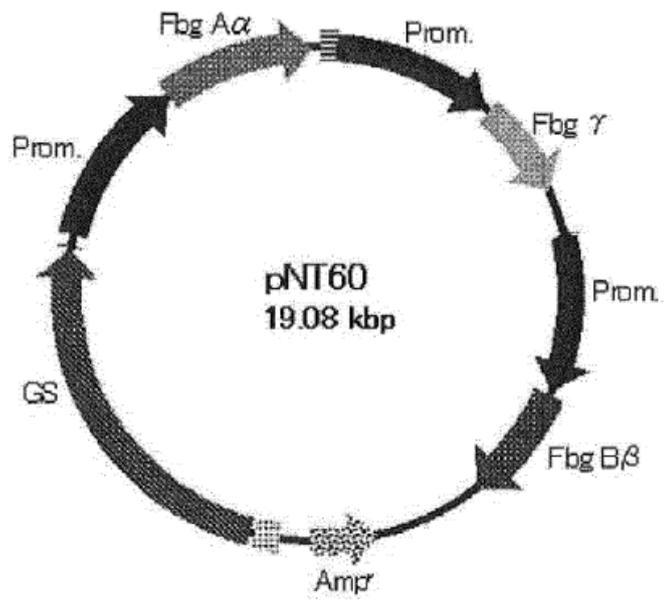


Fig. 2

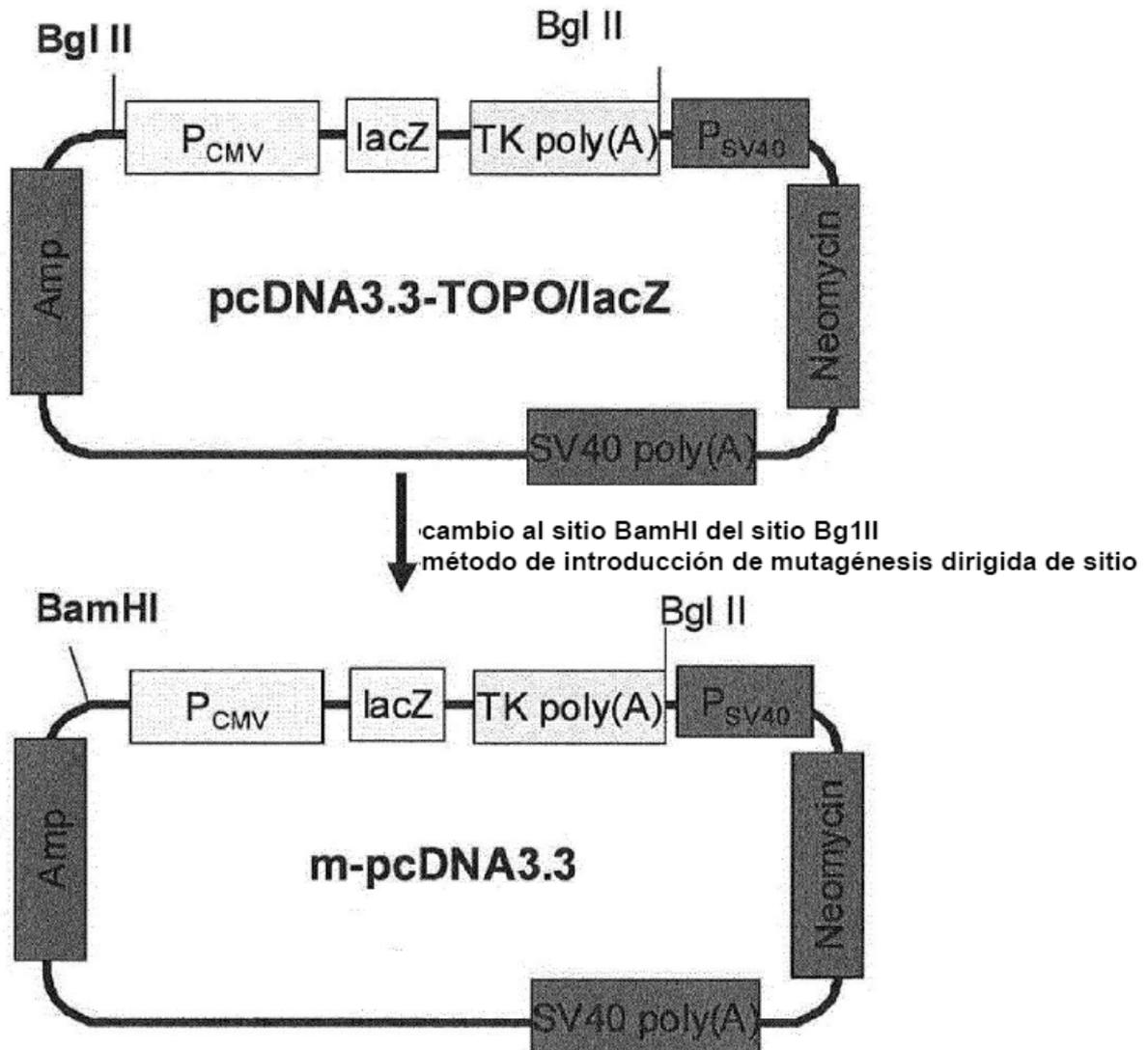


Fig. 4

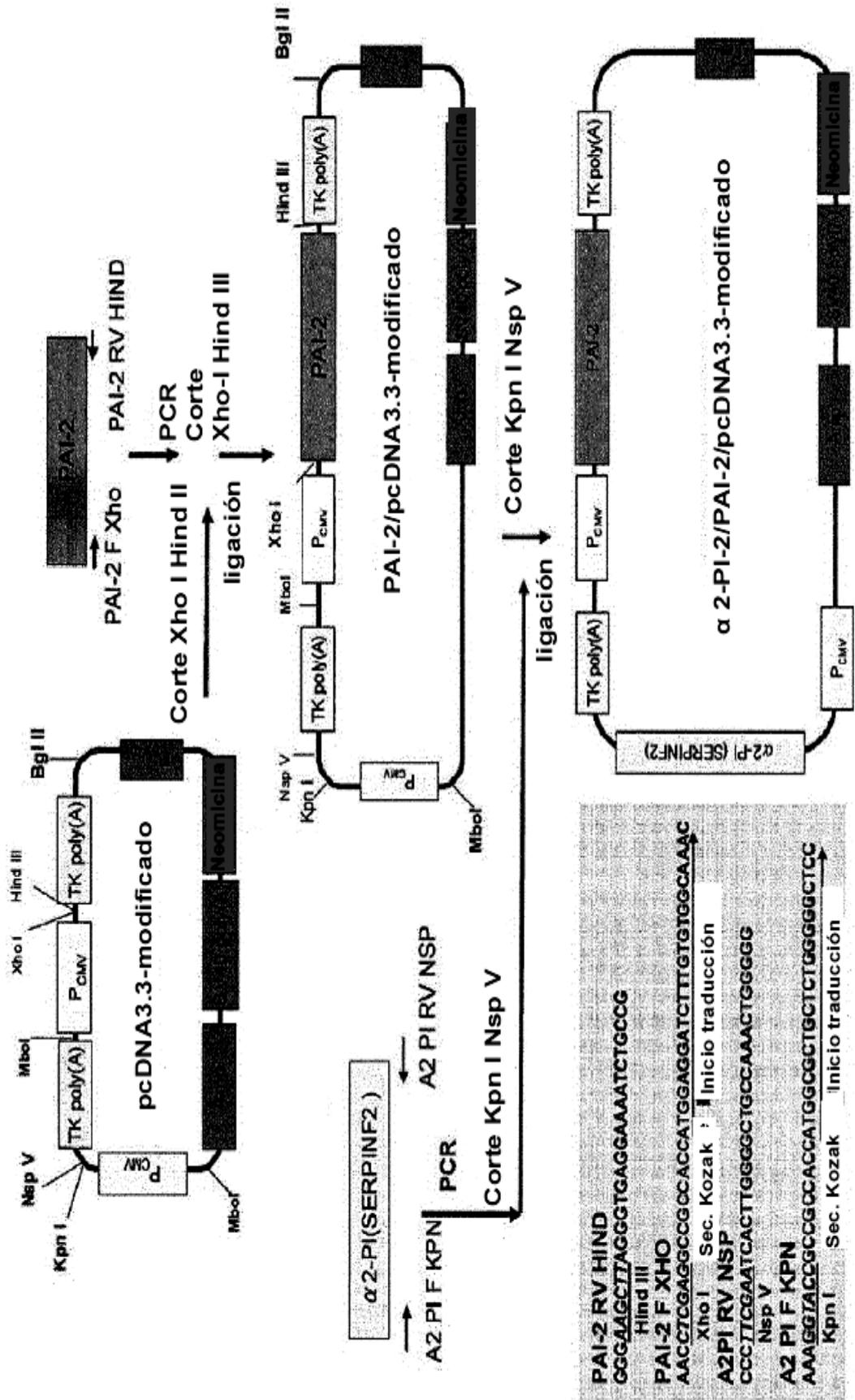


Fig. 5

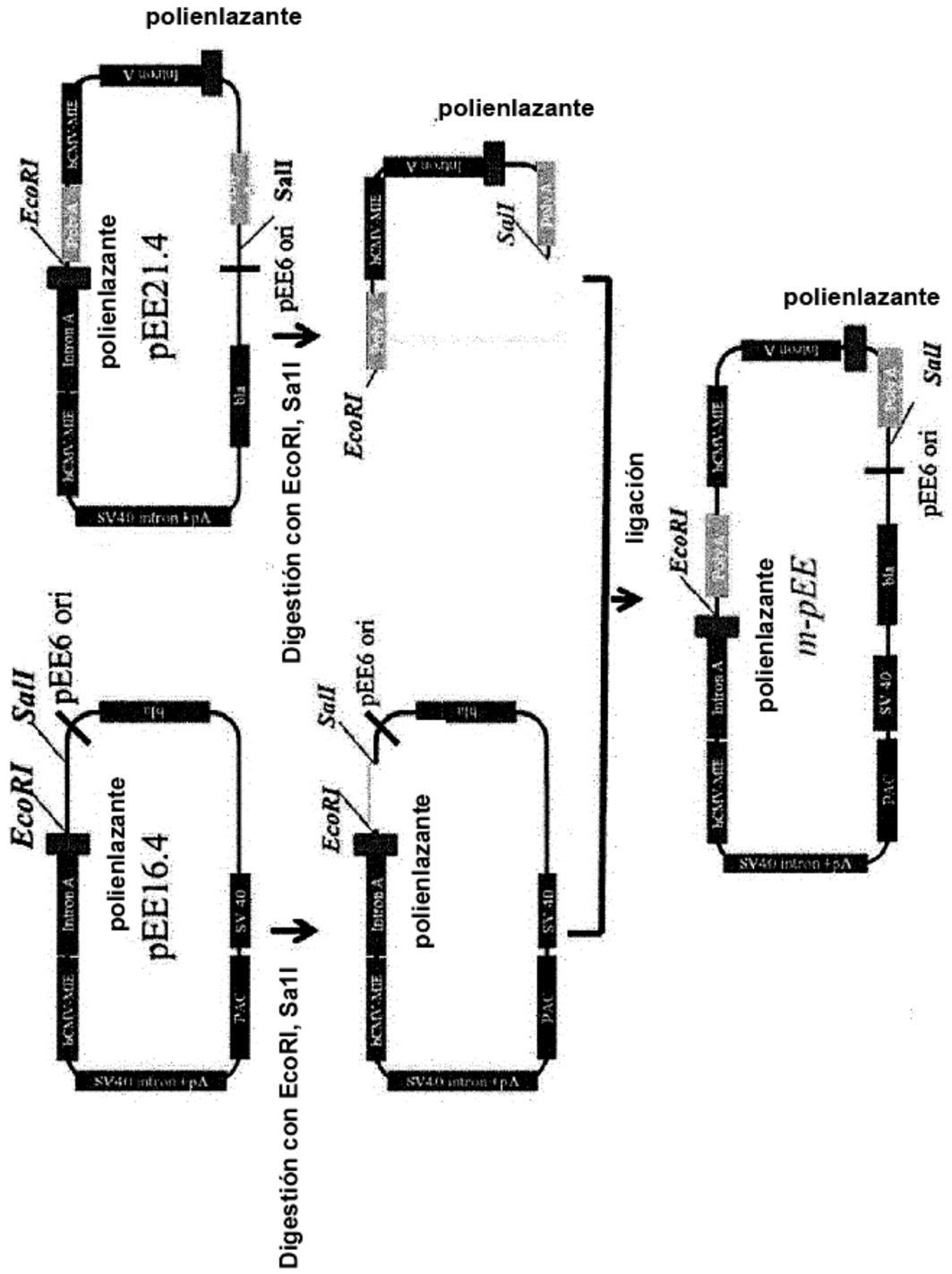


Fig. 6

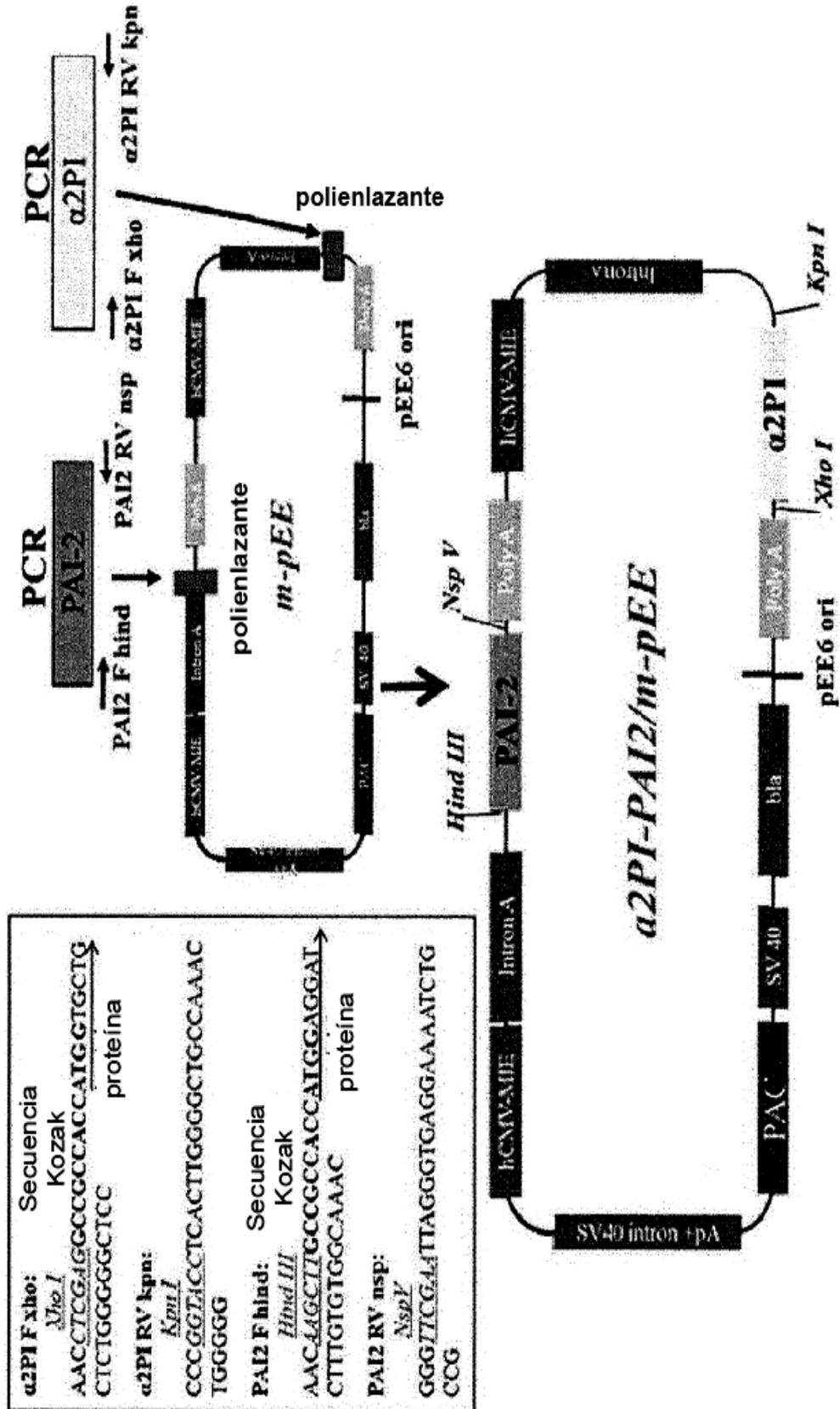


Fig. 7

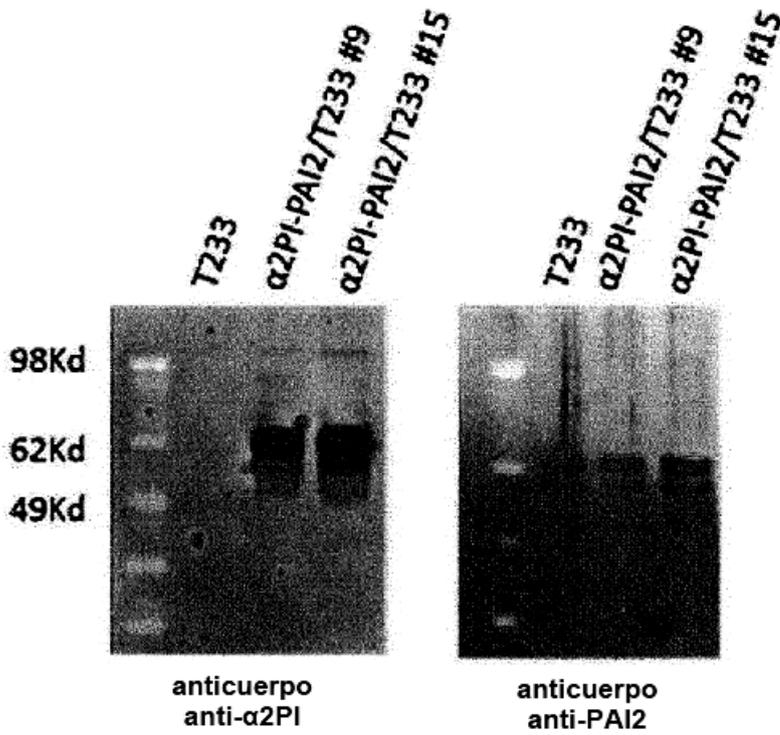


Fig. 8

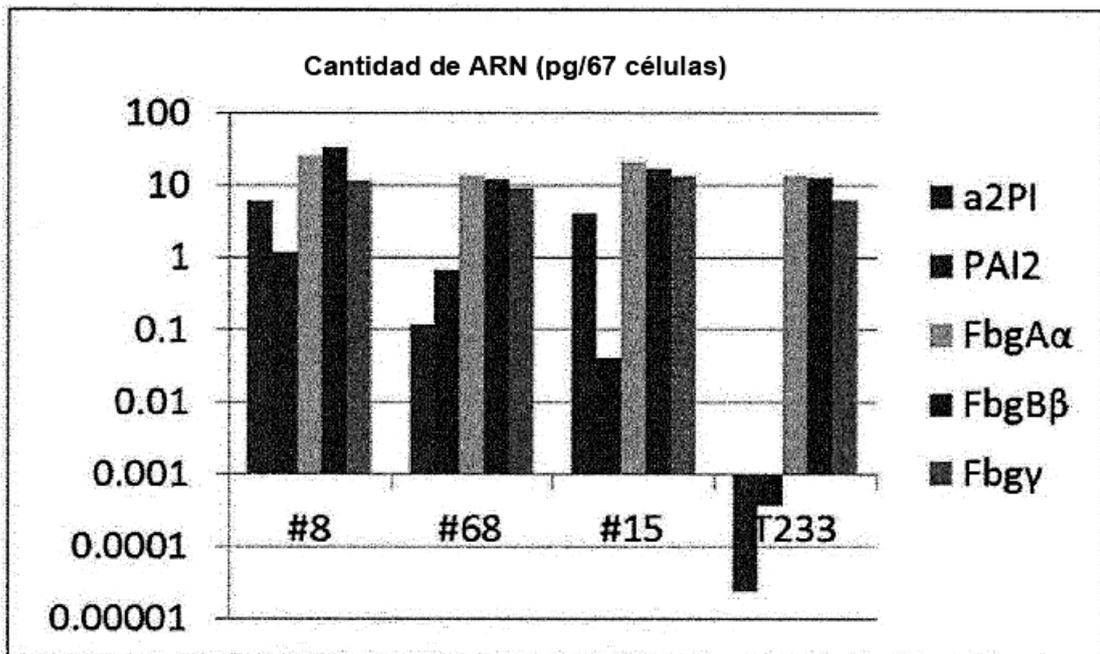


Fig. 9

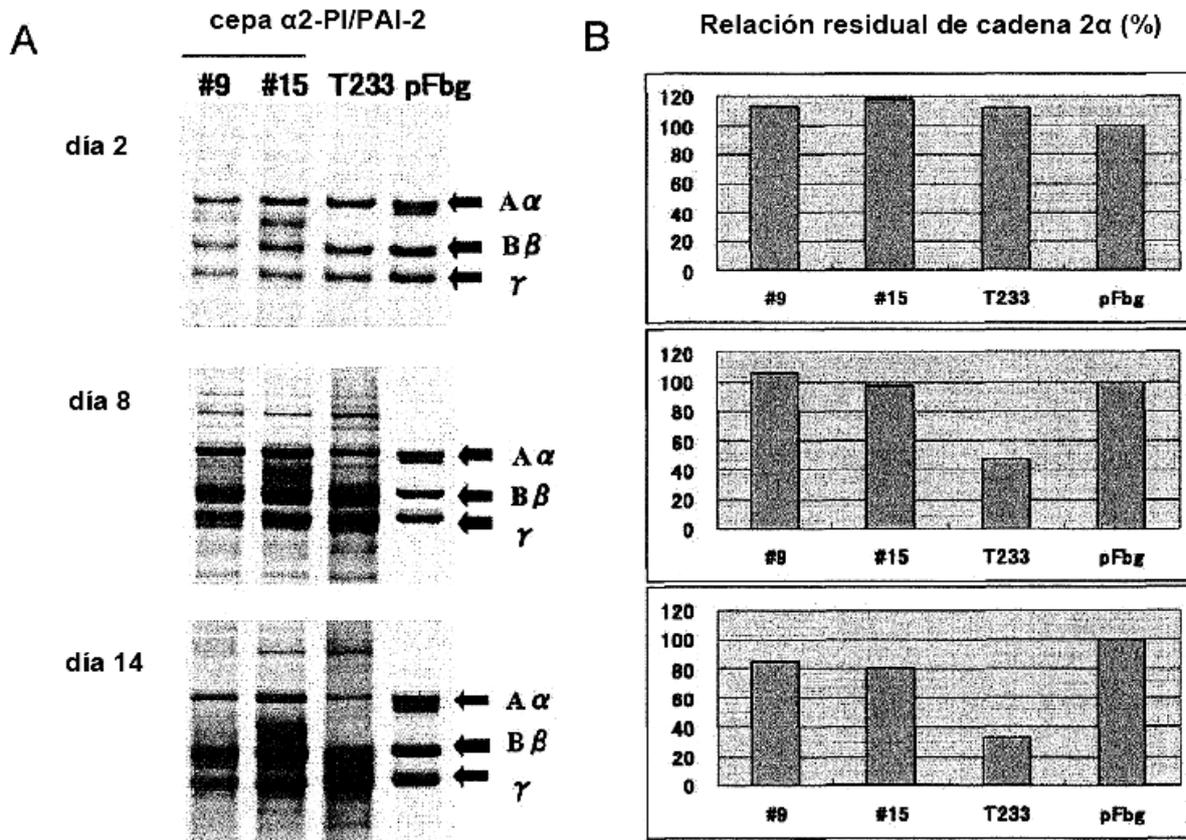


Fig. 10

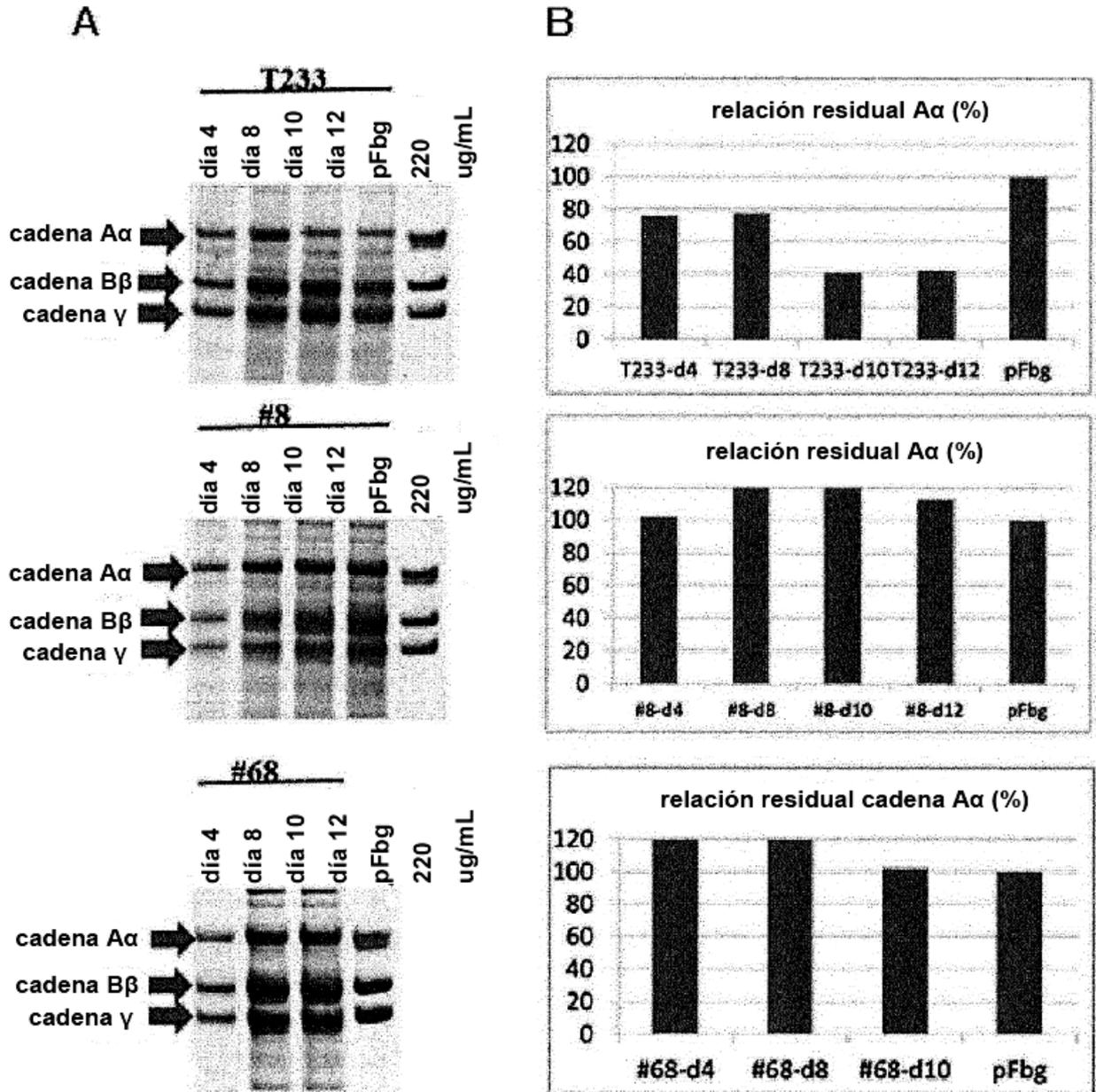


Fig. 11

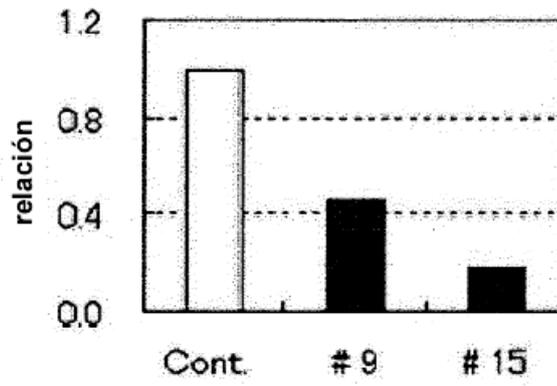


Fig. 12

concentración rFbg

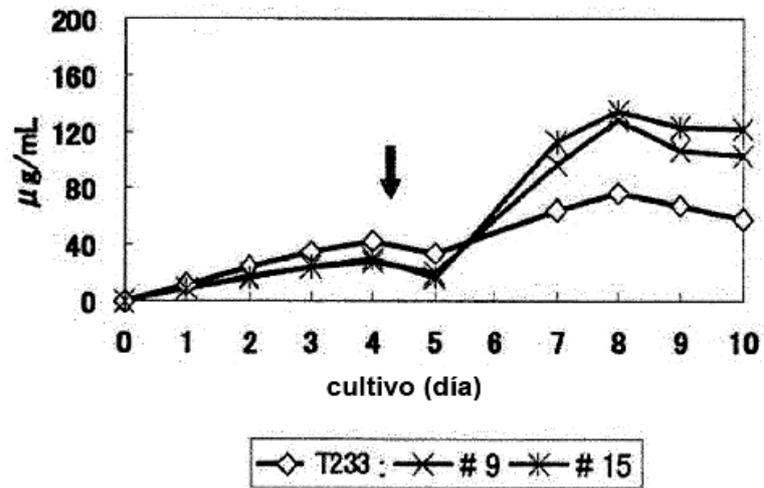


Fig. 13

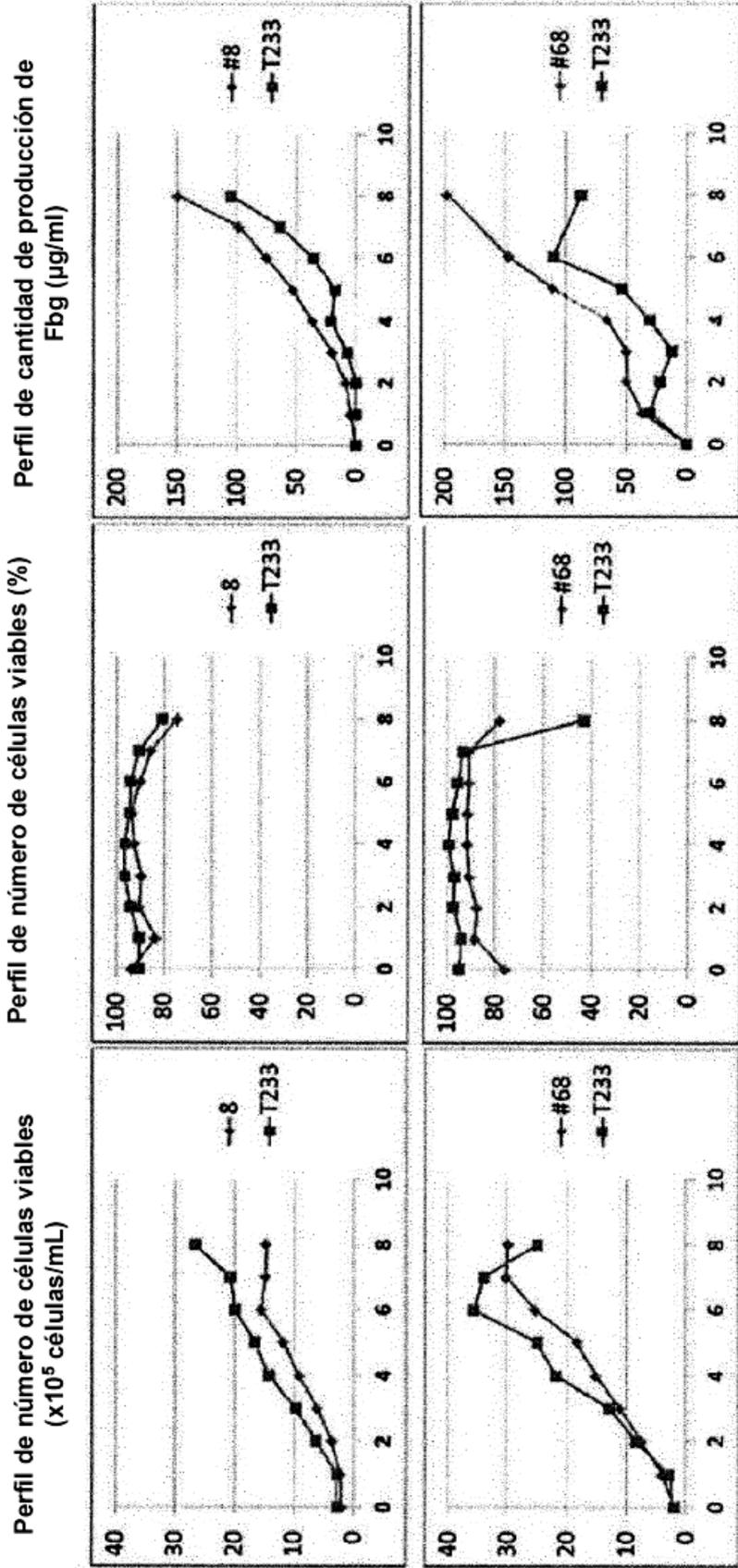
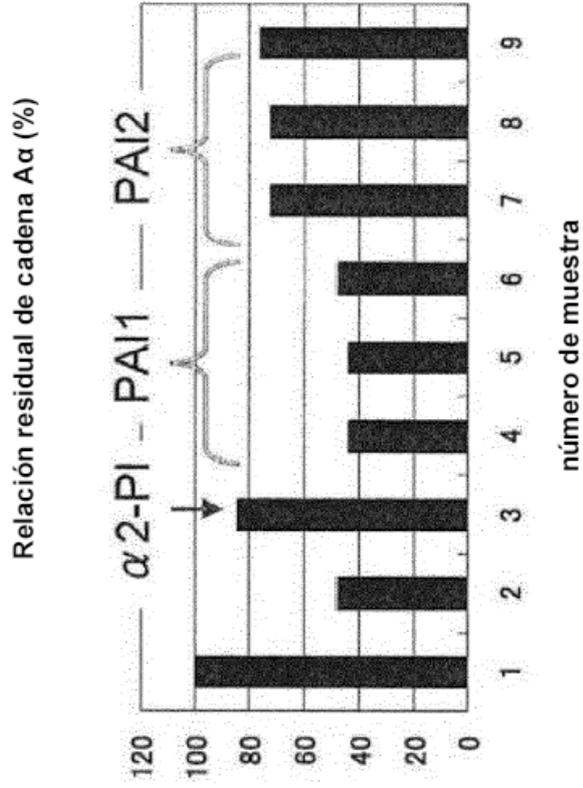


Fig. 14



Nº muestra	Proteína añadida	Cantidad de adición (µg)	Tiempo de reposo a 37°C (día)
1	ninguno	ninguno	0
2	ninguno	ninguno	3
3	α2PI	25	3
4	PAI1	1	3
5	PAI1	2	3
6	PAI1	4	3
7	PAI2	1	3
8	PAI2	2	3
9	PAI2	4	3