

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 883**

51 Int. Cl.:

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/EP2009/062843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10037855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09783703 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2352754**

54 Título: **Procesamiento mejorado de G-CSF humano recombinante**

30 Prioridad:

02.10.2008 EP 08165758

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

13.11.2019

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**SCHRÖDER, CAROLA;
CASADEMUNT, ELISABETH;
SÖHLEMANN, PETER y
LEHNERER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 730 883 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

Procesamiento mejorado de G-CSF humano recombinante

5 Antecedentes de la invención

El G-CSF es una glicoproteína de 20 kDa estabilizada por dos enlaces disulfuro intracatenarios y que contiene una sola fracción de hidrato de carbono enlazada al átomo de O. El G-CSF maduro tiene 174 aminoácidos. El G-CSF es sintetizado por células de la médula ósea, macrófagos y fibroblastos. Su función principal es ser un factor de crecimiento y diferenciación para los granulocitos neutrófilos y sus células precursoras. También se sabe en la técnica que el G-CSF activa los neutrófilos maduros. Además, estimula el crecimiento/la diferenciación de otras diversas células progenitoras hemopoyéticas (en sinergia con factores de crecimiento hemopoyéticos adicionales) y potencia la proliferación y la migración de células endoteliales. Clínicamente, el G-CSF se usa para el tratamiento de deficiencias en los niveles de granulocitos neutrófilos (neutropenia causada, por ejemplo, por cáncer/quimioterapia, SIDA o trasplante de médula ósea).

El documento WO 01/51510 A desvela una molécula de G-CSF madura humana mutada que tiene hasta 15 sustituciones de aminoácidos que aumentan la semivida biológica de la molécula y reducen los efectos secundarios.

20 Sumario de la invención

Con el fin de tratar a los pacientes de neutropenia con G-CSF idéntico al humano, se transfectaron células humanas con un plásmido codificante del G-CSF humano de tipo silvestre. Tras la purificación de G-CSF del sobrenadante de cultivo celular de clones seleccionados, se observó que una cantidad sustancial de G-CSF secretado estaba truncado en el extremo N-terminal por tres aminoácidos. Este truncamiento no era específico del clon, y no podía eliminarse mediante la modificación de las condiciones del cultivo celular.

Basándose en esta observación, se concluyó que el procesamiento de la proteína precursora del G-CSF en las células, en especial, en células HEK293F no era exacto. En detalle, se concluyó que el complejo de la señal peptidasa no solo se escindía en la posición esperada para retirar fisiológicamente el péptido señal, sino también en una posición más, conduciendo al truncamiento N-terminal.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que el truncamiento N-terminal se puede reducir si se usa un péptido señal modificado y un correspondiente precursor de G-CSF.

Por tanto, en una realización, la invención proporciona un precursor de G-CSF que comprende un péptido señal y un péptido G-CSF, en el que el péptido señal tiene la secuencia del péptido señal de tipo silvestre humano de la molécula de G-CSF/b humana (SEQ ID NO: 4) con una o más mutaciones, en la que las mutaciones se seleccionan de:

- eliminación de Glu29,
- inserción de Glu26,
- 45 - sustitución Lys11 Leu,
- sustitución His21Phe y
- sustitución Gln28Leu y

en la que tras el procesamiento, el truncamiento N-terminal se reduce en comparación con el precursor de G-CSF de tipo silvestre.

En una realización preferida, el precursor de G-CSF tiene al menos 2 o al menos 3 o al menos 4 o las cinco mutaciones mencionadas anteriormente.

55 Una realización adicional de la invención es un polinucleótido que codifica el precursor de G-CSF de la invención y un polinucleótido complementario al polinucleótido mencionado anteriormente.

Una realización adicional de la invención es un vector que comprende el polinucleótido de la invención y una célula transfectada que comprende bien el polinucleótido de la invención o el vector de la invención.

60 En una realización preferida, se trata de una célula eucariota, preferentemente, una célula humana, más preferentemente, una célula HEK293 y, más preferentemente, una HEK293F o una célula derivada de HEK293F.

En una realización, la transfección es transitoria y, en otra realización, la transfección es estable.

65 Una realización adicional de la invención es un método para expresar G-CSF que comprende las etapas de

- cultivar células transfectadas de la invención en un medio de cultivo adecuado y
- aislar el G-CSF del medio de cultivo.

5 En una realización preferida, el cultivo está a un pH dentro del intervalo de 6,8 a 7,5, preferentemente, de 7,1 a 7,3, más preferentemente aproximadamente 7,2. Preferentemente, el pH se controla durante el cultivo.

En una realización adicional, el cultivo está en presencia de insulina en el intervalo de 5 a 25 mg/ml, preferentemente, de 15 a 25 mg/ml, más preferentemente, de 15 a 20 mg/ml.

10 Sorprendentemente, con el péptido señal modificado de la invención, el G-CSF producido tiene una proporción de truncamiento muy pequeña, preferentemente, inferior al 5 % de las moléculas, más preferentemente, inferior al 1 % del G-CSF total. El 1 % se considera el límite de detección.

15 Preferentemente, el medio de cultivo está exento de suero.

El patrón de glicosilación del principal G-CSF es invariable, y la actividad es igual a la del G-CSF de tipo silvestre.

20 Por tanto, el método de la presente invención produce un G-CSF que es muy adecuado para aplicaciones farmacéuticas.

Descripción de las figuras

25 La Figura 1 muestra el análisis de G-CSF humano de tipo silvestre con péptido señal de tipo silvestre usando el programa TargetP.

La Figura 2 muestra el análisis de G-CSF humano de tipo silvestre con péptido señal SP9 usando el programa TargetP.

30 La Figura 3 muestra el análisis del G-CSF humano de tipo silvestre con el péptido señal SP10 usando el programa TargetP.

35 La Figura 4 muestra la expresión de la proteína G-CSF madura en células HEK293F usando construcciones que codifican proteínas precursoras con péptido señal de tipo silvestre (el nivel de expresión es del 100 %), con péptidos de señal SP9 o SP10, respectivamente.

40 La Figura 5 muestra el cromatograma de la secuenciación de aminoácidos del extremo amino (degradación de Edman) de G-CSF humano de tipo silvestre con péptido señal SP9. Las Figuras 5a a 5e corresponden a los restos 1 a 5. En la siguiente tabla, se presenta un resumen del análisis de la secuencia de aminoácidos.

La Figura 6 muestra el cromatograma de la secuenciación de aminoácidos del extremo amino (degradación de Edman) de G-CSF humano de tipo silvestre con péptido señal SP10. Las Figuras 6a a 6e corresponden a los restos 1 a 5. En la siguiente tabla, se presenta un resumen del análisis de la secuencia de aminoácidos.

45 La Figura 7 muestra el cromatograma de la secuenciación de aminoácidos del extremo amino (degradación de Edman) de GRANOCYTE. Las Figuras 7a a 7e corresponden a los restos 1 a 5. En la siguiente tabla, se presenta un resumen del análisis de la secuencia de aminoácidos.

50 La Figura 8 muestra el cromatograma de la secuenciación de aminoácidos del extremo amino (degradación de Edman) de G-CSF humano de tipo silvestre con péptido señal de tipo silvestre. Las Figuras 8a a 8e corresponden a los restos 1 a 5). En la siguiente tabla, se presenta un resumen del análisis de la secuencia de aminoácidos.

55 La Figura 9 muestra la comparación de la proporción de G-CSF de longitud completa para 2 clones ilustrativos que proceden del aislamiento clónico de una transfección estable con G-CSF SP9. La fracción residual - no de longitud completa - comprende principalmente el G-CSF truncado N-terminalmente por 3 aminoácidos. La línea a una proporción de G-CSF de longitud completa del 99 % se correlaciona con el truncamiento N-terminal de ≤ 1 %, que es el límite de detección inferior del análisis.

60 La Figura 10 muestra la comparación de la proporción de G-CSF de longitud completa en un ejemplo de clon 1 para diferentes pH de los cultivos en cultivos de reactor de tanque agitado. El clon 1 procede del aislamiento del clon de una transfección estable con el vector G-CSF SP9. La fracción residual - no de longitud completa - comprende principalmente el G-CSF truncado N-terminalmente por 3 aminoácidos. La proporción de G-CSF de longitud completa del cultivo de referencia para el clon 1 en matraces de agitación (sin control del pH) se muestra en la primera barra, en gris. La línea a una proporción de G-CSF de longitud completa del 99 % se correlaciona con el truncamiento N-terminal de ≤ 1 %, que es el límite de detección inferior del análisis.

La Figura 11 muestra la comparación de la proporción de G-CSF de longitud completa en un ejemplo de clon 2 para diferentes pH de los cultivos en cultivos de reactor de tanque agitado. El clon 2 procede del aislamiento del clon de una transfección estable con el vector G-CSF SP9. La fracción residual - no de longitud completa - comprende principalmente el G-CSF truncado N-terminalmente por 3 aminoácidos. La proporción de G-CSF de longitud completa del cultivo de referencia para el clon 2 en matraces de agitación (sin control del pH) se muestra en la primera barra, en gris. La línea a una proporción de G-CSF de longitud completa del 99 % se correlaciona con el truncamiento N-terminal de ≤ 1 %, que es el límite de detección inferior del análisis.

La Figura 12 muestra la comparación de la proporción de G-CSF de longitud completa en un ejemplo de clon 2 para diferentes concentraciones de insulina en el medio de cultivo. El clon 2 procede del aislamiento del clon de una transfección estable con el vector G-CSF SP9. La fracción residual - no de longitud completa - comprende principalmente el G-CSF truncado N-terminalmente por 3 aminoácidos. La línea a una proporción de G-CSF de longitud completa del 99 % se correlaciona con el truncamiento N-terminal de ≤ 1 %, que es el límite de detección inferior del análisis.

La Figura 13 muestra la comparación de la proporción de G-CSF de longitud completa para diferentes días de cosecha en el ejemplo del clon 2 cultivado en un modo de densidad de alta densidad celular a gran escala, con la aplicación de 15 mg/l de insulina al medio de cultivo, sin la aplicación de un control del pH. El clon 2 procede del aislamiento del clon de una transfección estable con el vector G-CSF SP9. La fracción residual - no de longitud completa - comprende principalmente el G-CSF truncado N-terminalmente por 3 aminoácidos. La línea a una proporción de G-CSF de longitud completa del 99 % se correlaciona con el truncamiento N-terminal de ≤ 1 %, que es el límite de detección inferior del análisis.

Ejemplo 1

Optimización del péptido precursor de G-CSF para el procesamiento correcto de proteínas

El ADNc de la isoforma b del G-CSF humano de tipo silvestre fue publicado en la base de datos GenBank (NM_172219). Esencialmente, cualquier proteína precursora de G-CSF que tenga cualquier secuencia derivada de NM_172219 es útil para la modificación de la secuencia del péptido señal de la presente invención. En una realización ilustrativa, la proteína precursora tiene la secuencia presentada en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (GenBank NP_757373):

**MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDG
AALQEKLKATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGL
LQALEGISPELGPTLDTLQLDVAADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRR
AGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHAQP**

La proteína precursora de G-CSF de tipo silvestre sin procesar (SEQ ID NO: 1) comprende 204 aminoácidos que incluyen un péptido señal de 30 aminoácidos. Se publica que el procesamiento tiene lugar entre los restos Ala30 y Thr31 (GenBank NP_757373).

La literatura reciente describe la secuencia consenso del péptido señal eucariota y la función del complejo de la peptidasa señal (Rapoport, 2007, *Nature* 450 (29), 663 - 669; Tuteja, 2005, *Arch Biochem Biophys* 441, 107-111; Dalbey *et al.*, 1997, *Protein Science* 6, 1129-1138).

Se comparó la secuencia de aminoácidos del péptido señal de G-CSF con las características propuestas del péptido señal de consenso descrito anteriormente. Se encontró que varios restos de aminoácido no se ajustan al modelo propuesto. En detalle, el motivo Ala-X-Ala propuesto en el extremo C-terminal del péptido señal, que se considera crucial para la exactitud de la escisión, se ve interrumpido por un aminoácido cargado (Glu29) en el péptido precursor de G-CSF. Por otra parte, los restos cargados Lys11 e His21 están ubicados en la región hidrófoba del péptido señal y, por lo tanto, no están en línea con los requisitos del modelo.

El péptido señal de G-CSF de tipo silvestre se analizó *in silico* con el programa informático SignalP y TargetP (www.cbs.dtu.dk/services; Emanuelsson *et al.*, 2007, *Nature Protocols* 2, 953-971). El programa informático mostró que el procesamiento se predice en el extremo N de G-CSF correcto (Thr31), pero además, en otros varios sitios (Fig. 1). El procesamiento en el sitio de truncamiento (Gly34), sin embargo, no fue predicho por este programa.

Ejemplo 2

Se modelizó *in silico* el péptido señal de G-CSF de tipo silvestre mediante cambios mínimos en su secuencia de

aminoácidos con respecto al modelo de la peptidasa señal hipotética indicado anteriormente. La posición de escisión resultante se analizó nuevamente usando el programa informático SignalP y TargetP. Pocos modelos con diseño *in silico*, por ejemplo, los denominados G-CSF SP9 y G-CSF SP10, produjeron la predicción de solo la posición correcta (Thr31) para el procesamiento de G-CSF, que se tomó como una sugerencia para un péptido señal optimizado (véase la Fig. 2 y la Fig. 3 para un análisis *in silico* de los sitios de escisión de G-CSF SP9 y G-CSF de SP10, respectivamente). Varias de dichas construcciones fueron seleccionadas para la síntesis de genes (GeneArt, Regensburg, Alemania). Los genes sintéticos que codifican los péptidos G-CSF SP9 y G-CSF SP10, respectivamente, se clonaron en un vector de expresión eucariota y se usaron para la transfección de células HEK293F.

Ejemplo 3

Proteína precursora de G-CSF SP9

La proteína precursora de G-CSF SP9 procede de la secuencia de péptido señal de la proteína precursora de G-CSF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En detalle, se eliminó el ácido glutámico de la posición 29 (Glu29) del péptido señal de tipo silvestre y se insertó en la posición 26 (Glu26). En una realización ilustrativa, la proteína precursora de G-CSF SP9 tiene la secuencia presentada en el presente documento como SEQ ID NO: 2:

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWETVQATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDG
 AALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLFYQGL
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRR
 AGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP

Ejemplo 4

Proteína precursora de G-CSF SP10

La proteína precursora de G-CSF SP10 procede de la secuencia de péptido señal de G-CSF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En detalle, mediante la sustitución de la leucina por lisina en la posición 11 (Lys11Leu), de la fenilalanina por histidina 21 (His21Phe) y de la leucina por glutamina 28 (Gln28Leu). En una realización ilustrativa, el péptido G-CSF SP10 tiene la secuencia presentada en el presente documento como SEQ ID NO: 3:

MAGPATQSPMLLMALQLLLWFSALWTVLEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGA
 ALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLFYQGLL
 QALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRR
 GGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP

Es importante señalar que, a pesar de los cambios realizados en el péptido señal, el péptido G-CSF maduro sigue siendo de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, restos 31-204).

Ejemplo 5

Transfecciones transitorias con vectores de expresión codificantes de G-CSF SP9 y G-CSF SP10

Se transfectaron transitoriamente células HEK293F con vectores de expresión codificantes de G-CSF SP9 o G-CSF SP10, respectivamente. Los sobrenadantes se recogieron después de tres días. La secreción de G-CSF se midió mediante ELISA. Los datos mostraron niveles de expresión comparables a G-CSF con péptido señal de tipo silvestre o incluso un nivel de expresión superior (Figura 4).

El G-CSF se purificó a alta pureza. La purificación de los dos productos, G-CSF SP9 y G-CSF SP10, respectivamente, se realizó como G-CSF de tipo silvestre sin ninguna modificación del protocolo.

Ejemplo 6

Las secuencias del extremo amino de G-CSF de tipo silvestre, el producto comercial GRANOCYTE (CA1341389 de

la patente de Chugai, G-CSF producido en células CHO), G-CSF SP9 y G-CSF SP10 se determinaron mediante la degradación de Edman (TopLab, Martinsried, Alemania). Sorprendentemente, los datos de los dos productos de expresión G-CSF SP9 y G-CSF SP10 solo revelaron el extremo N correcto sin ningún truncamiento (Figura 5 y Figura 6). Se observó lo mismo para GRANOCYTE (Figura 7). Por el contrario, se encontró el truncamiento para G-CSF con péptido señal de tipo silvestre (Figura 8) - y para otras diversas construcciones diseñadas, aunque solo se predice un sitio de escisión mediante SignalP o TargetP *in silico* (no mostrado).

Ejemplo 7

La actividad de G-CSF SP9 y G-CSF SP10 se midió en un ensayo de proliferación celular y se comparó con GRANOCYTE. La actividad de proliferación celular de G-CSF SP9 y G-CSF SP10 fue superior a la de Granocyte.

Ejemplo 8

La glicosilación de G-CSF SP9 y G-CSF SP10 se determinó mediante el análisis de identificación genética en masa de péptidos MALDI-TOF tras la digestión con GluC. El espectro del reflector no mostró ninguna diferencia de G-CSF SP9 o G-CSF SP10 con respecto al G-CSF de tipo silvestre producido en las células HEK293F.

Ejemplo 9

Evaluación de clones resultantes de una transfección estable con vector de expresión codificante de G-CSF SP9

Se transfectaron establemente células HEK293F con el vector de expresión codificante de G-CSF SP9. Se aislaron clones homogéneos tras la estabilización de la transfección. Se analizaron los sobrenadantes de clones seleccionados para diferentes escalas de fermentación. Para este G-CSF, se purificó a alta pureza de los sobrenadantes recogidos y se evaluó con respecto a su secuencia del extremo amino, patrón de glicosilación y actividad.

Se observó que, aunque el truncamiento N-terminal en 3 aminoácidos no era observable para el sobrenadante resultante de G-CSF SP9 analizado de una combinación de transfecciones transitorias, el truncamiento de 3 aminoácidos podría no haberse suprimido por completo para algunos clones. Este efecto dependía de los clones y, además, dependía de la escala de cultivo y de las condiciones de cultivo.

La dependencia en los clones (Figura 9) sugirió que la modificación de la secuencia del péptido señal de G-CSF dando lugar al vector de G-CSF SP9 apoya la escisión correcta del péptido señal en un grado mayor; sin embargo, un metabolismo específico del clon todavía influye en una escisión correcta del 100 %.

El enfoque principal para influir en el metabolismo específico del clon es la aplicación de condiciones de cultivo optimizadas.

Se evaluó la influencia del pH del cultivo en la escisión correcta de la secuencia del péptido señal de G-CSF para 2 clones ilustrativos. Ambos clones se cultivaron en reactores de tanque agitado a escala de laboratorio, cada uno con valores de pH definidos de 6,6; 6,8; 7,0 y 7,2. Los sobrenadantes que contenían G-CSF se purificaron a alta pureza y se evaluaron con respecto a la secuencia de su extremo amino (Figura 10 y Figura 11). Para ambos clones ilustrativos, se observó que un procesamiento correcto de la secuencia del péptido señal, que da lugar a una proporción de G-CSF de longitud completa de > 99 %, se puede lograr controlando el pH del cultivo celular de los clones de G-CSF a pH 7,2. El valor de > 99 % corresponde al límite inferior de detección del método de secuenciación del 1 %.

Ejemplo 10

Se realizaron cultivos en matraz de agitación sin control del pH y con variación de la concentración de insulina en los medios de cultivo en el ejemplo de un clon. Las concentraciones de insulina se variaron en un intervalo de entre 5 mg/l de insulina y 20 mg/l de insulina. Los sobrenadantes que contenían G-CSF se purificaron a alta pureza y se evaluaron con respecto a la secuencia de su extremo amino (Figura 12). En el ejemplo del clon evaluado, se observó que la optimización de la concentración de insulina en el medio de cultivo en un intervalo de entre 15 y 20 mg/l de insulina para el caso de las condiciones de cultivo no controladas por el pH dio lugar a un procesamiento correcto de la secuencia del péptido señal.

Se realizó un cultivo de alta densidad celular a gran escala usando el modo de perfusión para el suministro de medio en el ejemplo de un clon. El pH del cultivo no se controló, variando en un intervalo de 6,8 a 7,2 durante el cultivo. Se ajustó la concentración de insulina en el medio de cultivo a la concentración optimizada de 15 mg/l de insulina. Los sobrenadantes que contenían G-CSF de 4 puntos de tiempo de cultivo seleccionados el día 6, 7, 17 y 21 de cultivo se purificaron a alta pureza y se evaluaron con respecto a la secuencia de su extremo amino (Figura 13). Se logró un procesamiento correcto de la secuencia del péptido señal, dando lugar a un G-CSF de longitud completa > 99 %, para todos los sobrenadantes analizados, independientemente de la densidad celular y de la productividad del G-

CSF. La aplicación de una concentración de insulina optimizada de 15 mg/l es, por lo tanto, eficaz para evitar el truncamiento del extremo N en cultivos de alta densidad celular a gran escala.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Octogene GmbH
- <120> Procesamiento mejorado de G-CSF humano recombinante
- 10 <130> 090651wo
- <160> 4
- <170 PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 204
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1

ES 2 730 883 T3

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
 35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
 50 55 60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
 65 70 75 80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
 85 90 95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
 100 105 110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu
 115 120 125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala
 130 135 140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
 165 170 175

ES 2 730 883 T3

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 195 200

5 <210> 2
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Glu Thr Val Gln Ala Thr Pro
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
 35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
 50 55 60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
 65 70 75 80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
 85 90 95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
 100 105 110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu
 115 120 125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala
 130 135 140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
 165 170 175

ES 2 730 883 T3

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
180 185 190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195 200

5 <210> 3
<211> 204
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

ES 2 730 883 T3

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Leu Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp Phe Ser Ala Leu Trp Thr Val Leu Glu Ala Thr Pro
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
 35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
 50 55 60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
 65 70 75 80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
 85 90 95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
 100 105 110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu
 115 120 125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala
 130 135 140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
 165 170 175

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 195 200

5 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un precursor de G-CSF que comprende un péptido señal y un péptido G-CSF, en el que el péptido señal tiene la secuencia del péptido señal de tipo silvestre humano de la molécula de G-CSF/b humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 con una o más mutaciones, en la que las mutaciones se seleccionan de:
- eliminación de Glu29,
 - inserción de Glu26,
 - 10 - sustitución Lys11Leu,
 - sustitución His21Phe y
 - sustitución Gln28Leu y
- 15 en la que tras el procesamiento, el truncamiento N-terminal se reduce en comparación con el precursor de G-CSF de tipo silvestre.
2. El precursor de G-CSF de la reivindicación 1, que tiene al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro o cinco mutaciones de la reivindicación 1.
- 20 3. Un polinucleótido codificante de un precursor de G-CSF de la reivindicación 1 o 2.
4. Un polinucleótido complementario al polinucleótido de la reivindicación 3.
- 25 5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3 o 4.
6. Una célula transfectada que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3 o 4, o el vector de la reivindicación 5.
- 30 7. La célula transfectada de la reivindicación 6, siendo la célula una célula eucariota, preferentemente, una célula humana, más preferentemente, una célula HEK293 y, más preferentemente, una célula HEK293F.
8. La célula transfectada de la reivindicación 6 o 7, en la que la transfección es transitoria.
- 35 9. La célula transfectada de la reivindicación 6 o 7, en la que la transfección es estable.
10. Un método para la expresión de G-CSF que comprende las etapas de
- cultivar células transfectadas de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en un medio de cultivo adecuado;
 - aislar el G-CSF del medio de cultivo.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en el que el cultivo está a un pH dentro del intervalo de 6,8 a 7,5, preferentemente, de 7,1 a 7,3.
- 45 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que el cultivo es en presencia de insulina en el intervalo de 5 a 25 mg/ml, preferentemente, de 15 a 25 mg/ml, más preferentemente, de 15 a 20 mg/ml.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el medio de cultivo está exento de suero.

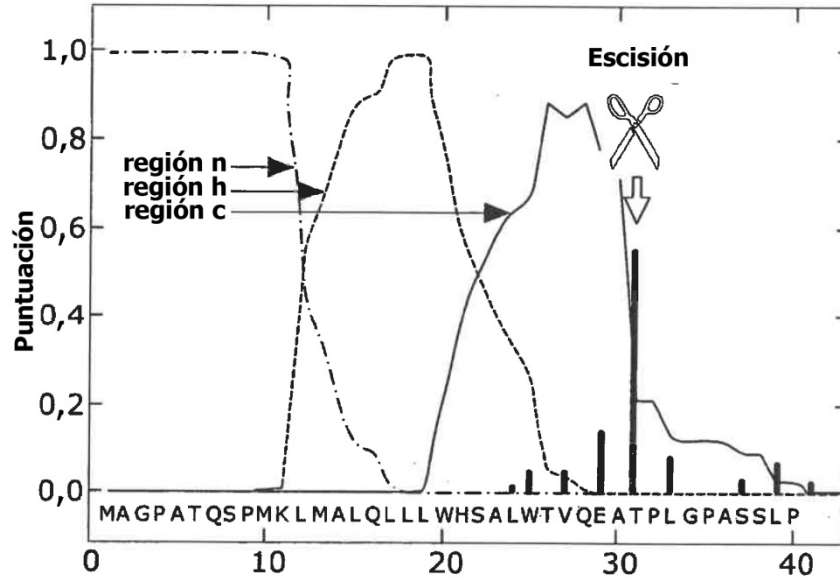


Fig.1

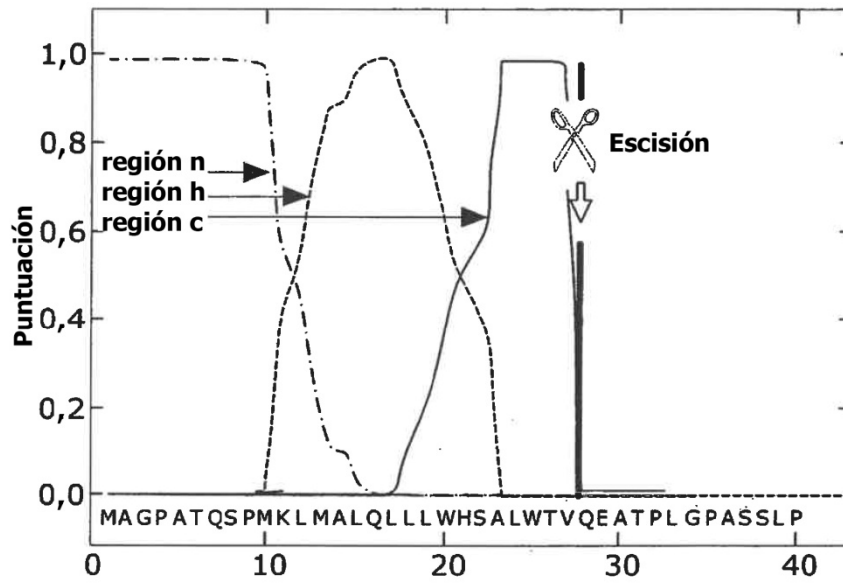


Fig.2

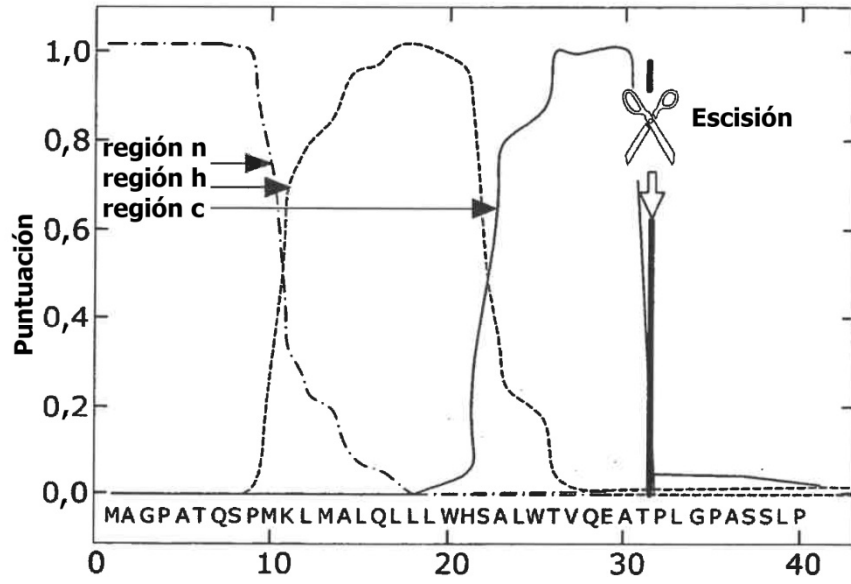


Fig.3

Figura 4

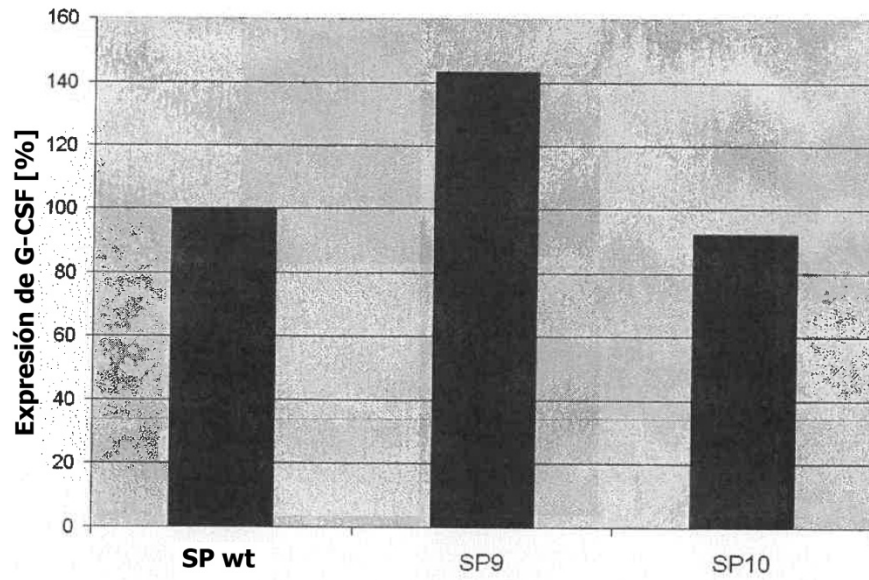
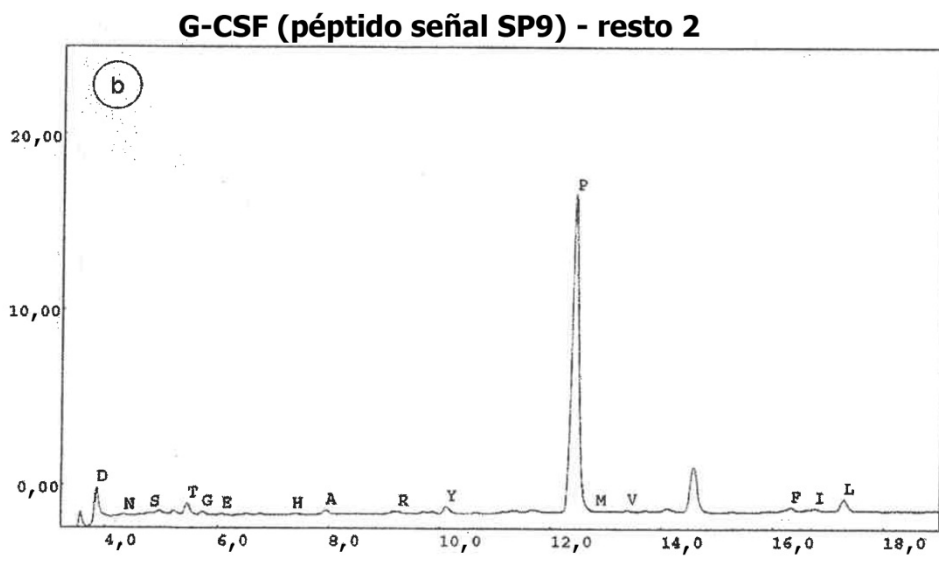
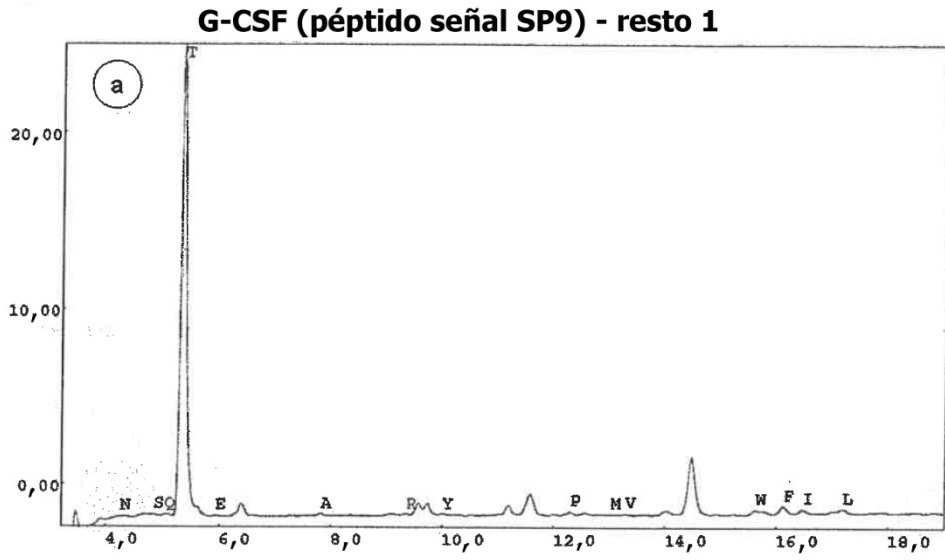
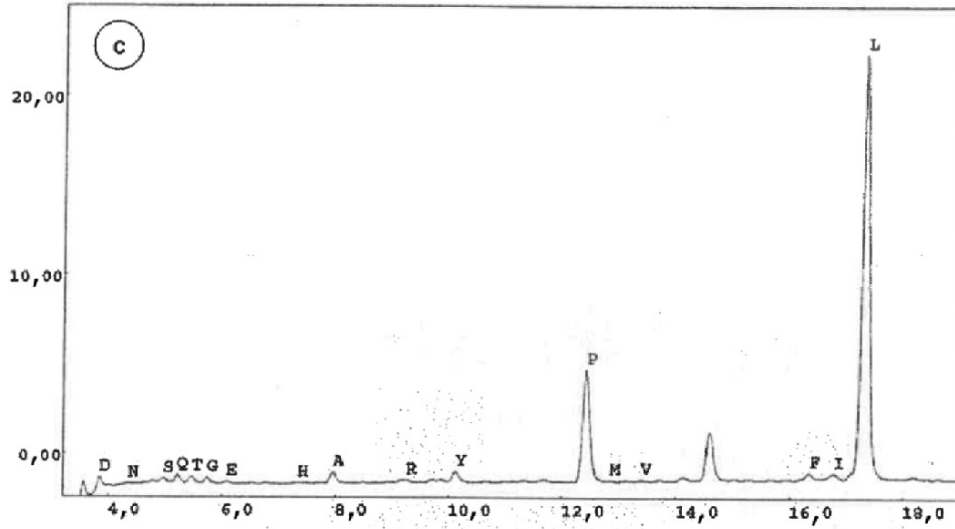


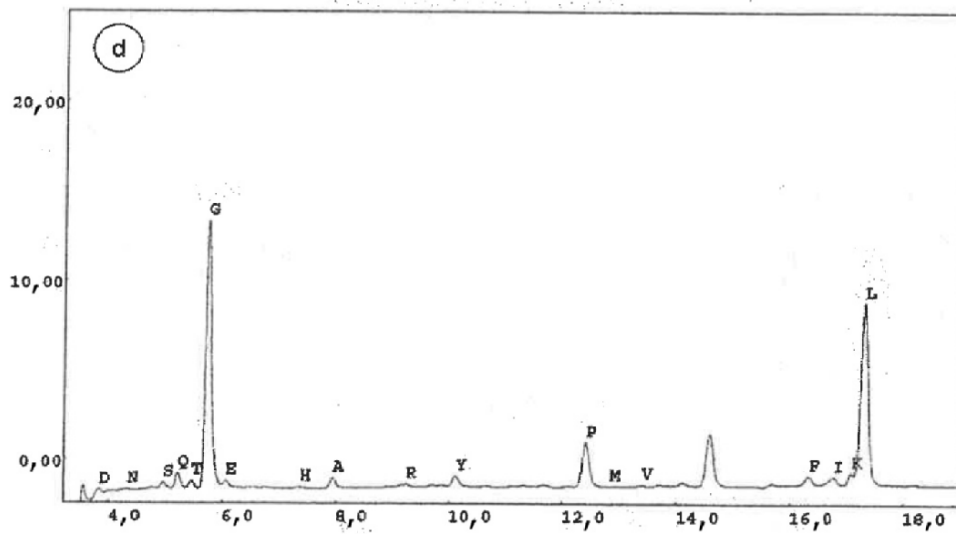
Figura 5



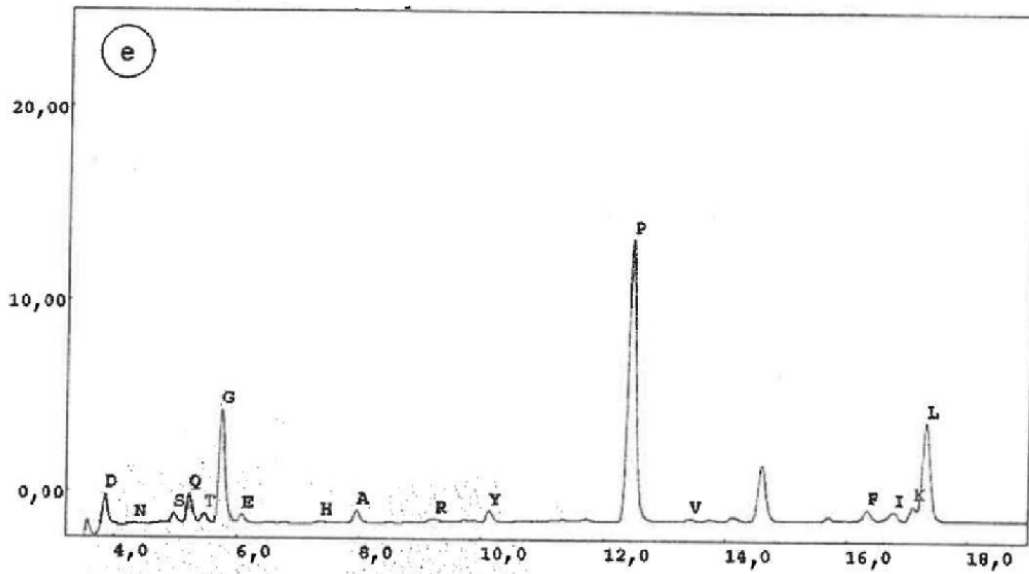
G-CFS (péptido señal SP9) - resto 3



G-CFS (péptido señal SP9) - resto 4

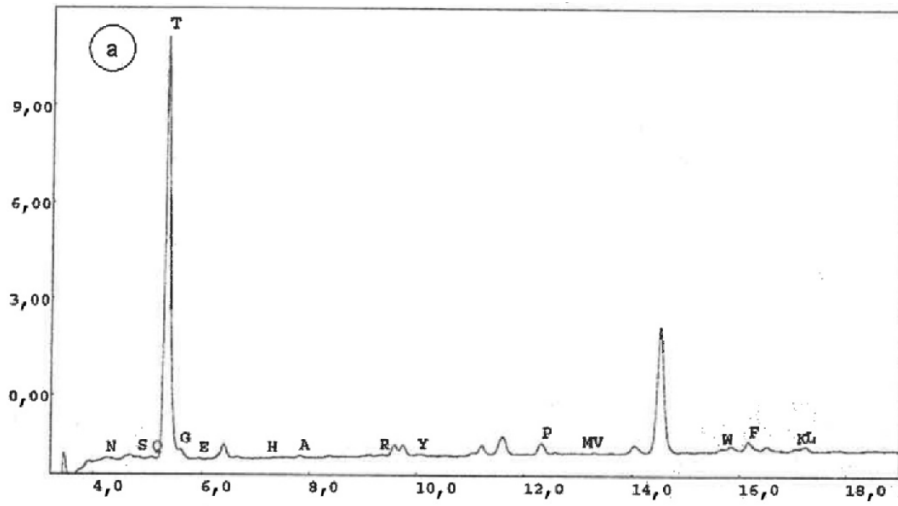


G-CFS (péptido señal SP9) - resto 5

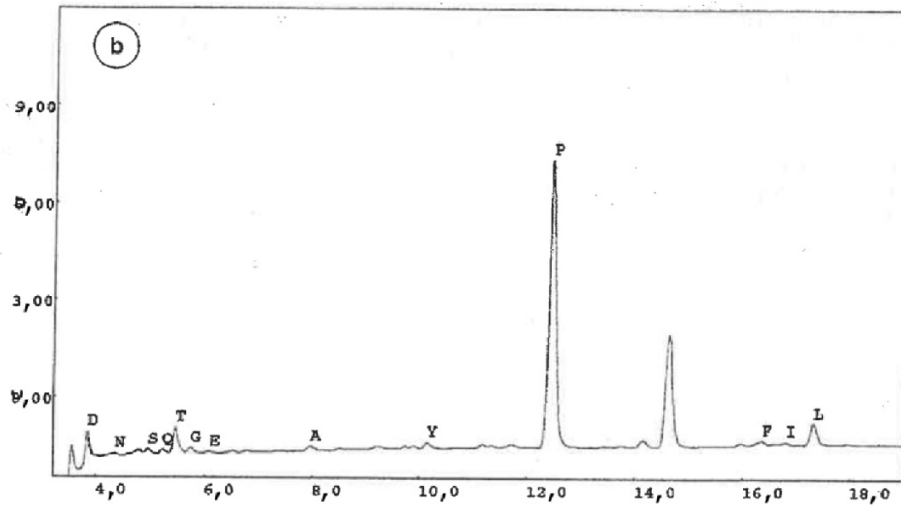


	Secuencia principal	Secuencias minoritarias
1	T	
2	P	DLY
3	L	AQ
4	G	QK
5	P	DQ

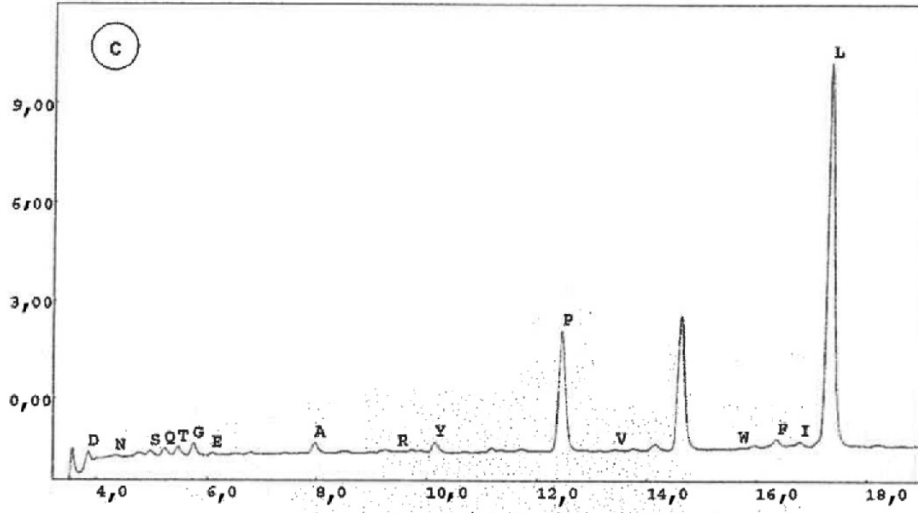
Figura 6 G-CFS (péptido señal SP10) - resto 1



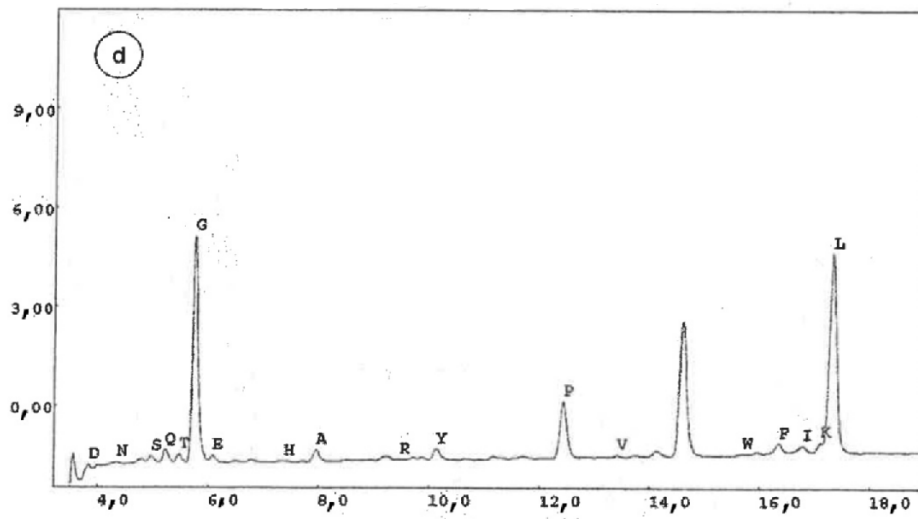
G-CFS (péptido señal SP10) - resto 2



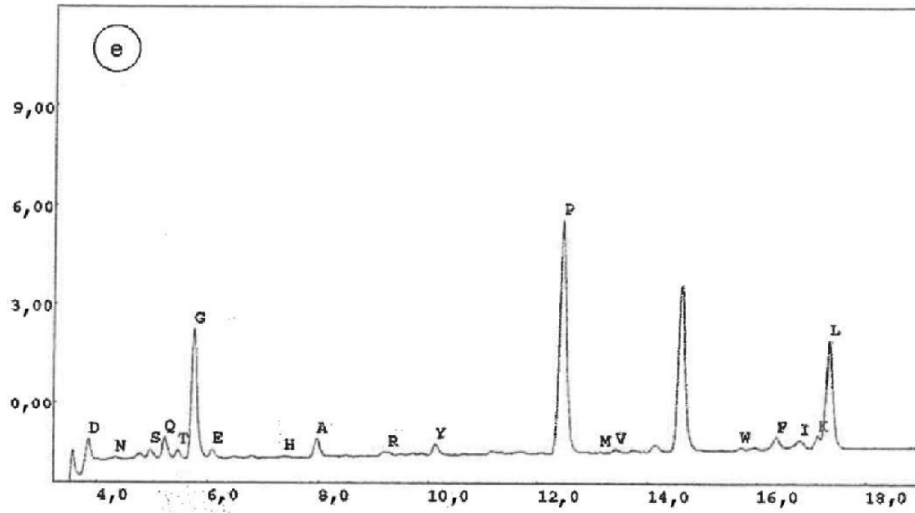
G-CFS (péptido señal SP10) - resto 3



G-CFS (péptido señal SP10) - resto 4



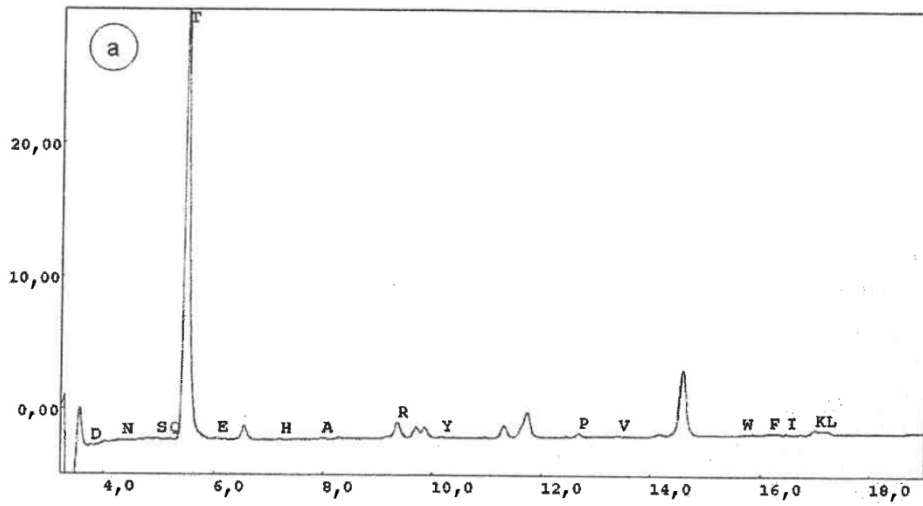
G-CFS (péptido señal SP10) - resto 5



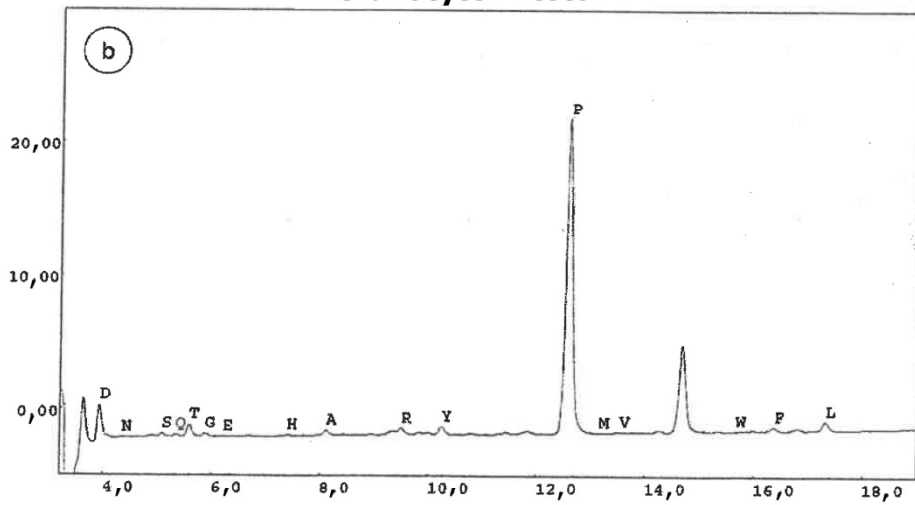
	Secuencia principal	Secuencias minoritarias
1	T	
2	P	DLY
3	L	GAQ
4	G	QK
5	P	DQA

Figura 7

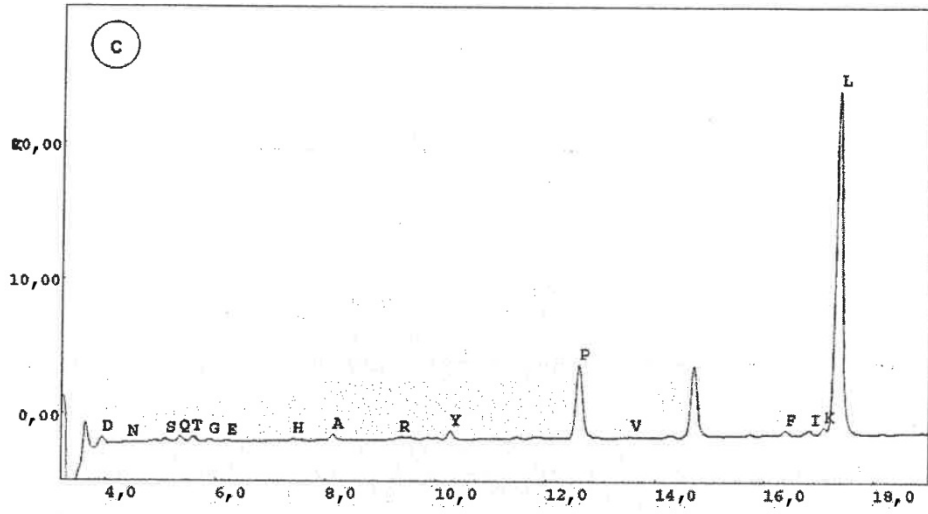
Granocyte - resto 1



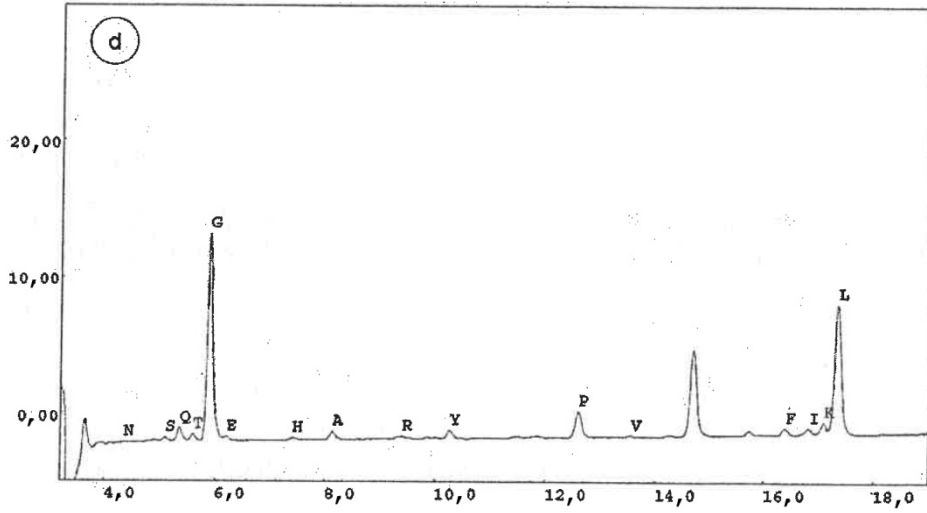
Granocyte - resto 2



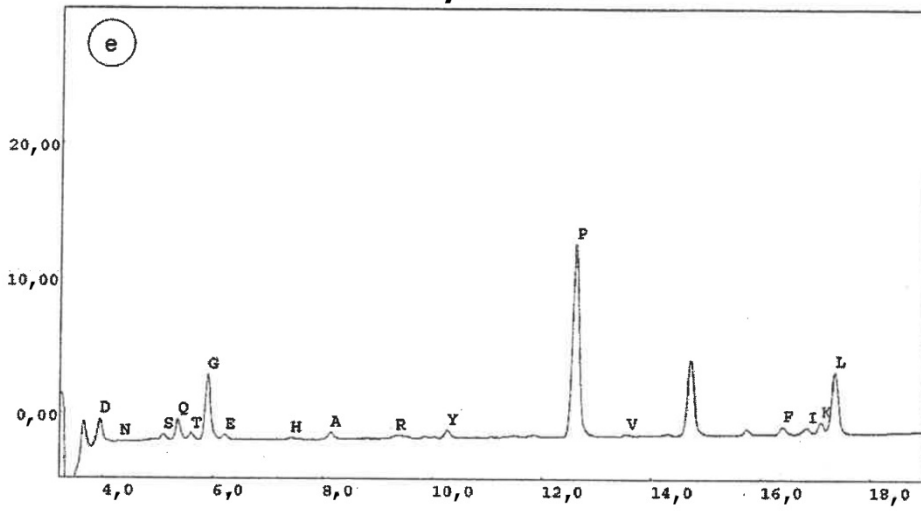
Granocyte - resto 3



Granocyte - resto 4



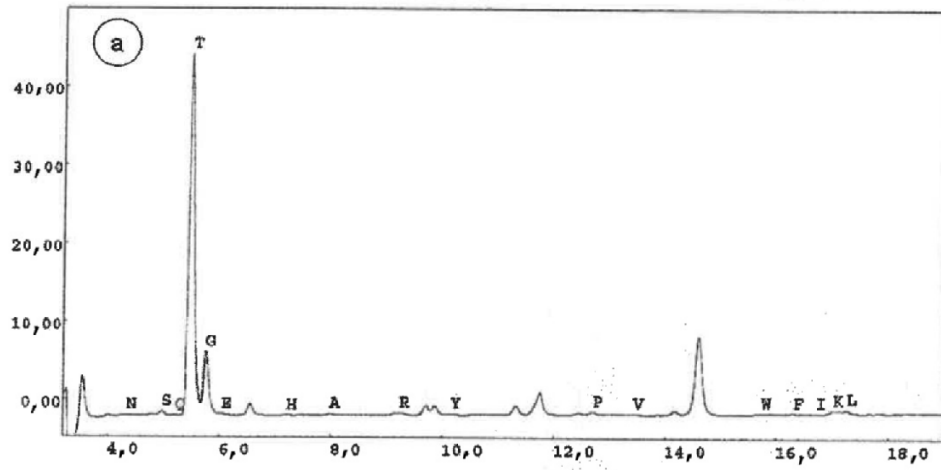
Granocyte – resto 5



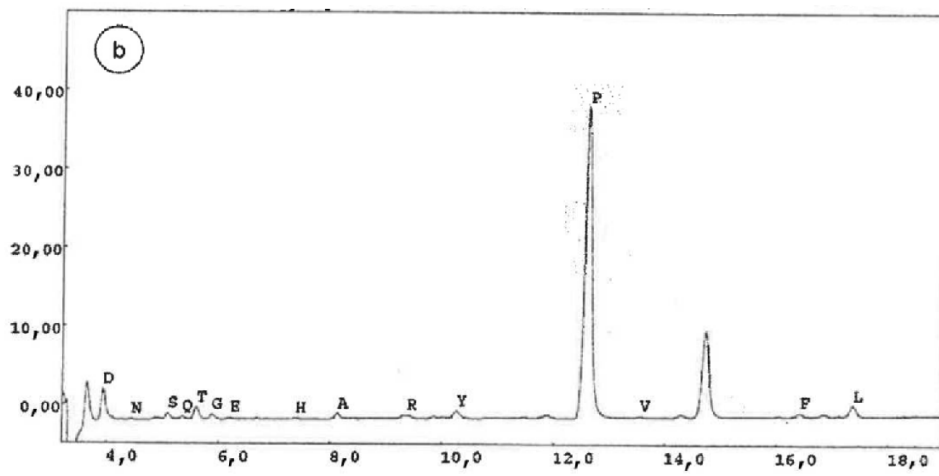
	Secuencia principal	Secuencias minoritarias
1	T	
2	P	
3	L	
4	G	
5	P	

Figura 8

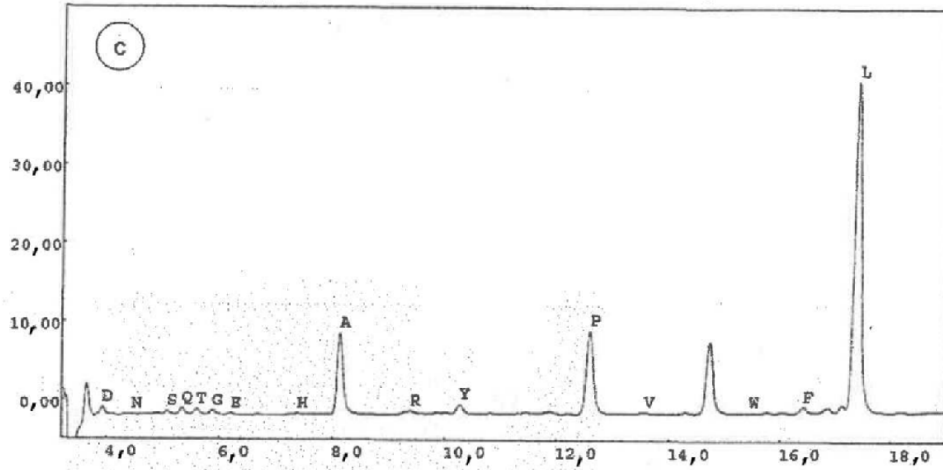
G-CSF péptido señal de tipo silvestre) - resto 1



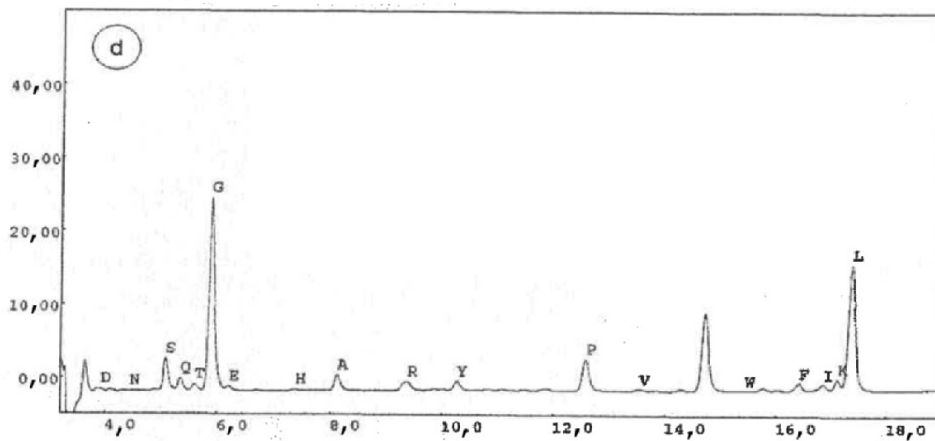
G-CSF péptido señal de tipo silvestre) - resto 2



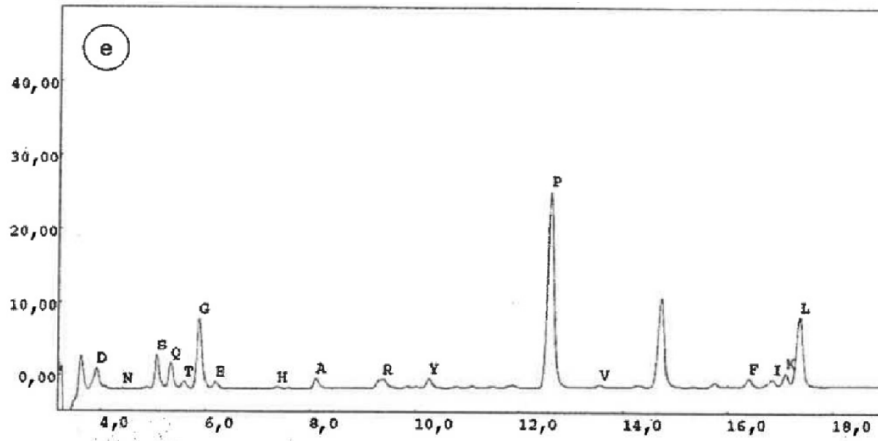
G-CSF péptido señal de tipo silvestre) - resto 3



G-CSF péptido señal de tipo silvestre) - resto 4



G-CSF péptido señal de tipo silvestre) - resto 5



	Secuencia principal	Secuencias minoritarias
1	T	G
2	P	P DL
3	L	A
4	G	S Q
5	P	S DQ

Figura 9

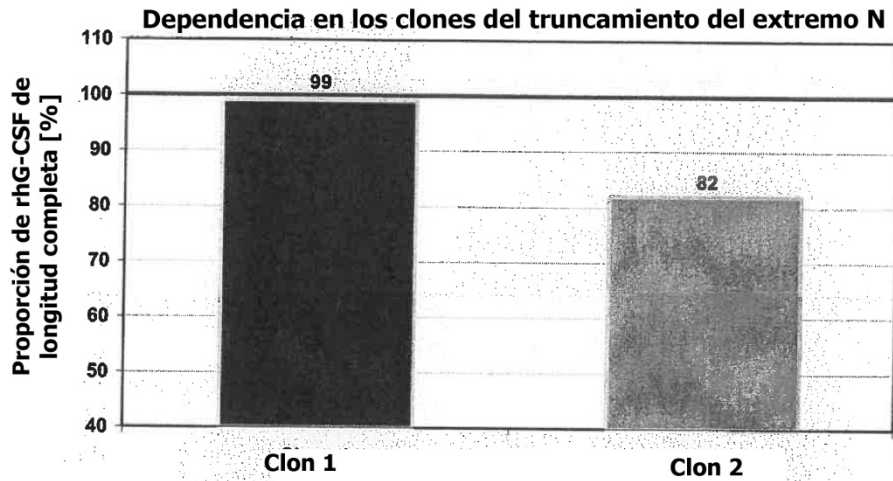


Figura 10

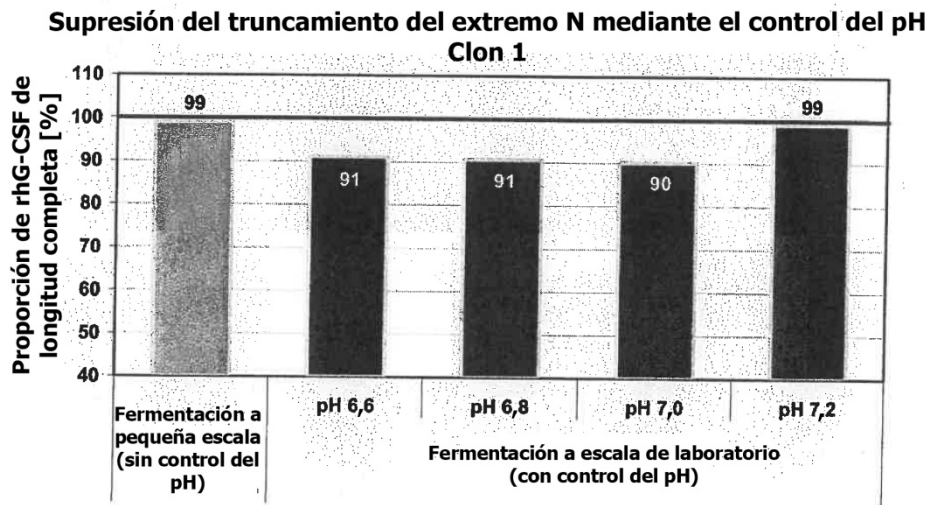


Figura 11

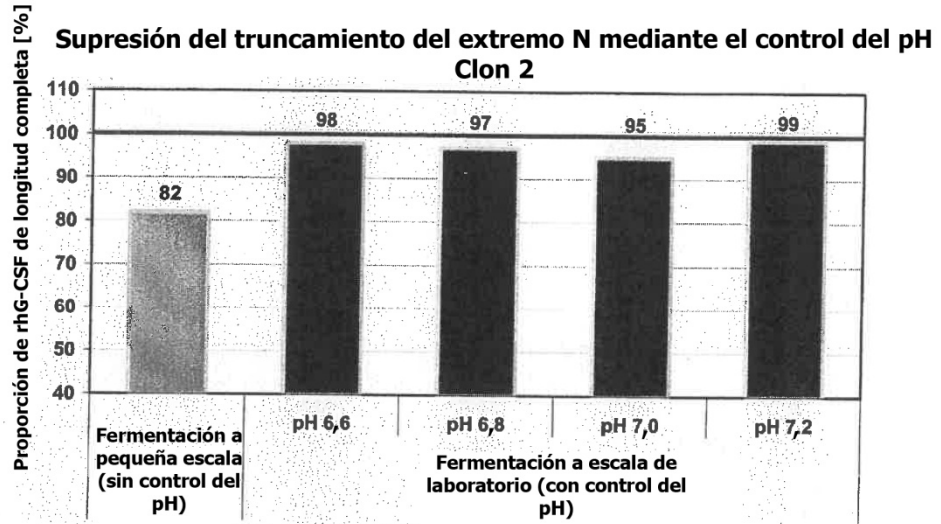


Figura 12

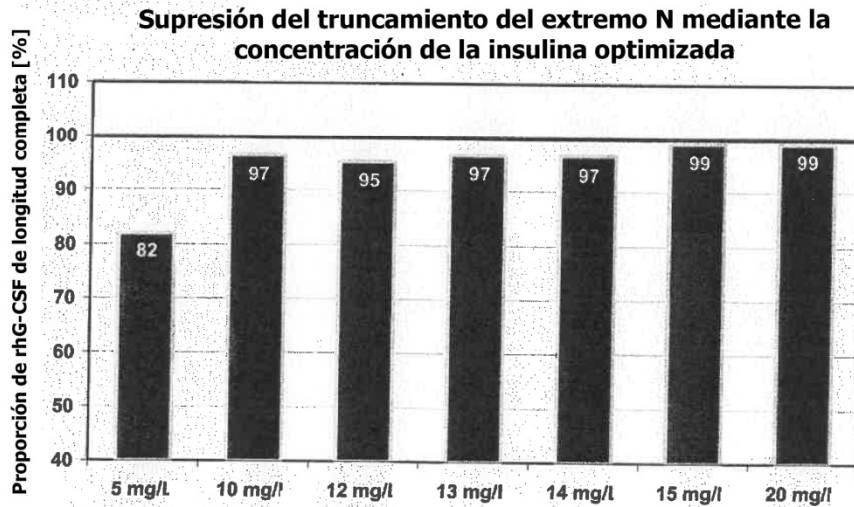


Figura 13

