

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 724**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2015 PCT/US2015/044883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16025615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2015 E 15757369 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3180427**

54 Título: **Producción de factor X funcional y completamente procesado en un sistema de expresión de mamífero que secreta furina**

30 Prioridad:

12.08.2014 US 201462036438 P

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

17.02.2020

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BÖHM, ERNST;
HORLING, FRANZISKA;
KOEHN, JADRANKA y
DOCKAL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 742 724 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

Producción de factor X funcional y completamente procesado en un sistema de expresión de mamífero que secreta furina

5

Campo

Se divulgan en el presente documento sistemas de expresión, células transformadas y métodos relacionados con los mismos, para la expresión de factor X recombinante activo y completamente procesado en presencia de furina.

10

Antecedentes

El factor X de coagulación humano (FX), FX activado (FXa) y variantes de los mismos, se usan como agentes terapéuticos en trastornos de coagulación de la sangre que incluyen, pero no se limitan a, hemofilia y enfermedad de von Willebrand. El FX, una serina proteasa dependiente de la vitamina K, se sintetiza como una proteína precursora de cadena única en el retículo endoplasmático, con la posterior escisión de furina proteolítica intracelular en el aparato de Golgi antes de la secreción por la célula productora en el torrente circulatorio, o en el medio de cultivo en caso de expresión recombinante. Tres sitios de escisión de furina en FX son responsables del procesamiento proteolítico de FX apropiado. La forma madura de FX es una molécula de dos cadenas unidas a disulfuro, que consiste en una cadena ligera y una pesada, formada después de la escisión de la proteína precursora. Las modificaciones adicionales de la molécula incluyen la γ -carboxilación de la cadena ligera y la glicosilación ligada a O o N del péptido de activación que está unido a la cadena pesada.

15

20

25

30

35

Además de FX, los factores de coagulación dependientes de la vitamina K adicionales que albergan el sitio de reconocimiento de consenso Arg-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO:4) son sustratos de la endoproteasa furina expresada de manera ubicua, también conocida como enzima de escisión de residuos de aminoácido básica combinada (PACE). El procesamiento proteolítico adecuado de proteínas recombinantes de la cascada de la coagulación está dañado en sistemas de expresión de cultivo celular debido a limitaciones del procesamiento intracelular a alta expresión de rendimiento. De manera similar al factor de von Willebrand y al factor IX de coagulación (FIX) que muestran un procesamiento proteolítico insuficiente a tasas de expresión altas en células de mamífero recombinantes, la secreción de FX en clones celulares de CHO de baja producción se caracteriza por FX completamente procesado, mientras que los clones de alta producción comprenden FX de cadena única no procesado y múltiples formas no procesadas de cadena ligera de FX, además de las especies de cadena ligera y pesada de FX procesadas de manera correcta. Los tipos y grados de cadena ligera de FX no procesado varían entre clones celulares individuales y en condiciones de cultivo celular diferentes tales como densidad celular. Es necesaria coexpresión de furina *in vivo* o incubación de furina *in vitro* después del cultivo celular adicional para mantener la maquinaria proteolítica de la furina endógena, facilitando la escisión de la proteína intacta.

40

45

La coexpresión de furina es indispensable para la expresión de FX completamente procesado a alto rendimiento. Sin embargo, hasta la fecha no se ha informado de un nivel umbral de furina que asegure un porcentaje alto de FX procesado intacto en sistemas de cultivo celular. Los niveles altos de furina son tóxicos, por tanto deben equilibrarse los niveles de expresión de furina mediante sistemas de expresión en mamíferos que producen FX entre niveles que sean tóxicos, pero potencialmente procesan el 100% de la proteína precursora de FX, y aquellos que sean demasiado bajos, dando como resultado cultivos celulares sanos en los que se produce FX procesado subóptimo.

Sumario

Se divulga en el presente documento un sistema para expresar furina y un factor X humano (FX) en la misma línea celular y proporcionando así una concentración de furina crítica en el sobrenadante de cultivo para la generación de FX completamente procesado y completamente activo, manteniendo la viabilidad del cultivo.

50

Por tanto, se divulga en el presente documento una célula transformada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una furina humana, de manera que la célula transformada expresa y secreta furina funcional en un sobrenadante de cultivo, en la que la furina funcional se secreta a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas. En la invención, las células transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos que codifica para el factor X. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para el factor X están en diferentes vectores de expresión. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para el factor X están en el mismo vector de expresión.

55

60

Se divulga también un sistema de expresión de proteína eucariota que comprende una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero; un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana por la línea celular, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana; y un segundo vector de expresión adaptado para la expresión de una proteína por la línea celular, en el que el segundo vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para

65

una proteína escindible por furina y que muestra un motivo Arg-(Lys/Arg)-Arg, en el que la línea celular es capaz de secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas.

5 Se divulga también un sistema de expresión de proteína eucariota que comprende una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero; un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana y una proteína escindible por furina, y que muestra un motivo Arg-(Lys/Arg)-Arg, por la línea celular, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana y una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína escindible por furina, en el que la línea celular es capaz
10 de secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína están en diferentes vectores de expresión. En otro aspecto la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína están en el mismo vector de
15 expresión.

Se proporciona una célula transformada que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica para una furina humana y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un FX humano, de manera que la célula transformada expresa y secreta furina funcional y FX en un sobrenadante de cultivo, en la que la furina se
20 secreta a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas y al menos el 85% de FX está completamente procesado. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para el FX están en diferentes vectores de expresión. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para furina humana y la secuencia de nucleótidos que codifica para el FX
25 están en el mismo vector de expresión.

Se divulga también un sistema de expresión de proteína eucariota que comprende una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero; un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana por la línea celular, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana; y un segundo vector de expresión adaptado para la expresión de FX por la línea
30 celular, en el que el segundo vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para FX, en el que la línea celular es capaz de secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas.
35

Además se divulga un sistema de expresión de proteína eucariota que comprende una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero; un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana y FX, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana y una secuencia de nucleótidos que codifica para FX, en el que la línea celular es capaz de
40 secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas.

Se divulga también un método de preparación de una proteína recombinante que comprende transfectar una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero con un primer vector de expresión adaptado para la
45 expresión de furina humana por la línea celular, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana; y transfectar la línea celular con un segundo vector de expresión adaptado para la expresión de una proteína por la línea celular, en el que el segundo vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que muestra un motivo Arg-(Lys/Arg)-Arg; en el que la línea celular transfectada con los vectores de expresión primero y segundo expresa y
50 secreta furina humana funcional a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 horas o entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas. En un aspecto, la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y el segundo vector de expresión sustancialmente de manera simultánea. En otro aspecto, la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de furina antes de transfectar la línea celular con el segundo vector de expresión. En aún otro aspecto, la línea celular se transfecta con el segundo vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de la proteína antes de transfectar la línea celular con el primer vector de expresión.
55

En un aspecto, la proteína es factor de von Willebrand, factor II, factor IX, factor X, proteína C, proteína S o proteína Z. En la invención, la proteína es factor X.
60

Se divulga también un método de preparación de una proteína recombinante que comprende transfectar una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero con un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana por la línea celular, en el que el primer vector de expresión incluye una secuencia de
65 nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana; y transfectar la línea celular con un segundo vector de expresión adaptado para la expresión de FX por la línea celular, en el que el segundo vector de expresión incluye

una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de FX; en el que la línea celular transfectada con los vectores de expresión primero y segundo expresa y secreta furina humana funcional a una concentración de aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas. En una realización, la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y el segundo vector de expresión sustancialmente de manera simultánea. En otra realización, la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de furina antes de transfectar la línea celular con el segundo vector de expresión. En aún otra realización, la línea celular se transfecta con el segundo vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de la proteína antes de transfectar la línea celular con el primer vector de expresión.

En otra realización, las células son capaces de secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de al menos aproximadamente 50 a aproximadamente 60 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas y en la que al menos el 90% de FX está completamente procesado. En otra realización, las células son capaces de secretar furina funcional en el sobrenadante de cultivo a una concentración de al menos aproximadamente 90 a aproximadamente 100 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas y en la que al menos el 95% de FX está completamente procesado.

Se divulga también un FX recombinante producido por una célula transformada divulgada en el presente documento.

Además se proporciona un FX recombinante producido por un sistema de expresión divulgado en el presente documento.

Se proporciona también un FX recombinante producido por un método divulgado en el presente documento.

Se proporciona también un sistema de expresión para FX recombinante adaptado para secretar furina en un sobrenadante de cultivo a una concentración de entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas.

Se proporciona también un método de producción de FX completamente procesado y maduro que comprende un sistema de expresión que secreta furina en un sobrenadante de cultivo a una concentración de entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml después del cultivo durante entre aproximadamente 36 y aproximadamente 78 horas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A representa el vector de expresión RCL.012-74.pD3H-Furina y la figura 1B representa la secuencia de nucleótidos del vector (SEQ ID NO:1). La secuencia de furina humana está subrayada y los codones de iniciación y de terminación están doblemente subrayados.

La figura 2 representa la secuencia de nucleótidos de furina humana (SEQ ID NO:2). Los codones de iniciación y de terminación están doblemente subrayados.

La figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de furina humana (SEQ ID NO:3).

La figura 4 representa el grado de factor X completamente procesado (FX) en cultivos. La cuantificación densitométrica se llevó a cabo mediante inmunotransferencia de tipo Western de FX en condiciones reductoras y se tiñó con un anticuerpo policlonal anti-FX. Los clones (ID de clon de 42 a 52) mostraron hasta 4 especies de FX con intensidades de píxel variantes que incluyen la cadena única de FX no procesado (caja 1, 5, 9, etc.), la cadena pesada de FX (caja 2, 6, 10, etc.), la cadena ligera de FX que contiene propéptido no procesado (caja 3, 7, 11, etc.) y la cadena ligera de FX procesado (caja 4, 8, 12, etc.). La intensidad de píxel de las cajas 45-48 se determinó para la resta de fondo.

La figura 5 representa la concentración de furina secretada y el porcentaje de FX completamente procesado/FX total en el cultivo. Existe una relación dosis-respuesta entre la concentración de furina secretada en el sobrenadante de cultivo celular (determinada con un ensayo de actividad de furina) y el % de FX completamente procesado/FX total (determinado mediante cuantificación densitométrica de las respectivas bandas en las inmunotransferencias de tipo Western).

La figura 6 representa un análisis de la dosis de furina y de FX completamente procesado. Los datos (círculos) con promedio específico de células (líneas oscuras) y de población (líneas claras) predijeron el FX completamente procesado/FX total (%) como una función de la concentración de furina con el modelo $E_{m\acute{a}x}$.

Las figuras 7A-D representan una prueba de validación del modelo $E_{m\acute{a}x}$. La figura 7A representa el error residual de respuesta frente a la respuesta predicha donde los puntos de datos están dispersos de manera simétrica alrededor de cero, indicando una tendencia no sistemática. La figura 7B representa un gráfico Q-Q normal para los errores

residuales indicando que la suposición de errores distribuidos normal mantenidos como puntos de datos están dispersos alrededor de la línea de identidad. La figura 7C representa el error residual de respuesta frente a la línea celular donde los puntos de datos están dispersos de manera simétrica alrededor de cero, indicando una tendencia no sistemática. La figura 7D representa los valores observados y predichos representados los unos con los otros indicando un buen ajuste de los datos como los puntos de datos están dispersos de manera simétrica alrededor de la línea de identidad.

La figura 8 representa un modelo nulo para someter a prueba la hipótesis de que el grado de procesamiento de FX es independiente de la concentración de furina. Los datos (círculos) y el modelo nulo ajustado con las ordenadas en el origen que suponen solo que el FX procesado es independiente de la concentración de furina (ajustes promedios específicos de células y de población como líneas oscuras y claras, respectivamente).

La figura 9 representa una curva dosis-respuesta y concentraciones mínimas de furina calculadas para producir el 90% y el 95% de FX procesado. El promedio de población predicho de FX completamente procesado/FX total (%) como una función de la concentración de furina (línea negra) junto con las concentraciones de furina que proporcionan el 90% y el 95% de FX completamente procesado/FX total obtenido mediante optimización numérica del modelo ajustado.

Descripción detallada

Se proporcionan en el presente documento células transformadas, sistemas de expresión eucariotas, métodos para producir proteínas recombinantes y proteínas recombinantes preparados mediante los métodos, todos dirigidos a la expresión de furina y de factor X (FX) en la misma línea celular, y proporcionando así una concentración de furina crítica en el sobrenadante de cultivo para la generación de FX completamente procesado y maduro, manteniendo la viabilidad del cultivo.

Es común a las células transformadas, los sistemas de expresión eucariotas y los métodos para la producción de proteínas recombinantes la capacidad de la célula huésped de producir niveles de furina recombinante consistentes. La furina es necesaria para la escisión de determinadas proteínas de mamífero, incluyendo el FX, desde una forma de proteína precursora a una forma completamente procesada, madura. Las bajas concentraciones de furina en el sobrenadante de cultivo del sistema de expresión dan como resultado la acumulación de formas de la proteína que contienen propéptido y otras parcialmente procesadas o no. Las concentraciones de furina que son demasiado altas dan como resultado el crecimiento deteriorado de las células huésped y finalmente la muerte celular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "furina" incluye furina de cadena completa así como cualquier fragmento de furina capaz de la escisión del sitio de reconocimiento de consenso Arg-X-Lys/Arg-Arg. Las formas truncadas activas de furina se conocen en la técnica y son adecuadas para su uso en la presente divulgación. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de furina adecuados pueden encontrarse en el documento U.S. 6.210.926 y en Preininger *et al.*, (Cytotechnology 30:1-15, 1999).

Además, dentro del alcance de la presente divulgación se encuentran variantes de la furina y proteínas del factor X divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, podrían realizarse cambios conservativos de aminoácidos, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o del péptido, normalmente no alteran su función. Las sustituciones conservativas de aminoácidos normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; y lisina, arginina; fenilalanina, tirosina.

Se incluyen también proteínas de fusión u otras modificaciones, o FX que ha aumentado la semivida después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de tales serán fusiones con un dominio Fc de inmunoglobulina, un dominio de albúmina, un polipéptido recombinante extendido (XTEN) (véase el documento US 8.673.860), secuencias poli Glu o poli Asp, transferrina o polipéptidos que contienen PAS (Pro Ala Ser) unidos a la secuencia de FX.

Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen derivatización química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. Se incluyen también modificaciones de glicosilación, por ejemplo, aquellas producidas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, enzimas de mamífero que glicosilan o que desglicosilan. Se abarcan también secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Las proteínas también pueden modificarse químicamente después de la purificación con polímeros biocompatibles solubles en agua, por ejemplo, polietilenglicol, ácido polisiálico o hidroxietilalmidón.

Se incluyen también polipéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular comunes de manera que se mejora su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad. Los análogos de tales polipéptidos incluyen aquellos que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos que se producen de manera natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que se producen de manera no natural. Los péptidos de la divulgación no se limitan a productos de cualquiera de los procedimientos a modo de

ejemplo específicos enumerados en el presente documento.

La divulgación en el presente documento se dirige generalmente a sistemas, células transformadas, vectores de expresión y métodos para producir al menos una proteína de mamífero recombinante que se procesa después de la traducción mediante furina (una proteína de mamífero que requiere furina recombinante). La proteína de mamífero es uno o más de factor de von Willebrand, factor II, factor IX, factor X, proteína C, proteína S o proteína Z. En la invención, la proteína es FX.

La concentración de furina en el sobrenadante de cultivo se selecciona como diana dentro de un intervalo óptimo para la producción de proteínas completamente procesadas, maduras, manteniendo la viabilidad del cultivo después de un periodo definido de cultivo. Por tanto, una concentración útil de furina en un sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura está entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 400 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 350 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 250 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 200 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 175 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 150 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 125 U/ml, o entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 100 U/ml. En una realización, la concentración de furina en el sobrenadante de cultivo no es menos de 50 U/ml.

En otra realización, la concentración útil de furina en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura después de un periodo definido de cultivo está entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 60 U/ml, entre aproximadamente 55 U/ml y aproximadamente 65 U/ml, entre aproximadamente 60 U/ml y aproximadamente 70 U/ml, entre aproximadamente 65 U/ml y aproximadamente 75 U/ml, entre aproximadamente 70 U/ml y aproximadamente 80 U/ml, entre aproximadamente 75 U/ml y aproximadamente 85 U/ml, entre aproximadamente 80 U/ml y aproximadamente 90 U/ml, entre aproximadamente 85 U/ml y aproximadamente 95 U/ml, entre aproximadamente 90 U/ml y aproximadamente 95 U/ml, entre aproximadamente 95 U/ml y aproximadamente 105 U/ml, entre aproximadamente 100 U/ml y aproximadamente 110 U/ml, entre aproximadamente 115 U/ml y aproximadamente 125 U/ml, entre aproximadamente 120 U/ml y aproximadamente 130 U/ml, entre aproximadamente 125 U/ml y aproximadamente 135 U/ml, entre aproximadamente 130 U/ml y aproximadamente 140 U/ml, entre aproximadamente 135 U/ml y aproximadamente 145 U/ml, entre aproximadamente 140 U/ml y aproximadamente 150 U/ml, entre aproximadamente 145 U/ml y aproximadamente 155 U/ml, entre aproximadamente 150 U/ml y aproximadamente 160 U/ml, entre aproximadamente 155 U/ml y aproximadamente 165 U/ml, entre aproximadamente 160 U/ml y aproximadamente 170 U/ml, entre aproximadamente 165 U/ml y aproximadamente 175 U/ml, entre aproximadamente 170 U/ml y aproximadamente 180 U/ml, entre aproximadamente 175 U/ml y aproximadamente 185 U/ml, entre aproximadamente 180 U/ml y aproximadamente 190 U/ml, entre aproximadamente 185 U/ml y aproximadamente 195 U/ml, o entre aproximadamente 190 U/ml y aproximadamente 200 U/ml. En otra realización, la concentración de furina útil en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura después de un periodo definido de cultivo está entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 60 U/ml, o aproximadamente 57 U/ml. En otra realización, la concentración útil de furina en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura está entre aproximadamente 90 U/ml y aproximadamente 100 U/ml, o aproximadamente 96 U/ml.

En otras realizaciones, la concentración útil de furina en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura después de un periodo definido de cultivo es menos de aproximadamente 400 U/ml, menos de aproximadamente 375 U/ml, menos de aproximadamente 350 U/ml, menos de aproximadamente 325 U/ml, menos de aproximadamente 300 U/ml, menos de aproximadamente 275 U/ml, menos de aproximadamente 250 U/ml, menos de aproximadamente 225 U/ml, menos de aproximadamente 200 U/ml, menos de aproximadamente 175 U/ml, menos de aproximadamente 150 U/ml, menos de aproximadamente 125 U/ml, o menos de aproximadamente 100 U/ml.

En otras realizaciones, la concentración útil de furina en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura después de un periodo definido de cultivo es más de aproximadamente 50 U/ml, más de aproximadamente 60 U/ml, más de aproximadamente 70 U/ml, más de aproximadamente 80 U/ml, más de aproximadamente 90 U/ml, más de aproximadamente 100 U/ml, más de aproximadamente 110 U/ml, más de aproximadamente 120 U/ml, más de aproximadamente 130 U/ml, más de aproximadamente 140 U/ml, más de aproximadamente 150 U/ml, más de aproximadamente 160 U/ml, más de aproximadamente 170 U/ml, más de aproximadamente 180 U/ml, más de aproximadamente 190 U/ml, o más de aproximadamente 200 U/ml.

Para los propósitos de la presente divulgación, se generan los niveles de furina en sobrenadantes de cultivo divulgados en el presente documento dentro de un periodo de tiempo de desde aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 96 horas después del inicio del cultivo (después del cultivo durante de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 96 horas) y refleja los niveles de furina que se acumulan en el sobrenadante de cultivo durante ese periodo. En otras realizaciones, los niveles deseados de furina en sobrenadantes de cultivo se logran dentro de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 90 horas, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente

84 horas, de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 78 horas, de aproximadamente 36 a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 40 horas a aproximadamente 80 horas, de aproximadamente 42 horas a aproximadamente 68 horas, o de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después del inicio del cultivo, o después del cultivo para el periodo indicado de tiempo.

Alternativamente, se expresan los niveles de furina en sobrenadantes de cultivo divulgados en el presente documento como una concentración de furina secretada por una cantidad de células por volumen de sobrenadante de cultivo por día. En un ejemplo no limitativo, la concentración de furina se expresa como U/10⁶ células/día. En otra realización, una concentración útil de furina en el sobrenadante de cultivo para la producción de una proteína de mamífero completamente procesada, madura está entre aproximadamente 20 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 25 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 30 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 35 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 40 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 45 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 50 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 55 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 60 U/10⁶ células/día y aproximadamente 75 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 20 U/10⁶ células/día y aproximadamente 70 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 20 U/10⁶ células/día y aproximadamente 65 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 20 U/10⁶ células/día y aproximadamente 60 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 20 U/10⁶ células/día y aproximadamente 55 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 25 U/10⁶ células/día y aproximadamente 55 U/10⁶ células/día, entre aproximadamente 25 U/10⁶ células/día y aproximadamente 45 U/10⁶ células/día, o entre aproximadamente 25 U/10⁶ células/día y aproximadamente 40 U/10⁶ células/día.

La concentración de furina en el sobrenadante de cultivo es suficiente para procesar al menos aproximadamente el 75% de la proteína precursora de mamífero a una proteína funcional, madura. La proteína es cualquier proteína traducida como una proteína precursora y procesada en una forma madura, al menos en parte, mediante las acciones de furina. En la invención, la proteína es FX. En una realización, la concentración de furina es suficiente para procesar al menos aproximadamente el 80% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 82% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 84% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 86% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 88% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 90% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 92% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 93% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 94% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 95% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 96% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 97% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 98% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, para procesar al menos aproximadamente el 99% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura, o para procesar el 100% de la proteína precursora de FX de mamífero a una proteína de FX funcional, madura.

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína precursora" se refiere a una proteína precursora que es inactiva y se convierte en la forma activa mediante escisión y, opcionalmente, otras modificaciones después de la traducción en la célula después de la síntesis.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento células transformadas adaptadas para la secreción tanto de furina como de una proteína de mamífero, tal como FX. Las células transformadas pueden ser cualquier célula eucariota adecuada para la secreción de proteínas de mamífero, independientemente de si las células producen furina endógena. Las líneas celulares adecuadas para la generación de las células transformadas incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de embrión humano, células de riñón de primate (por ejemplo, células COS, HEK293), fibroblastos (por ejemplo, fibroblastos murinos) y células de mieloma de ratón (por ejemplo, NSO-GS). Las líneas celulares adecuadas son capaces de un alto nivel expresión de proteínas de mamífero y son capaces de modificaciones después de la traducción, por ejemplo, glicosilación, formación de enlaces disulfuro, fosforilación y γ -carboxilación. Los métodos para seleccionar y cultivar células huésped y para inducir que las células huésped expresen un polipéptido se conocen generalmente por el experto en la técnica.

Se divulgan también en el presente documento sistemas de expresión que comprenden células adecuadas para la producción de proteínas de mamífero y al menos un vector de expresión adaptado para la expresión de al menos una proteína de mamífero. Los vectores de expresión eucariotas están disponibles generalmente para la expresión

en células de mamífero. Para permitir que la furina y una proteína de mamífero, tal como FX, se expresen según los métodos divulgados en el presente documento, se introducen secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas en una célula eucariota por medio de transfección, transformación o infección con un vector de expresión, mediante lo cual se expresan los polipéptidos. La expresión de la furina y/o las proteínas de mamífero puede ser o bien transitoria o bien estable. Las secuencias de nucleótidos de furina y de mamífero están presentes como un plásmido, o como una parte de un vector de expresión viral o no viral. Los vectores virales particularmente adecuados incluyen, pero no se limitan a, baculovirus, virus vaccinia, adenovirus, citomegalovirus, virus adenoasociados, lentivirus competentes para la replicación (RCL) y virus de herpes. Los ejemplos no limitativos de vectores de expresión eucariotas virales incluyen vectores Rc/CMV, Rc/RSV, RCL y SV40. Los vectores de expresión eucariotas no virales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, virosomas, liposomas, lípidos catiónicos, plásmidos y ADN conjugado con polilisina. Los ejemplos de vectores de expresión de plásmidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, pSLX, pcDNA y otros conocidos por los expertos habituales en la técnica.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para furina, una secuencia de nucleótidos que codifica para proteínas de mamífero, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica para FX, o una combinación de las mismas. En una realización, las secuencias tanto de furina como de proteínas se expresan a partir de un vector de expresión único. En otra realización, la secuencia de furina y las secuencias de proteína se expresan a partir de diferentes vectores de expresión. En una realización, si las secuencias de nucleótidos de furina y de proteínas se expresan a partir del mismo vector de expresión, se separan opcionalmente mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Los genes pueden expresarse a partir de uno o más promotores. Además, las secuencias de nucleótidos que codifican para cada proteína pueden orientarse en direcciones opuestas en el plásmido u orientarse en la misma dirección. Los vectores de expresión comprenden además elementos seleccionables y otras secuencias reguladoras para la producción eficaz de proteínas de mamífero tal como se entiende por los expertos habituales en la técnica.

Se divulgan también en el presente documento vectores de expresión que permiten la expresión de furina y otras proteínas de mamífero mediante el uso de intercambio de casetes mediado por recombinasa.

Si la furina y la proteína de mamífero se expresan a partir de diferentes vectores de expresión, entonces los vectores de expresión tendrán marcadores de selección diferentes de manera que pueden seleccionarse las células transformadas con el vector. Tales células seleccionadas podrían aislarse luego y hacerse crecer en cultivos monoclonales.

Los promotores que permiten la expresión constitutiva, regulable, específica de tejido, específica de tipo de célula, específica de ciclo de célula o específica de metabolismo en células eucariotas son adecuados, por ejemplo, para la expresión en células de mamífero. Los elementos regulables son promotores, secuencias activadoras, potenciadores, silenciadores y/o secuencias represoras. Los ejemplos de elementos regulables que permiten la expresión constitutiva en eucariotas son promotores que son reconocidos por la ARN polimerasa III o promotores virales, potenciador del citomegalovirus (VCM), promotor del VCM, promotor del SV40 o promotores de repeticiones terminales largas (RTL), por ejemplo derivadas de MMTV (virus del tumor mamario del ratón) y otro promotor viral y secuencias activadoras que se derivan de, por ejemplo, virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC), virus de herpes simple (VHS), virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr (VEB), promotores de choque térmico, o virus de inmunodeficiencia humano (VIH). Los ejemplos de elementos regulables que permiten la expresión inducible en eucariotas son el operador tetraciclina en combinación con un represor apropiado. La expresión de las secuencias de nucleótidos de proteínas de mamífero y de furina también puede tener lugar bajo el control de promotores específicos de tejido o específicos de proteína. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de proteína son promotores de genes de FX o promotores de genes de furina.

En determinadas realizaciones, las células se transforman con otra proteína además de furina y de factor X. En una realización, la proteína adicional es vitamina K epóxido reductasa (VKOR). En determinadas realizaciones, la proteína adicional se expresa a partir del mismo vector de expresión tal como uno, o ambos, de furina y de factor X, o la proteína adicional se expresa a partir de un vector de expresión diferente.

Se divulgan también en el presente documento sistemas de expresión que comprenden células huésped y uno o más vectores de expresión adaptados para expresar furina y al menos una proteína de mamífero adicional, por ejemplo, FX.

Se divulgan también en el presente documento métodos de producción de proteínas de mamífero que requieren furina recombinante completamente procesadas, tales como FX. En una realización, se produce una línea celular estable que produce furina recombinante, y posteriormente se transfecta con un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos para al menos el factor X. Las líneas celulares estables que producen furina recombinante pueden establecerse y almacenarse para la transfección con un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos para al menos una proteína de mamífero que requiere furina cuando sea necesario. Alternativamente, pueden transfectarse vectores de expresión para furina y para la proteína de mamífero que requiere furina, tal como FX, en las células huésped dentro de aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente

24 horas de cada uno. En otra realización, se transfectan dos o más vectores de expresión en las células huésped sustancialmente de manera simultánea. Para los propósitos de la presente divulgación, sustancialmente de manera simultánea se refiere a cualquier periodo de tiempo que es menos de o igual a 1 hora.

5 Las células transformadas se seleccionan según los marcadores de selección presentes en el/los vector(es) de expresión para producir conjuntos estables de células transformadas, y luego los conjuntos se clonan opcionalmente para dar lugar a clones estables. Los clones estables producen entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 400 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 350 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 250 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 200 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 175 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 150 U/ml, entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 125 U/ml, o entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 100 U/ml de furina en el sobrenadante de cultivo después de aproximadamente de 36 a aproximadamente 78 horas, de aproximadamente 36 a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 40 horas a aproximadamente 78 horas, de aproximadamente 42 horas a aproximadamente 68 horas, o de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después del inicio del cultivo, o después del cultivo para el periodo indicado de tiempo. Además, los clones estables dan lugar a más del 80% de proteínas de mamífero recombinantes completamente procesadas y activas, tales como FX, de todas las proteínas recombinantes, tales como FX, producidas por las células transformadas.

20 Se divulga también en el presente documento un sistema de expresión para furina recombinante y FX recombinante que secreta furina en el sobrenadante de cultivo a una concentración acumulada de entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml después de aproximadamente de 36 a aproximadamente 78 horas de cultivo.

25 Se divulga también en el presente documento un método para producir FX completamente procesado, maduro que comprende el uso de un sistema de expresión que secreta furina en el sobrenadante de cultivo a una concentración acumulada de entre aproximadamente 50 U/ml y aproximadamente 300 U/ml después de aproximadamente de 36 a aproximadamente 78 horas de cultivo.

30 Se abarcan también en el presente documento proteínas de mamífero recombinantes producidas por los métodos reivindicados y cualquier FX recombinante de mamífero completamente procesado.

Ejemplos

35 Ejemplo 1. Producción de factor X recombinante completamente procesado y completamente activo mediante niveles de furina definidos

40 Para la expresión de FX, se usó el plásmido pSLX de expresión de mamífero que contiene o bien FX optimizado para codón humano o bien ambos, FX optimizado para codón humano y vitamina K epóxido reductasa optimizada para codón humano (FX/VKOR), separados por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Se usaron los constructos para sistemas de expresión de ovario de hámster chino (CHO-S) y CHO-DG44, incluidas la selección de genética y la selección de dihidrofolato reductasa (dhfr), respectivamente. Para la expresión de furina, se usó el plásmido de expresión de mamífero pcDNA3.1 que contiene furina de longitud completa humana en combinación con higromicina como marcador de selección (figura 1A).

45 Inicialmente, se transfectaron líneas celulares derivadas de CHO (CHO-S y CHO-DG44) con los constructos de FX o FX/VKOR para generar conjuntos estables, y posteriormente se sometieron los conjuntos a subclonación para generar clones estables. En una segunda ronda de transfección y subclonación, se supertransfectó un número seleccionado de clones que expresan FX o FX/VKOR cada uno con furina, dando como resultado conjuntos estables y clones estables que expresan FX/furina o FX/VKOR/furina.

50 Se hicieron crecer las líneas celulares de CHO-S y CHO-DG44 que producen FX recombinante estable en medios libres de componente animal, en matraces de agitación durante aproximadamente de 42 a aproximadamente 72 horas y con números de células iniciales de $0,3 \times 10^5$ ó $0,5 \times 10^5$ células/ml. Se mantuvieron las células CHO-S en medios PowerCHO[®]-CD (Lonza BioWhittaker) complementados con glutamina 4 mM, 500 µg/ml de genética, 500 µg/ml de higromicina y 5 µg/ml de vitamina K1. Se mantuvieron las células CHO-DG44 en medios OptiCHO[™]-CD (Life Technologies) complementados con glutamina 6 mM, metotrexato (MTX) 500 nM y 5 µg/ml de vitamina K1.

55 Se analizó el sobrenadante del cultivo celular sembrado mediante inmunotransferencia de tipo Western en condiciones reductoras para determinar la calidad del FX recombinante humano usando un anti-FX policlonal humano de cabra o anti-FX policlonal humano de oveja (Affinity Biologicals). El análisis densitométrico de las inmunotransferencias de tipo Western permitió la cuantificación de las diferentes especies de FX procesado de manera correcta, denominadas FX de cadena pesada (HC) y FX de cadena ligera (LC), y especies de FX escindidas de manera inadecuada, denominadas FX de cadena única (SC) y FX de cadena ligera que contiene propéptido (PP-LC).

65

Para la cuantificación de FX, se analizó el sobrenadante de cultivo celular con ELISA para determinar la concentración de FX y con el ensayo cromogénico de FXa usando el veneno de la víbora de Russell (RVV) como activador para determinar la concentración de FX activo. Se calibraron estos ensayos usando FX derivado de plasma (Hifen Biomed). La actividad específica se da en %, dividiendo la concentración de FX activo entre la concentración de FX total multiplicado por 100. Para la cuantificación de furina, se determinó la furina activa en un ensayo fluorogénico de furina calibrado contra un material de referencia de furina (New England Biolabs).

Para el análisis estadístico, se modeló el FX completamente procesado/FX total (%) como una función de la concentración de furina usando el modelo $E_{m\acute{a}x}$ sobre los conjuntos de transfección de CHO-DG44 (A), los conjuntos de transfección de CHO-S (B), y los clones derivados de células únicas de CHO-S (C). Se usó este modelo para la evaluación estadística de estudios dosis-respuesta. El modelo $E_{m\acute{a}x}$ usa cuatro parámetros (E_0 , $E_{m\acute{a}x}$, DE_{50} y n) para modelar FX como una función de furina tal como sigue:

$$y = E_0 + (x^n \cdot E_{m\acute{a}x}) / (DE_{50}^n + x^n)$$

donde y se refiere a FX completamente procesado/FX total y x se refiere a la concentración de furina. El parámetro E_0 se refiere al efecto basal que corresponde a la respuesta cuando la concentración de furina es cero, $E_{m\acute{a}x}$ al máximo efecto atribuible a la concentración de furina, DE_{50} a la concentración de furina que produce la mitad de $E_{m\acute{a}x}$, y el parámetro n representa la pendiente (factor de Hill) que determina la pendiente de la curva.

Considerando que FX completamente procesado/FX total alcanza el 100% si la furina alcanza una gran concentración infinita, se modificó el modelo $E_{m\acute{a}x}$ a una función con tres parámetros que va a estimarse tal como sigue;

$$y = E_0 + (x^n \cdot (100 - E_0)) / (DE_{50}^n + x^n)$$

Este modelo se ajustó a los datos teniendo en cuenta la variabilidad entre las tres líneas celulares diferentes usando un modelo de efectos mezclados no lineal permitiendo a los parámetros E_0 y n variar entre las diferentes líneas celulares modelando también estos dos parámetros como efectos aleatorios.

Se realizó el diagnóstico del modelo para validar el modelo aplicado. Se realizó una comparación del modelo $E_{m\acute{a}x}$ ajustado con el modelo nulo usando la prueba de la razón de probabilidad para determinar evidencia estadística para el modelo $E_{m\acute{a}x}$ que estima el porcentaje de FX completamente procesado del FX total dependiendo de la concentración de furina.

Resultados

Se usó el sistema de expresión heterólogo basado en CHO para FX humano, que comprende conjuntos de transfección de CHO-DG44 (A), conjuntos de transfección de CHO-S (B) y clones derivados de células únicas de CHO-S (C), como base para estudiar el efecto de la expresión de furina sobre el procesamiento de FX humano siguiendo diferentes estrategias de transfección. Los conjuntos de transfección, así como los clones, expresaron de manera adicional VKOR, que no tuvo impacto sobre el estudio.

Después de un periodo de incubación de dos a tres días de cultivo, se sometió el sobrenadante del cultivo celular a una serie de análisis, incluyendo análisis por inmunotransferencia de tipo Western en condiciones reductoras, ensayo de la actividad de furina, ELISA y ensayo RVV (tabla 1). En promedio, los conjuntos y clones de CHO que producen FX revelaron una actividad específica para FX de más del 50%, alcanzando de manera parcial el 100% (tabla 1). Los análisis por inmunotransferencia de tipo Western mostraron que el FX recombinante se procesaba de manera inadecuada a diferentes grados, tal como se muestra mediante dos formas de FX procesadas de manera incompleta (es decir, la cadena ligera de FX que contiene propéptido y la cadena única de FX), además de la cadena ligera de FX libre de propéptido completamente procesada y la cadena pesada de FX (figura 4). Por medio del análisis densitométrico de estas cuatro especies de FX, el porcentaje de FX completamente procesado, es decir, la cadena ligera de FX más la cadena pesada de FX en relación al FX total, osciló entre el 30% y casi el 100% en sobrenadantes de cultivo celular (tabla 1, figura 4). Además, no se observó preactivación, que sería visible ya que la banda de cadena pesada se acortó por el tamaño del péptido de activación que falta. Se evaluó también si la concentración de furina secretada tenía influencia sobre el grado de FX procesado representando estos dos parámetros (figura 5). Tal como se muestra en la figura 5, solo el procesamiento parcial de FX es factible con concentraciones bajas de furina secretada (<20 U/ml), mientras que niveles altos de furina secretada se correlacionan con un mejor procesamiento de FX.

Tabla 1: Resumen de datos de líneas celulares que coexpresan furina y FX: se muestran las productividades de FX, las productividades y títulos de furina, y los porcentajes de FX completamente procesado/FX total medidos para cada línea celular.

ID de clon/conjunto	Proteínas recombinantes expresadas	Línea celular (conjunto o clon)	Conc. de furina (U/ml)	Densidad celular final [10^6 células/ml]	Productividad específica de furina [U/ 10^6 células/día]	Actividad específica de FX [%]	FX completamente procesado/FX total (%)
1	FX	Conjunto de CHO-DG44	8,03	2,015	2,22	5,64	30,34
2	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	8,05	1,155	3,45	7,58	45,69
3	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	7,88	1,436	2,86	6,44	31,05
4	FX/VKOR/furina	Conjunto de CHO-DG44	7,88	1,029	3,68	11,16	40,08
5	FX	Conjunto de CHO-DG44	2,74	1,518	0,95	9,04	41,42
6	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	11,59	0,952	5,71	14,12	71,78
7	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	2,38	1,152	1,02	15,14	36,92
8	FX/VKOR/furina	Conjunto de CHO-DG44	2,82	0,795	1,58	29,37	57,17
9	FX	Conjunto de CHO-DG44	5,36	2,438	1,26	9,23	34,46
10	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	9,94	1,503	3,48	12,23	59,30
11	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	4,88	2,162	1,27	14,57	33,12
12	FX/VKOR/furina	Conjunto de CHO-DG44	4,78	1,372	1,80	20,48	46,98
13	FX	Conjunto de CHO-DG44	8,07	2,005	2,24	47,68	40,93
14	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	8,83	1,851	2,62	64,80	60,54
15	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	8,42	1,843	2,50	45,48	33,98
16	FX/VKOR/furina	Conjunto de CHO-DG44	6,72	2,220	1,71	58,04	47,46
17	FX	Conjunto de CHO-DG44	2,59	1,246	1,05	78,72	46,40
18	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	55,91	1,396	20,75	98,49	73,47

19	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	2,59	1,207	1,07	70,43	47,61
20	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-DG44	3,48	1,431	1,27	93,42	60,04
21	FX	Conjunto de CHO-DG44	5,96	2,035	1,63	71,19	37,77
22	FX/furina	Conjunto de CHO-DG44	27,57	2,226	7,00	104,40	71,85
23	FX/VKOR	Conjunto de CHO-DG44	4,40	1,827	1,32	69,50	42,84
24	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-DG44	5,20	2,283	1,29	75,60	49,19
25	FX/VKOR	Conjunto de CHO-S	0,00	2,224	0,00	90,59	63,96
26	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-S	51,34	1,828	25,20	99,57	88,97
27	FX/VKOR	Conjunto de CHO-S	0,00	2,851	0,00	49,99	57,75
28	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-S	62,84	2,248	26,13	48,73	87,78
29	FX/VKOR	Conjunto de CHO-S	0,00	3,584	0,00	81,39	68,02
30	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-S	66,98	2,362	26,75	66,57	89,64
31	FX/VKOR	Conjunto de CHO-S	0,00	2,870	0,00	69,04	67,02
32	FX/VKOR/furin a	Conjunto de CHO-S	55,08	2,295	22,52	52,91	89,99
33	FX/VKOR	Conjunto de CHO-S	0,00	2,645	0,00	59,62	71,13
34	FX/furina	Conjunto de CHO-S	116,89	2,083	50,52	51,40	86,56
35	FX	Conjunto de CHO-S	0,00	2,230	0,00	67,49	62,65
36	FX/furina	Conjunto de CHO-S	46,62	1,846	22,18	19,29	82,99
37	FX	Conjunto de CHO-S	0,00	2,049	0,00	11,47	51,69
38	FX/furina	Conjunto de CHO-S	48,41	1,457	27,61	<25,33	77,46
39	FX	Conjunto de CHO-S	0,00	2,265	0,00	95,04	45,87
40	FX/furina	Conjunto de CHO-S	60,72	1,566	32,80	27,69	84,27

41	FX	Conjunto de CHO-S	0,00	2,018	0,00	35,63	49,28
42	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	113,45	3,704	26,99	90,30	95,91
43	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	63,41	3,133	17,45	92,26	96,23
44	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	92,86	2,893	27,37	98,55	98,12
45	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	173,37	3,430	44,11	79,46	98,42
46	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	23,54	2,816	7,10	86,31	91,69
47	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	105,42	2,918	30,84	78,63	95,14
48	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	33,77	3,542	8,35	80,02	92,21
49	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	135,62	2,777	41,39	94,46	95,18
50	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	82,03	2,193	30,46	48,80	93,75
51	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	8,06	2,280	2,90	67,11	52,38
52	FX/VKOR/furin a	Clon de CHO-S	81,02	2,889	23,91	85,37	95,61

Para entender la influencia de la furina sobre el procesamiento de FX y proporcionar un soporte estadístico de los datos, se modeló el FX completamente procesado del FX total (%) como una función de la concentración de furina usando el modelo $E_{m\acute{a}x}$ sobre las líneas celulares A, B y C (figura 6). Se proporcionan en las figuras 7A-D cuatro gráficos de diagnóstico del modelo, que indican un buen ajuste del modelo a los datos. Una comparación del modelo $E_{m\acute{a}x}$ ajustado con el modelo nulo usando la prueba de la razón de probabilidad dio como resultado un valor de $p < 0,0001$, proporcionando evidencia estadística para un porcentaje mayor de FX completamente procesado del FX total dependiendo de una concentración mayor de furina (figura 8), probándose de nuevo la validez de los datos. Basándose en los análisis estadísticos, las concentraciones de furina estimadas que van a producirse por la línea celular de producción, tal como se detecta en el medio de cultivo celular junto con FX dando como resultado un FX completamente procesado del FX total igual o mayor que el 90% e igual o mayor que el 95%, fueron de al menos 57 U/ml y de al menos 96 U/ml, respectivamente (figura 9).

En resumen, los datos proporcionan un nivel mínimo definido de furina secretada (al menos de 57 U/ml y al menos de 96 U/ml) en el sobrenadante de cultivo celular que se requiere para el procesamiento de FX suficiente (igual o mayor al 90% e igual o mayor al 95%).

En procesos biotecnológicos que expresan altos niveles de proteína recombinante, podría usarse la sobreexpresión de furina para obtener zimógenos completamente procesados. Con la presente invención, se proporciona por primera vez un mínimo definido de furina secretada garantizando un procesamiento alto de FX (≥ 57 U/ml para lograr al menos el 90% de FX completamente procesado y ≥ 96 U/ml de furina para al menos el 95% de FX completamente procesado). Este hallazgo es particularmente beneficioso para procesos de fermentación que expresan FX, FXa y variantes recombinantes de especies de animal y humano, donde el nivel de furina podría usarse como un indicador para el procesamiento adecuado de la proteína precursora de FX, y como diana para la línea celular y el desarrollo del procedimiento.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, y etc., usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como para modificarse en todas las instancias por el término "aproximadamente". Tal como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "de manera aproximada" significan dentro del 10 al 15%, preferiblemente dentro del 5 al 10%. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas que van a obtenerse mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la solicitud de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informado y aplicando técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan de una manera tan precisa como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de manera inherente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos "un", "uno/una", "el/los" y referentes similares usados en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se interpretan para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento se pretende que simplemente sirva como un método abreviado de referirse de manera individual a cada valor por separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara de manera individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o de otro modo claramente se contradiga por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o expresión a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento se pretende que simplemente ilumine mejor la invención y no plantee una limitación en el alcance de la invención que reivindique lo contrario. No debe interpretarse ninguna expresión en la memoria descriptiva como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgada en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo podría referirse a y reivindicarse de manera individual o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en el presente documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo podrían incluirse en, o eliminarse de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produzca cualquier tal inclusión o delección, la memoria descriptiva se considera que contiene el grupo como modificado, cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

Se describen determinadas realizaciones de esta invención en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, se harán evidentes variaciones en estas realizaciones descritas para los expertos habituales en la técnica al leer la descripción anterior. El inventor cuenta

5 con expertos en la técnica para emplear tales variaciones de manera apropiada, y los inventores pretenden que la invención se practique de otra manera que la específicamente descrita en el presente documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del contenido enumerado en las reivindicaciones adjuntas a cuyo efecto tal como se permite por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos se abarca por la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto.

10 Podrán limitarse además las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento en las reivindicaciones usando que consiste en o que consiste esencialmente en como expresión. Cuando se usa en las reivindicaciones, si se presenta o se añade por enmienda, el término de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s). Las realizaciones de la invención así reivindicadas se describen y se permiten de manera inherente o expresamente en el presente documento.

15 Para concluir, debe entenderse que las realizaciones de la invención divulgada en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención.

20 **Listado de secuencias**

<110> Baxalta GmbH
Baxalta Incorporated

25 <120> Producción de factor X funcional y completamente procesado en un sistema de expresión de mamífero que secreta furina

<130> Documento WO3724526.00092

30 <150> US62/036.438
<151> 12-08-2014

<160> 4

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 7981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Vector de expresión de RCL.012-74.pD3H-furina

45 <400> 1

ES 2 742 724 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggt aagcgtcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc	960
agatatccag cacagtggcg gccgcatgga gctgaggccc tggttgctat gggtggtagc	1020
agcaacagga accttgggcc tgctagcagc tgatgctcag ggccagaag tcttcaccaa	1080
cacgtgggct gtgcgcatcc ctggaggccc agcggtggcc aacagtgtgg cacggaagca	1140

ES 2 742 724 T3

tgggttcctc	aacctgggcc	agatcttcgg	ggactattac	cacttctggc	atcgaggagt	1200
gacgaagcgg	tcctgtcgc	ctcaccgccc	gcggcacagc	cggtgcaga	gggagcctca	1260
agtacagtgg	ctggaacagc	aggtggcaaa	gcgacggact	aaacgggacg	tgtaccagga	1320
gcccacagac	cccaagtttc	ctcagcagtg	gtacctgtct	ggtgtcactc	agcgggacct	1380
gaatgtgaag	gcggcctggg	cgcagggcta	cacagggcac	ggcattgtgg	tctccattct	1440
ggacgatggc	atcgagaaga	accacccgga	cttggcaggc	aattatgata	ctggggccag	1500
ttttgatgtc	aatgaccagg	accctgaccc	ccagcctcgg	tacacacaga	tgaatgacaa	1560
caggcacggc	acacggtgtg	cgggggaagt	ggctgcgggtg	gccaacaacg	gtgtctgtgg	1620
tgtaggtgtg	gcctacaacg	cccgcattgg	aggggtgcgc	atgctggatg	gcgaggtgac	1680
agatgcagtg	gaggcacgct	cgctgggcct	gaaccccaac	cacatccaca	tctacagtgc	1740
cagctggggc	cccgaggatg	acggcaagac	agtggatggg	ccagcccgcc	tcgcccagga	1800
ggccttcttc	cgtggggtta	gccagggccg	aggggggctg	ggctccatct	ttgtctgggc	1860
ctcggggaac	gggggcccgg	aacatgacag	ctgcaactgc	gacggctaca	ccaacagtat	1920
ctacacgctg	tccatcagca	gcgccacgca	gtttggcaac	gtgccgtggg	acagcgaggc	1980
ctgctcgtcc	aaactggcca	cgacctacag	cagtggcaac	cagaatgaga	agcagatcgt	2040
gacgactgac	ttgcggcaga	agtgcacgga	gtctcacacg	ggcacctcag	cctctgcccc	2100
cttagcagcc	ggcatcattg	ctctcacctc	ggaggccaat	aagaacctca	catggcgggg	2160
catgcaacac	ctggtggtac	agacctcgaa	gccagcccac	ctcaatgcca	acgactgggc	2220
caccaatggt	gtgggcccga	aagtgagcca	ctcatatggc	tacgggcttt	tggacgcagg	2280
cgccatggtg	gccctggccc	agaattggac	cacagtggcc	ccccagcggg	agtgcacatc	2340
cgacatcctc	accgagccca	aagacatcgg	gaaacggctc	gaggtgcgga	agaccgtgac	2400
cgcgtgcctg	ggcgagccca	accacatcac	tcggctggag	cacgctcagg	cgcggtcac	2460
cctgtcctat	aatcgccgtg	gcgacctggc	catccacctg	gtcagcccca	tgggcacccg	2520
ctccaccctg	ctggcagcca	ggccacatga	ctactccgca	gatgggttta	atgactgggc	2580
cttcatgaca	actcattcct	gggatgagga	tcctctggc	gagtgggtcc	tagagattga	2640
aaacaccagc	gaagccaaca	actatgggac	gctgaccaag	ttcacctcog	tactctatgg	2700
caccgcccct	gaggggctgc	ccgtacctcc	agaaagcagt	ggctgcaaga	ccctcacgtc	2760
cagtcaaggc	tgtgtggtgt	gcgaggaagg	cttctccctg	caccagaaga	gctgtgtcca	2820
gcactgccct	ccaggcttcg	cccccaagt	cctcgatacg	cactatagca	ccgagaatga	2880
cgtggagacc	atccgggcca	gcgtctgcgc	cccctgccac	gcctcatgtg	ccacatgcca	2940
ggggcccggc	ctgacagact	gcctcagctg	ccccagccac	gcctccttgg	accctgtgga	3000

ES 2 742 724 T3

gcagacttgc tcccggcaaa gccagagcag ccgagagtcc ccgccacagc agcagccacc 3060
 tcggctgccc cgggaggtgg aggcggggca acggctgcgg gcagggctgc tgcctcaca 3120
 cctgcctgag gtggtggccg gcctcagctg cgccttcata gtgctggtct tcgtcactgt 3180
 cttcctggtc ctgcagctgc gctctggctt tagttttcgg ggggtgaagg tgtacaccat 3240
 ggaccgtggc ctcatctcct acaaggggct gccccctgaa gcctggcagg aggagtgcc 3300
 gtctgactca gaagaggacg agggccgggg cgagaggacc gcctttatca aagaccagag 3360
 cgcctctga tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg tgccttctag 3420
 ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 3480
 tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 3540
 ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 3600
 caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg 3660
 ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt 3720
 tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccttagcg cccgctcctt tcgctttctt 3780
 cccttccttt ctgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc ggggatccc 3840
 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga 3900
 tggttcaagt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcctttga cgttgagtc 3960
 cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgg 4020
 ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggtaa aaaatgagct 4080
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggtgtgga 4140
 aagtccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc 4200
 aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct 4260
 caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgcc taactccgcc 4320
 cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg cagaggccga 4380
 ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 4440
 cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgtat atccattttc ggatctgatc agcacgtgat 4500
 gaaaaagcct gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgatcgaag agtccgacag 4560
 cgtctccgac ctgatgcagc tctcggaggg cgaagaatct cgtgctttca gcttcgatgt 4620
 aggagggcgt ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatggtttct acaaagatcg 4680
 ttatgtttat cggcactttg catcgccgc gctccgatt ccggaagtgc ttgacattgg 4740
 ggaattcagc gagagcctga cctattgcat ctcccgcct gcacagggtg tcacgttgca 4800
 agacctgct gaaaccgaac tgcccgtgt tctgcagccg gtcgaggagg ccatggatgc 4860
 gatcgtgctg gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaat 4920

ES 2 742 724 T3

cgggtcaatac actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca 4980
 ctggcaaaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc tcgatgagct 5040
 gatgcttttg gccgaggact gccccgaagt ccggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc 5100
 caacaatgtc ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga gcgaggcgat 5160
 gttcggggat tcccaatacg aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggcttg 5220
 tatggagcag cagacgcgct acttcgagcg gaggcacccg gagcttgacg gatcgccgcg 5280
 gctccgggcg tatatgctcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg 5340
 caatttcgat gatgcagctt gggcgcaggg tcgatgcgac gcaatcgtcc gatccggagc 5400
 cgggactgtc gggcgtacac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg 5460
 tgtagaagta ctcgccgata gtggaaaccg acgccccagc actcgtccga gggcaaagga 5520
 atagcacgtg ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg 5580
 aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 5640
 cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat 5700
 cacaaatttc acaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact 5760
 catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc 5820
 atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg 5880
 agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgccctaatga gtgagctaac tcacattaat 5940
 tgcgttgccg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 6000
 aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttectcgct 6060
 cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 6120
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 6180
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 6240
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 6300
 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 6360
 cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 6420
 atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 6480
 gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtottgagtc 6540
 caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 6600
 agcggaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 6660
 tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 6720
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 6780

ES 2 742 724 T3

gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 6840
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa 6900
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 6960
atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 7020
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 7080
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 7140
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgcga gaagtgggtcc 7200
tgcaacttta tccgcctcca tccagtttat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 7260
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg 7320
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 7380
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggc cctccgatcg ttgtcagaag 7440
taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7500
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 7560
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc 7620
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 7680
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc 7740
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 7800
cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atggtgaata ctcaactct tcctttttca 7860
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7920
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7980
c 7981

<210> 2
<211> 2385
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

atggagctga ggccctgggt gctatgggtg gtagcagcaa caggaacctt ggtcctgcta 60
gcagctgatg ctcagggcca gaaggtcttc accaacacgt gggctgtgcg catccctgga 120
ggcccagcgg tggccaacag tgtggcacgg aagcatgggt tcctcaacct gggccagatc 180
ttcggggact attaccactt ctggcatcga ggagtgcga agcggtcctt gtcgcctcac 240
cgcccgcggc acagccggct gcagagggag cctcaagtac agtggctgga acagcaggtg 300
gcaaagcgac ggactaaacg ggacgtgtac caggagccca cagaccccaa gtttcctcag 360
cagtggtagc tgtctgggtg cactcagcgg gacctgaatg tgaaggcggc ctgggcgcag 420

ES 2 742 724 T3

ggctacacag ggcacggcat tgtggtctcc attctggacg atggcatcga gaagaaccac 480
 ccggacttgg caggcaatta tgatcctggg gccagttttg atgtcaatga ccaggaccct 540
 gacccccagc ctcggtacac acagatgaat gacaacaggc acggcacacg gtgtgcgggg 600
 gaagtggctg cgggtggccaa caacggtgtc tgtggtgtag gtgtggccta caacgccccg 660
 attggagggg tgcgcatgct ggatggcgag gtgacagatg cagtggaggc acgctcgctg 720
 ggcctgaacc ccaaccacat ccacatctac agtgccagct ggggccccga ggatgacggc 780
 aagacagtgg atgggccagc ccgcctcgcc gaggaggcct tcttccgtgg ggttagccag 840
 ggccgagggg ggctgggctc catctttgtc tgggcctcgg ggaacggggg ccggaacat 900
 gacagctgca actgcgacgg ctacaccaac agtatctaca cgctgtccat cagcagcgcc 960
 acgcagtttg gcaacgtgcc gtggtacagc gaggcctgct cgtccacact ggccacgacc 1020
 tacagcagtg gcaaccagaa tgagaagcag atcgtgacga ctgacttgcg gcagaagtgc 1080
 acggagtctc acacggggcac ctcagcctct gcccccttag cagccggcat cattgctctc 1140
 accctggagg ccaataagaa cctcacatgg cgggacatgc aacacctggt ggtacagacc 1200
 tcgaagccag cccacctcaa tgccaacgac tgggccacca atggtgtggg ccggaagtg 1260
 agccactcat atggctacgg gcttttggac gcaggcgcca tgggtggcct ggcccagaat 1320
 tggaccacag tggcccccca gcggaagtgc atcatcgaca tcctcaccga gcccaaagac 1380
 atcgggaaac ggctcgaggt gcggaagacc gtgaccgctg gcctgggcca gcccaaccac 1440
 atcactcggc tggagcacgc tcaggcgcgg ctccacctgt cctataatcg ccgtggcgac 1500
 ctggccatcc acctggtcag ccccatgggc acccgctcca ccctgctggc agccaggcca 1560
 catgactact ccgcagatgg gtttaatgac tgggccttca tgacaactca ttctgggat 1620
 gaggatccct ctggcgagtg ggtcctagag attgaaaaca ccagcgaagc caacaactat 1680
 gggacgctga ccaagttcac cctcgactc tatggcaccg cccctgaggg gctgcccgta 1740
 cctccagaaa gcagtggctg caagaccctc acgtccagtc aggcctgtgt ggtgtgcgag 1800
 gaaggcttct ccctgcacca gaagagctgt gtccagcact gccctccagg cttcgcccc 1860
 caagtctcg atacgcacta tagcaccgag aatgacgtgg agaccatccg ggccagcgtc 1920
 tgcgccccct gccacgcctc atgtgccaca tgccagggggc cggccctgac agactgcctc 1980
 agctgcccc a gccacgcctc cttggaccct gtggagcaga cttgctccc gcaaagccag 2040
 agcagccgag agtccccgcc acagcagcag ccacctoggc tgccccgga ggtggaggcg 2100
 gggcaacggc tgcggggcagg gctgctgccc tcacacctgc ctgaggtggt ggccggcctc 2160
 agctgcgcct tcatcgtgct ggtcttcgtc actgtcttcc tggtcctgca gctgcgctct 2220
 ggctttagtt ttcggggggt gaaggtgtac accatggacc gtggcctcat ctctacaag 2280
 gggctgcccc ctgaagcctg gcaggaggag tgcccgtctg actcagaaga ggacgagggc 2340
 cggggcgaga ggaccgcctt tatcaaagac cagagcgccc tctga 2385

ES 2 742 724 T3

<210> 3
 <211> 794
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205

ES 2 742 724 T3

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350

Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415

Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460

ES 2 742 724 T3

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu
 705 710 715 720

ES 2 742 724 T3

Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu
725 730 735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met
740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln
755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg
770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu
785 790

<210> 4

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio de reconocimiento de consenso de furina

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> X es cualquier aminoácido, o no aminoácido

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> X es lisina o arginina

20

<400> 4

Arg Xaa Xaa Arg

1

25

REIVINDICACIONES

1. Célula transformada que comprende:
 - 5 una primera secuencia de nucleótidos que codifica para una furina humana, tal que la célula transformada expresa y secreta furina funcional en un sobrenadante de cultivo; en la que la furina se secreta a una concentración de 50 U/ml a 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante de 36 a 78 horas, y
 - 10 una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un factor X.
2. Célula transformada según la reivindicación 1, en la que la primera secuencia de nucleótidos que codifica para la furina humana y la segunda secuencia de nucleótidos que codifica para el factor X están en diferentes vectores de expresión o en el mismo vector de expresión.
- 15 3. Célula transformada según la reivindicación 2, en la que el vector de expresión es un vector viral o un vector no viral.
4. Célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la furina funcional se secreta a una concentración de al menos de 50 a 60 U/ml en el sobrenadante de cultivo, preferiblemente en la que la furina funcional se secreta a una concentración de al menos de aproximadamente 90 a aproximadamente 100 U/ml en el sobrenadante de cultivo.
- 20 5. Célula transformada según la reivindicación 4, en la que al menos el 90% del factor X producido por la célula transformada está completamente procesado, preferiblemente en la que al menos el 95% del factor X producido por la célula transformada está completamente procesado.
- 25 6. Célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la célula se genera a partir de una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de embrión humano, células de riñón de primate, fibroblastos y células de mieloma de ratón.
- 30 7. Célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende un ácido nucleico que codifica para una vitamina K epóxido reductasa (VKOR) humana.
- 35 8. Método de preparar una proteína recombinante que comprende:
 - 40 transfectar una línea celular adecuada para la expresión de proteínas de mamífero con un primer vector de expresión adaptado para la expresión de furina humana por la línea celular, y un segundo vector de expresión adaptado para la expresión de una proteína por la línea celular, y en el que el segundo vector de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para un factor X;
 - 45 en el que la línea celular transfectada con el primer y el segundo vector de expresión expresa y secreta una furina humana funcional a una concentración de 50 U/ml a 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante de 36 a 78 horas, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante de 42 a 72 horas.
- 50 9. Método según la reivindicación 8, en el que la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y el segundo vector de expresión sustancialmente de manera simultánea.
- 55 10. Método según la reivindicación 8, en el que la línea celular se transfecta con el primer vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de furina antes de transfectar la línea celular con el segundo vector de expresión, o en el que la línea celular se transfecta con el segundo vector de expresión y se obtienen células que secretan niveles estables de la proteína antes de transfectar la línea celular con el primer vector de expresión.
- 60 11. Método de producir factor X completamente procesado y maduro, que comprende cultivar la célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para producir el factor X completamente procesado y maduro a partir del sobrenadante de cultivo.
- 65 12. Método de producir la célula transformada según la reivindicación 1, comprendiendo el método transfectar una línea celular adecuada para la expresión de proteína de mamífero con un vector de expresión que incluye una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de furina humana y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un factor X, y seleccionar una célula transformada que expresa y secreta una furina humana funcional a una concentración de 50 a 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante de 36 a 78 horas, preferiblemente a una concentración de

aproximadamente 300 U/ml en el sobrenadante de cultivo después del cultivo durante de 42 a 72 horas.

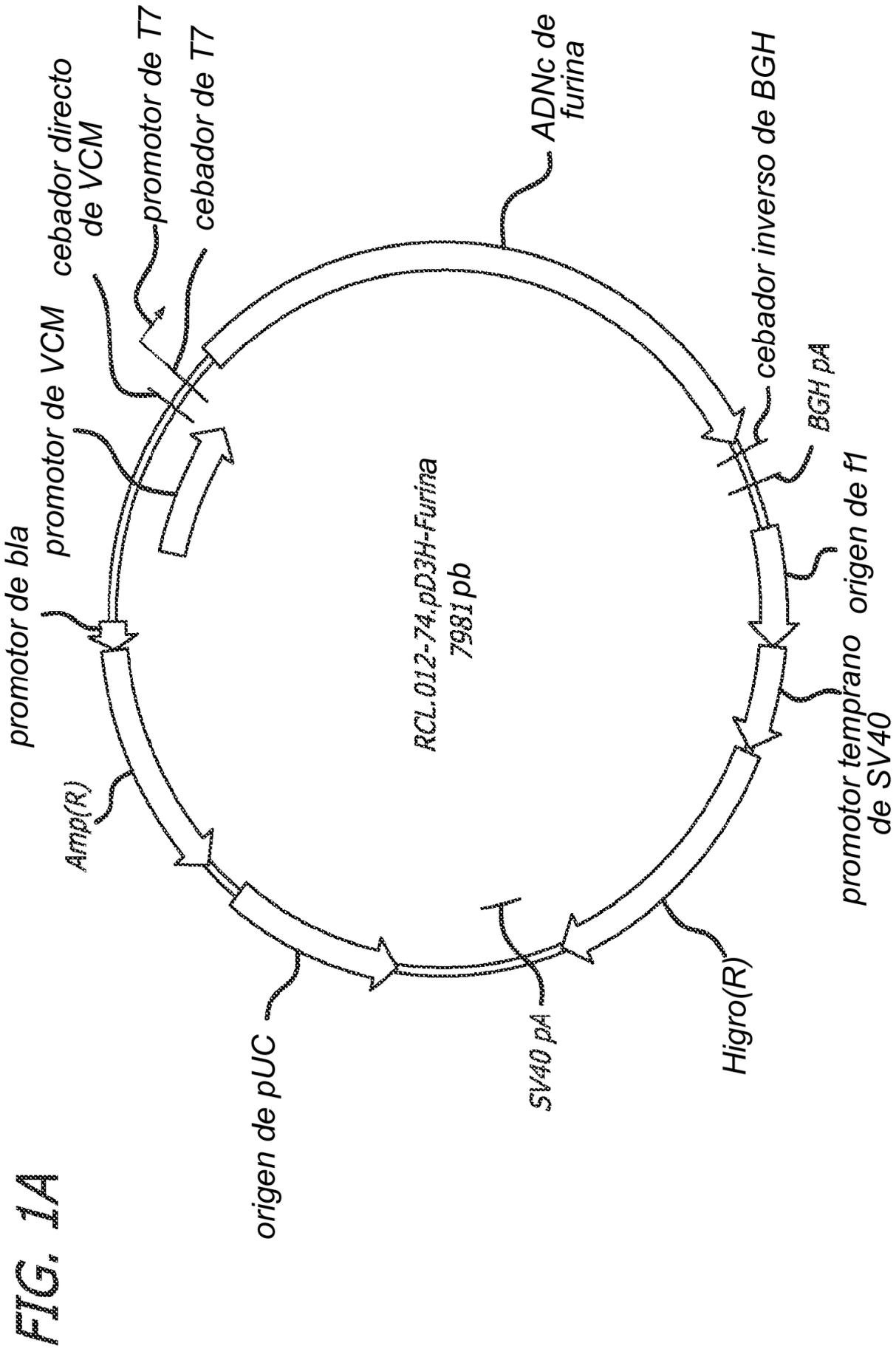


FIG. 1A

GAGGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCT
 GCTTGTGTTGGAGTTCGCTAGTAGTCCGAGCAAAAATTTAAGCTACAACAAGCAAGCTTGAACCGACAAATTGCATGAAGAAATCT
 GCTTAGGGTTAGGCGTTTTCGGCTGCTTCGGATGTACGGCCAGATATACGGCTTGACATTTGACTAGTTATTAATAGTAAT
 CAATTACGGGTCAFTAGTTCAATAGCCCATATAAGGAGTTCGGCTTACAFAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
 GACCCCGCCCATTTGACGTCATAAATGACGTAATTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGACTTTTCCATTGACGTCAAATGGGTGGACTAFTT
 ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAATTGACGTCAAATGACGGTAAATGSCCCGCT
 GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTTATTAGTCACTGCTATTACCATGGTGTATGGG
 TTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTGTACTACCGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAAATGGGAGTTTGT
 TTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
 TCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACHTAGAGAAACCCACIGCTTFACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA
 GCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCGACAGATATCCAGCACAGTGGC
 GGCCGATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTCTGTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAA
 GGTCTTCAACCAACAGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAAACAGTGTGGCACGGAAAGCATGGGTTCTCAACCTGG
 GCCAGATCTTCGGGACTATPACCACTTCTGGCAFTGGAGGAGTGAAGAGCGGTCTCTGCTCAACCGCCCGGGCACAGCOGGCTG
 CAGAGGGAGCCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACACAGCAGGTGGCAAGCGGACTAAACGGGACGTTGTACCAGGAGCCCAACAGACCCCAA
 GTTCTCTCAGCAGTGGTACCTGTGTGTGTCACTCAGCGGACTTGAATGTGAAGCGGCCCTGGCGCAGGGCTACACAGGGCCACGGCA
 TTTTGGTCTCCATTTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCCACCGGACTTGGCAGGCAATTTATGATCCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAAT
 GACCAGGACCCCTGACCCCGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGCCACCGCACCGTGTGTCGGGGGAAGTGGCTGCGGTGGC
 CAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCCCTACAACCGCCCGCATTTGGAGGGTGCCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGG
 AGGCACGCTCGCTGGCCCTGAACCCCAACCCACATCCACATCTACAGTCCAGTGGGCCCCCGAGGATGACGGCCAGACAGTGGATGGG
 CCAGCCCGCTCGCCGAGGAGCCCTTCTTCGGTGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGCTGGCTCCATCTTTTGTCTGGGCCCTCGGGGAA
 CGGGGCCGGGAACATGACAGCTGCAACTGGGACGGCTACACCAACAGTATCTACAGCTGTCCATCAGCAGGCCACCGCAGTTTGGCA
 ACGTCCGTGGTACAGGAGGCCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACTACAGCAGTGGCAACCCAGAAATGAGAAGCAGATCGTGACCGACT
 GACTTGGCCAGAAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCCTTGGCCCTTAGCAGCCGGCATCATTTGCTCTCACCCCTGGAGGC
 CAATAAGAACCTCACATGGCGGACATGCAACACCTGGTGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACTCAATGCCAACGACTGGGCCACCA
 ATGGTGTGGCCGGAAAGTGAACCTCATATGGCTACCGGCTTTTGGACCGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAAGAAATGGACCCAA
 GTGGCCCCAGCGGAGTGCATCATCGACATCTCACCGAGCCCAAGACATCGGGAACCGGCTCGAGGTGCGAAGACCGTGAACCGC
 GTGCCTGGCGAGCCCAACCATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGGGCTCACCTGTCTCTATAATCGCCGTGGCGACTGGCCA
 TCCACCTGGTCAAGCCCATGGGCACCCGCTCCACCTGTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGTAAATGACTGGGCC
 TTTCAATGACAACTCAFTCTGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGTCTTAGAGATTTGAAAACACCCAGCGAAGCCAACTATGGGAC
 GCTGACCAAGTTCAACCTCTACTCTATGGCAACCGCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCCTCAAGT

FIG. 1B

CCAGTCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCCAA
 GTCCTCGATACGCACTATAGCACCGAGAAATGACGTGAGACCATCCGGCCAGCGTCTGCGCCCTGCCACGCCCTCATGTGCCACATG
 CCAGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACGCCCTCTGGACCTGTGGAGCAGACTTGTCTCCCGGCAAAGCCAGA
 GCAGCCGAGAGTCCCAGCCACAGCAGCAGCCACTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGCGGGGCAA CGGCTGCGGCGAGGCTGTGCCCC
 TCACACCTGCCTGAGGTGTGGCCGGCTCAGCTGGCCCTTCATCGTGTGGTCTTCGTCACCTGCTTCCCTGGTCCCTGCAGCTGGCTC
 TGGCTTTAGTTTTCCGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCCGTGGCTCACTCCTACAAAGGGCTGCCCCCTGAAGCCCTGGCAGGAGG
 AGTGCCCGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGCGGGCGGAGAGGACCGCCCTTATCAAGACCAGAGCGCCCTCTGATCTAGAGGGCCC
 GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTGGCCCTCCCGGCTTCCCTTGACCTTGGACCTTGA
 AGTGGCCACTCCCACCTGTCTTCTTAAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTTGCTTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGG
 TGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAATCTGGGATCGGTTGGCTTAAGGCTTCTGAGGCGGAAAGA
 ACCAGCTGGGCTCFAGGGGTATCCCCACGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGTGTGGTTACCGCCAGCGGTGACCGC
 TACACTTGGCCAGCCCTAGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAA
 ATCGGGCAATCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTCTTTACGGCACCTCGACCCCAAATACTTGATAGGGTGTGATGTTACGTTAGTGGG
 CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTTAAATAGTGGACTCTTTCCAAACTGGAACAACACT
 CAACCTATCTCGTCTATTTCTTTGATTTATAAGGATTTTGGGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
 TTAACGGCAATTAATCTGTGGAATGTGHTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCAGGAGGCAAGATGCAAAAGCATGCAAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCAGCAGGAGAGATGCAAAAGCATGCAATCTCAATTAGTCAGC
 AACCATAGTCCGCCCTAACCTCCGCCCATCCCGCCCTAATCCCGCCATTTCCCGCCCATTTCCCGCCCATGGCTGACTAATTTT
 TTAATTTAGCAGAGCCGAGCCGCTCGCTCTGAGCTATTCCAGAAGPAGTGAAGGCTTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTTTGCAAA
 AAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCIGAACTCACCGGACGTCGTGCGAGAAGTT
 TCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGCGAAGAACTCTCGTCTTTCCAGCTTCGATGTAGGAGGGC
 GTGGATATGCTCTGGGTAATAGCTGGCCGATGGTTTCTACAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTTGCATCGGCCCGCTCCCG
 ATTCGGGAAGTCTTGACATTTGGGAATTCAGCCGAGAGCTGACCTATTGCACTCCCGCCGTGCACAGGGTGTCAAGTTGCAAGACCT
 GCCTGAAACCGAACTGCCCTGTCTGACCCGGTTCGGGAGGCCATGGAATCGATCGCTGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
 TCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGAATTCATATGCGCGATTTGCTGATCCCCTATGTATCACTGG
 CAAACTGTGATGGACGACACCCTCAGTGGCTCGTCCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCCGAAGTCCC

FIG. 1B (cont.)

GCACCTCGTGCAAGCGGATTTGGCTCCAACAATGTCTTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGGAGCGAATGT
 TCGGGATTCCTCCAAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGAGCAGCAGCAGACGCGTACTTCCAGCGG
 AGGCATCCGGAGCTTGACAGGATCGCCCGGCTCCGGGGTATATGCTCCGCATTTGGCTTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACCG
 CAAATTCGATGATGCAGCTTGGCGCAGGTCGATCGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGGGTACACAAATCGCCC
 GCAGAAGCGCGGCTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGGACCGCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAAG
 GAATAGCACGTGTACGAGATTTGATTTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGCTTCCGAAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGAT
 GATCCTCCAGCGCGGATCTCATGTGGAGTTCTTCCGCCACCCCAACTTGTATATGTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATA
 GCATCACAAATTTACAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCATTTAGTTGTGGTTTTGCCAAAACCTCATCAATGATCTTTATCAATGTCTGT
 ATACCGTCCACCTTAGCTAGAGCTTGGCGTAAATCATGGTCAATAGCTGTTTTCCGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAAA
 CATACGAGCCGGAAACATAAAGTAAAGCCCTGGGTGCTAATGAGTACTAATGAGTAACTACATTAATTTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTT
 TCCAGTCCGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAAATCGGCCAAACCGCGGGGAGAGCCGGTTTTCCGTAATTTGGCGCTCTTCCGCT
 TCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGTTCGGCTGCGGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCCGTAATAACGGTTATCCACAGA
 ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAACCGTAAAAAGGCCCGCTTGTGGCGTTTTTFC
 ATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
 TTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCGGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
 GGCGTTTTCTCAATGCTCACCGCTGATGATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCAACCGAACCCCGCTC
 AGCCCGACCCGCTGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCACCCGGTAAGACACGACTTATCCGCACITGGCAGCAGCCACTGGT
 AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTT
 TGGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCCAGCTGGTAGCGGTG
 GTTTTTTTTGGCAAGCAGCAGATTACCGGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACCGCTCAG
 TGGAACGAAACTCACGTTAAGGATTTGGTCAATGAGATTAACAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAAATAAATAAAGATTT
 TAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
 TTCCGTTCCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
 CCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCCAAGCCGGAAGGCGCAGAAAGTGGTCTCTGCAACTTT
 ATCCGCTCCATCCAGTCTATPAATTTGTTCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTGTTCGCTAGTTAATAGTTTGGCAACGTTTGTGCCAATG
 CTACAGGCAATCGTGGTGTACCGCTCGTTTTGGTATGGCTTCAATTCAGTCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGGGAGTTACATGATCCCCC

FIG. 1B (cont.)

ATGTTGTCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCCAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATTCACTCATGGTTATGGC
 AGCACTGCATAATTCCTTACTGTGTATGCCATCCGHAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTC TGAGAAATAGT
 GTAIGCGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGGTCAATAACGGGATAATAACCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTTGGA
 AAACGTTCTTCGGGGGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCCAACTGATCTTC
 AGCATCTTTTACTTTCACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACCGAAAT
 GTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAAATATTTGAAAGCATTATCAGGGTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTTTGAATGTATT
 TAGAAAAATAAACAAAATAGGGTTCCGGGCACATTTCCCCGAAAAGTGCACCTGACGTC

FIG. 1B (cont.)

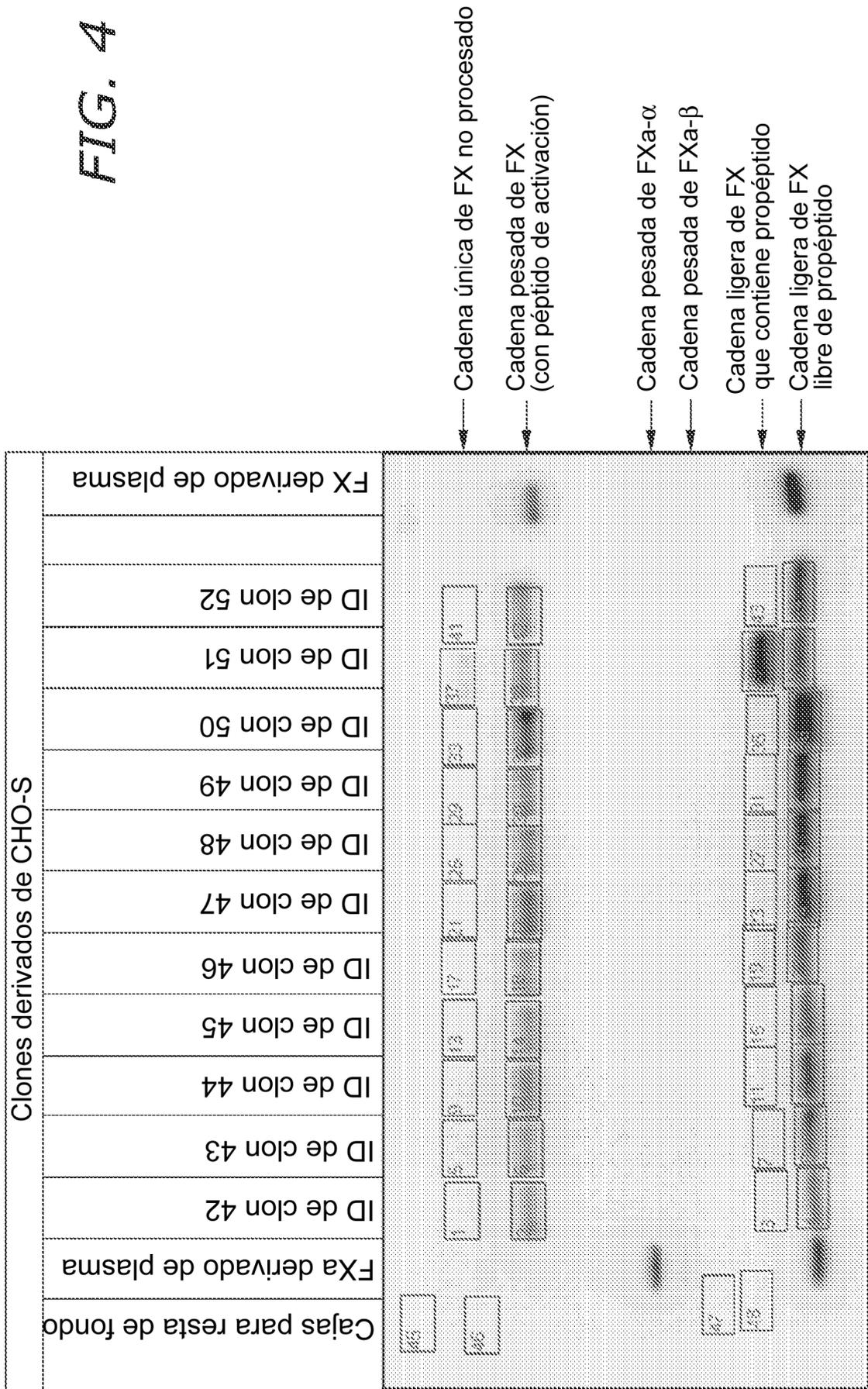
ATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTGTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTT
 CACCAACACAGTGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCCCAGCGGTGGCCAAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGTTCCCTCAACCTGGGCCCAGA
 TCTTCCGGGACTATACCACTTCTGGCAFCGAGGAGTGAACGAAGCGGTCCCTGTCCCTCACCGCCCGGGCACAGCCGGCTGCAGAGG
 GAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAAGCGACTAAACGGGACGTTGACACAGGAGCCACAGACCCTCAAGTTTCC
 TCAGCAGTGGTACCTGTCTGTGTCACTCAGCGGACCTGAATGTGAAGGGCCCTGGGGCAGGGCTACACAGGGCACGGCATTTGFG
 TCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACACCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCTTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGACCAG
 GACCTGACCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAAACAGGACCGGCACACGGTGTGGGGGAAAGTGGCTGGGTGGCCAAACAA
 CGGTGTCTGTGGTGTAGGTGGCTACAACGCCCGCATTTGGAGGGTGGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGGAGGCAC
 GCTCGCTGGGCTGAACCCCAACACATCCACATCTACAGTCCAGCTGGGGCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGCC
 CGCTCGCCGAGGAGCCTTCTTCCGTGGGTAGCCAGGGCCGAGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCTCGGGGAAACGGGGG
 CCGGAAACATGACAGCTGCAACTGGACGGCTACACCAACAGTACTACACGCTGTCCATCAGCAGGCCACCGCAGTTTGGCAACCTGTC
 CGTGGTACAGCGAGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACCAAGATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTG
 CGGCAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCATTTGCTCTCACCTGGAGGCCAAAFAA
 GAACCTCACATGGCCGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACTCGAAGCCAGCCACCTCAATGCCAAACGACTGGGCCACCAATGGTG
 TGGCCGGAAAGTGAAGCCTCATATGGTACGGGCTTTGGACGACGGCCATGTTGGCCCTGAGAAATGGACCAACAGTGGCC
 CCCAGCGGAAGTGCATCGACATCCTCACCGAGCCAAAGACATCGGAAACGGCTCGAGGTGGGAAGACCCTGACCGCGTGCCT
 GGGGAGCCCAACACATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGGCGGCTCACCTGTCCCTATAATGCCCGTGGGACCTGGGCCATCCACC
 TGGTCAGCCCATGGGCACCCGCTCCACCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTAATGACTGGGCCCTTCATG
 ACAACTCATTCCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGTCTTAGAGATFGAAAACACCAGGGAAGCCAAACAACTATGGGACGCTGAC
 CAAGTTCAACCTCGTACTATGGCAACCGCCCTGAGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCCAAGACCCTCACGTTCCAGTC
 AGGCTGTGTGGTGTGGAGGAGGCTTCTCCCTGCAACCAAGAGACTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCCGCCCCCAAGTCCCTC
 GATACGCACTATAGCACCGAGAAATGACGHTGGACCCATCCGGGCCAGCGTCTGGGCCCTCATGTGCCACATGGCCAGG
 GCCGGCCCTGACAGACTGCCCTCAGCTGCCCCAGCCAGCCTCTGGACCTGTGGAGCAGACTTGTCTCCGGCAAGCCAGAGCAGCC
 GAGAGTCCCGCCACAGCAGCAGCCACTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGTGCCCTCACAC
 CTGCCCTGAGGTGGTGGCCGCTCAGCTGGCCTTCATCGTGTGGTCTTCTGTCACTGTCTTCCYGGTCCCTGACGCTGGCTCTGGCTT
 TAGTTTTCCGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCCTCATCTCCYTAACAGGGCTGCCCCCTGAAGCCCTGGCAGGAGGAGTGCC
 CGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGGAGAGGACCGCCCTTATCAAAGACAGAGCGGCCCTCTGA

FIG. 2

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGGKVFNTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQR
 EPQVQWLEQQVAKRRTRKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQQYTGHGIVVSI LDDGI EKNHPDLAGNYDFGASFDVNDQ
 DPDFQPRYTQMNDRHGTRCAGEVAAVANNVCGVGVAYNARIGGVRMLDCEVTDAVEARSLGLNPNHHIHIYSASWGPEDDDGKIVDGP
 RLAEAEAFRRGVSQGRGGLGSI FVWASGNGGREHDSNCDCGYTNSIYTLSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDL
 RQKCTESHTGTSASAPLAAGI IALITLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVA
 PQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQAARLTLSYNRRGDLAHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFM
 TTRSWDEDPGSEWVLEIENTSEANNYGTLLTKFTLVLYGTAPRGLFVPPPESSGCKTLTSSQACVCEEGFSLHQKSCVQHCPCPGFAPQVL
 DTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPASHALDPVEQTCRSRQSSRESPPQQPPRPPRPPVEAGORLEAGLLPSH
 LPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVQLRSGFSFRGVKVVYTMDRGLISYKGLPPEAWQEECPSSDSEDEGRGERTAFIKDQSAI

FIG. 3

FIG. 4



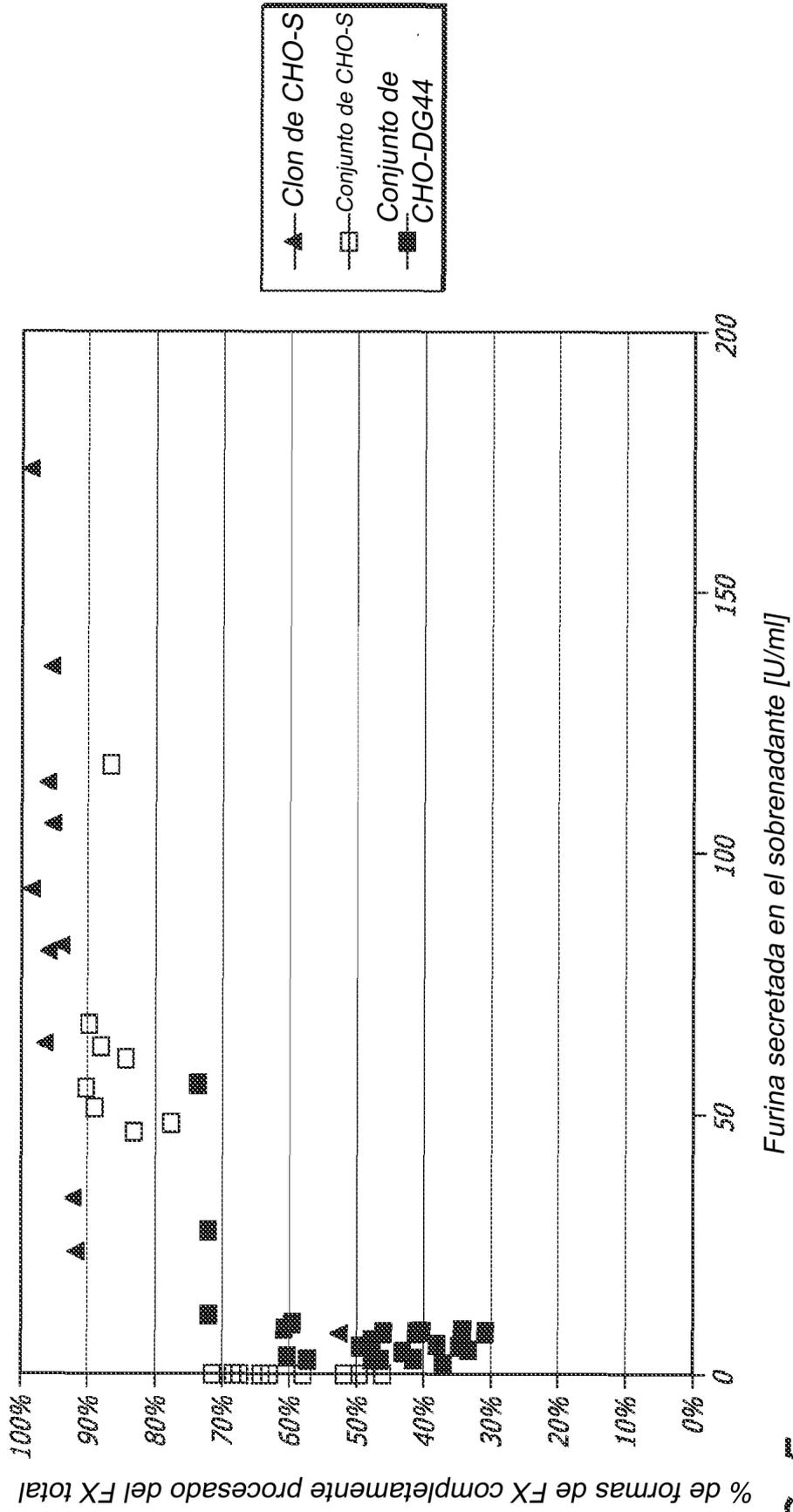
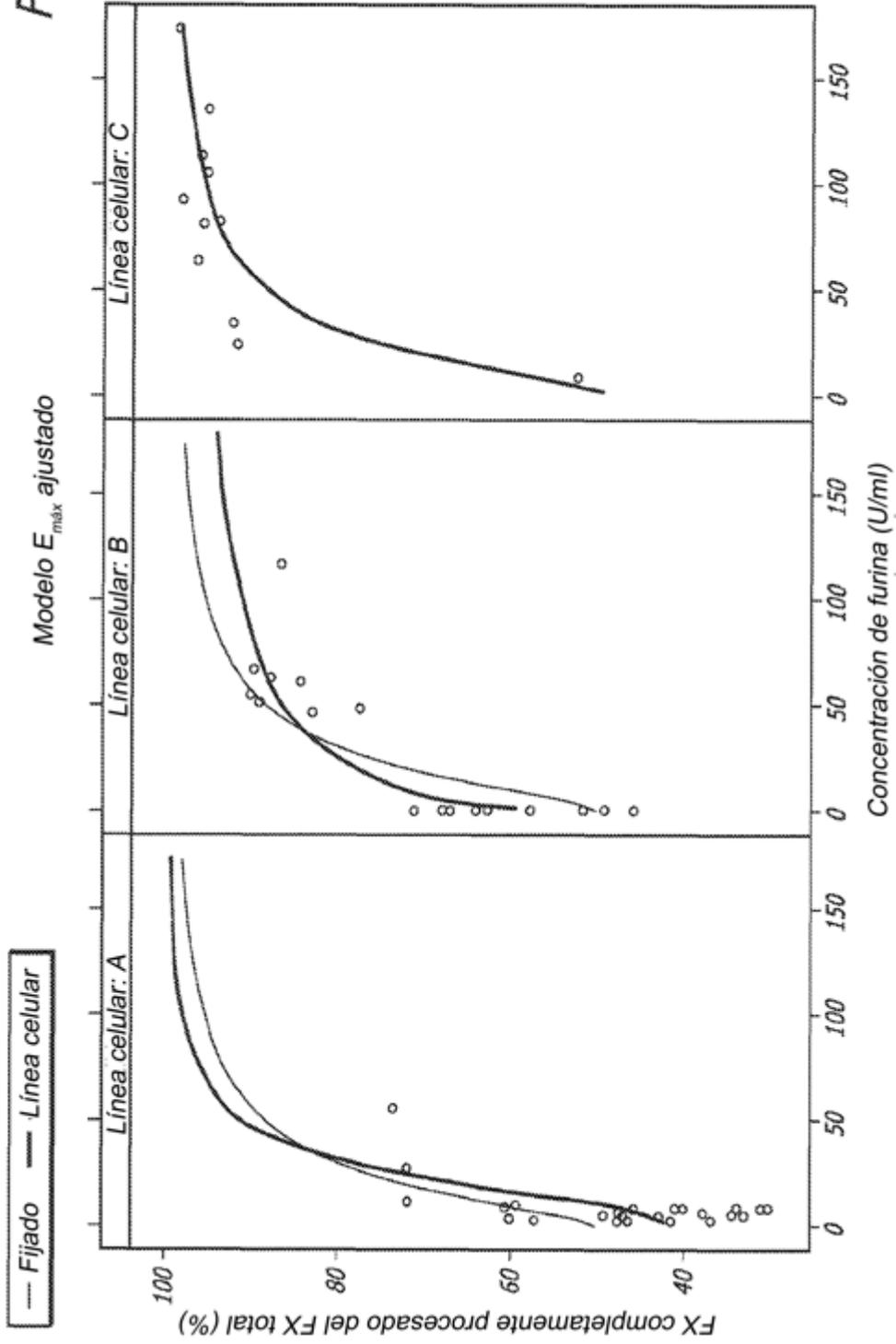


FIG. 5

FIG. 6



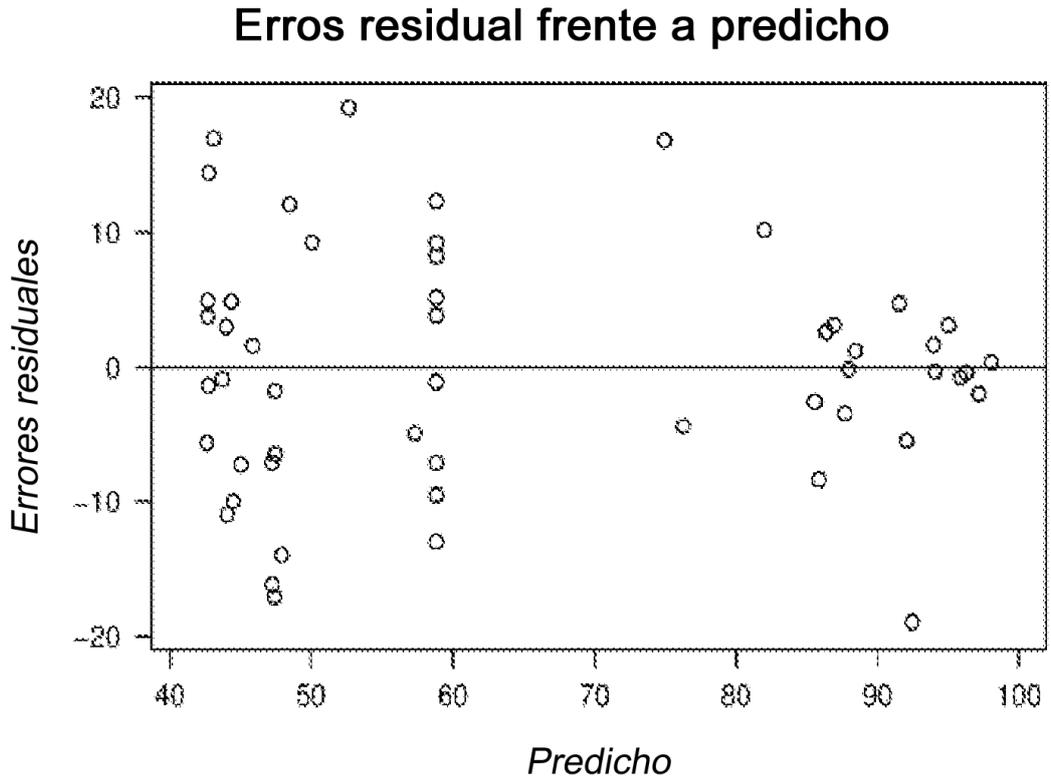


FIG. 7A

Gráfico Q-Q normal para errores residuales

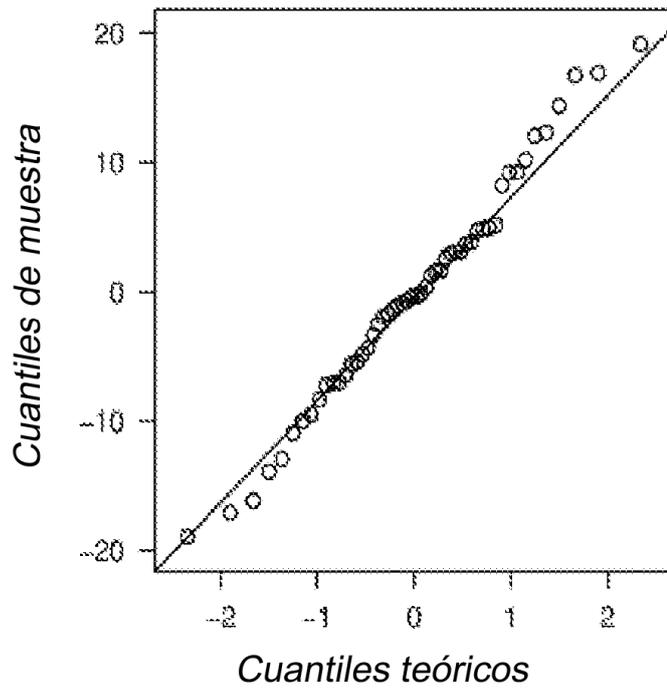


FIG. 7B

Errores residuales frente a líneas celulares

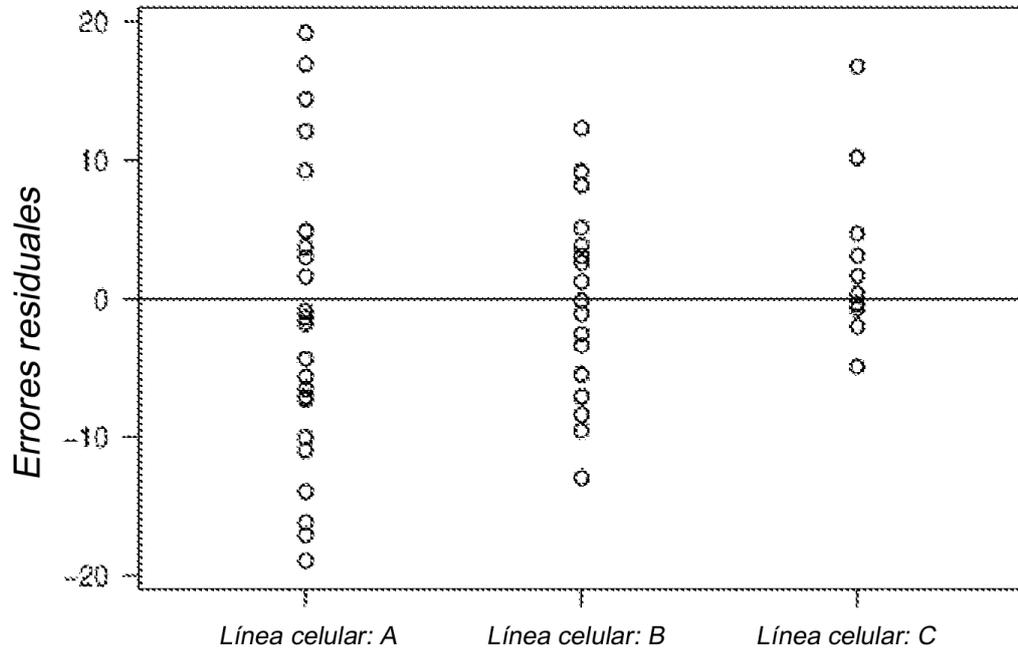


FIG. 7C

Observado frente a predicho

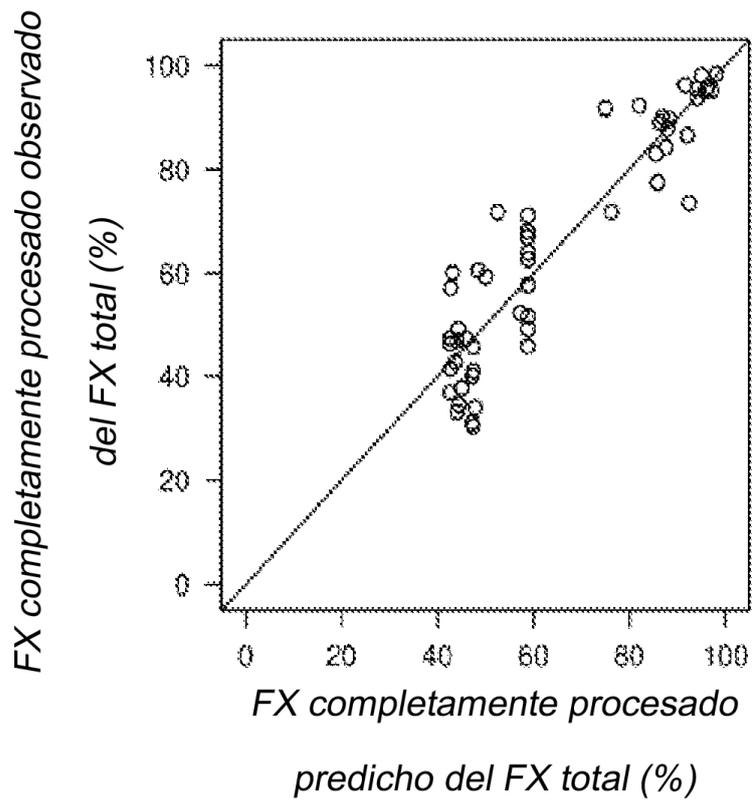
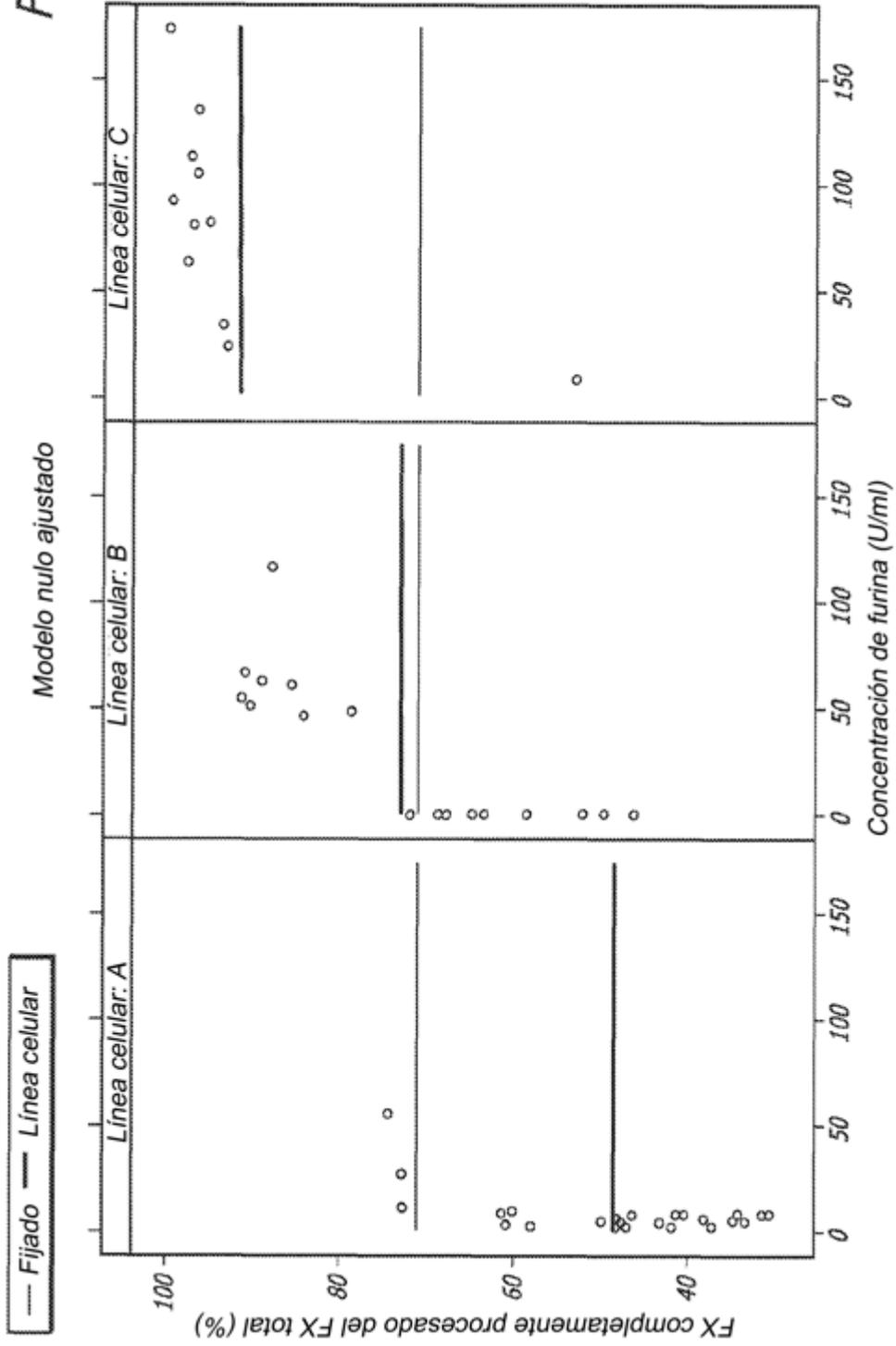


FIG. 7D

FIG. 8



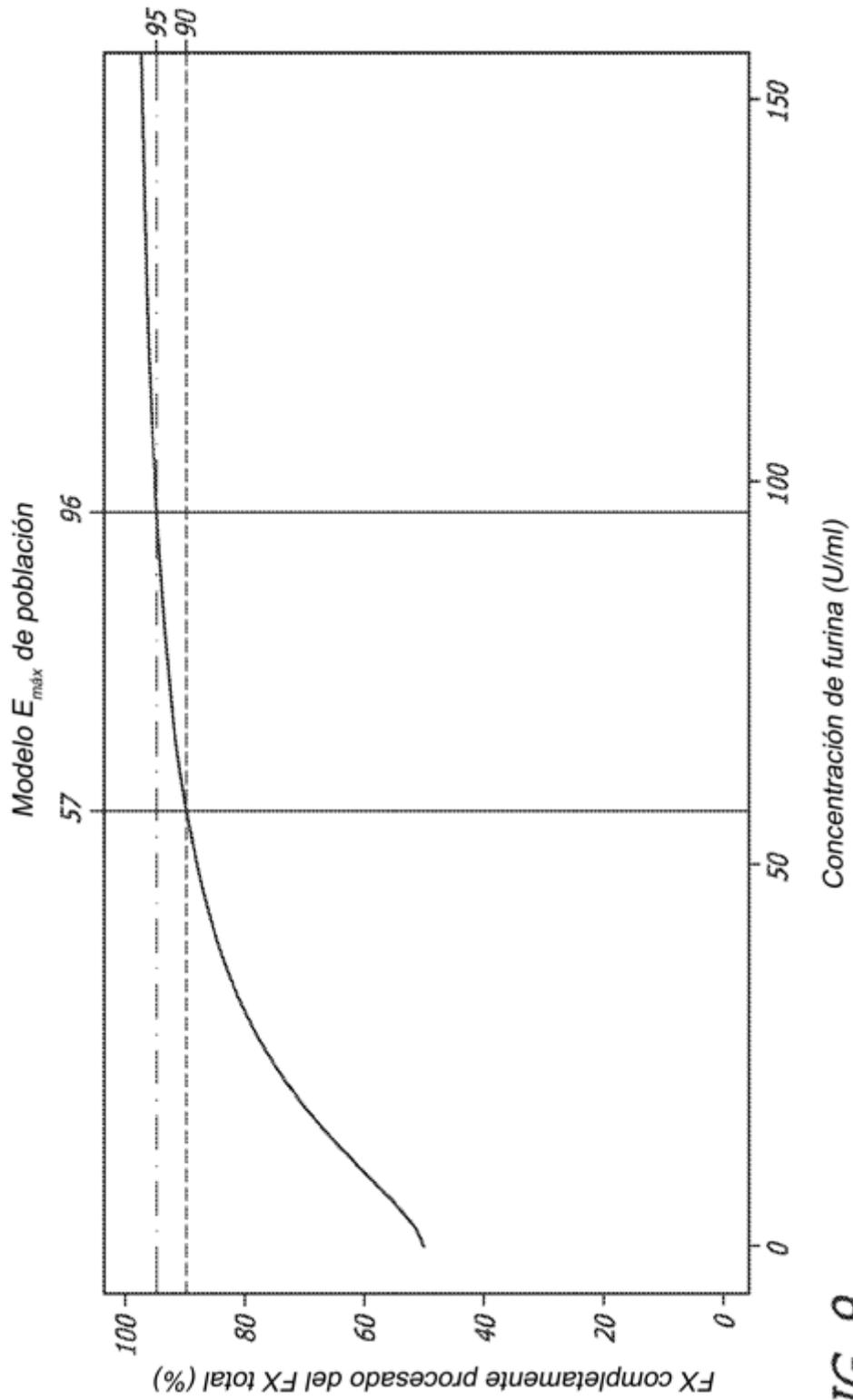


FIG. 9