



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 022**

51 Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99955836 .4**

96 Fecha de presentación : **05.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1127154**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

54 Título: **Método para la producción de FVII.**

30 Prioridad: **06.11.1998 DK 1998 01436**
09.11.1998 DK 1998 01439

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Wöldike, Helle;**
Wiberg, Finn, C. y
Nielsen, Lars, Soegaard

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 315 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de FVII.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la liberación de alta eficiencia de proteínas recombinantes en células eucarióticas o más específicamente, para aumentar la secreción de factor VII por coexpresión con endoproteasa Kex2 en células cultivadas de origen mamífero.

10 **Antecedentes de la invención**

Avances en el cultivo celular y tecnologías de ADN recombinante han facilitado la expresión de una variedad de proteínas de valor terapéutico u otro valor económico usando células creadas genéticamente. La expresión de muchas proteínas terapéuticas biológicamente activas, que son derivadas de fuentes eucarióticas superiores, frecuentemente requiere modificaciones específicas postraduccionales que no se originan de forma natural en células eucarióticas o procarióticas inferiores, que por lo tanto necesitan el uso de células derivadas de fuentes eucarióticas superiores. Por ejemplo, la expresión de glicoproteínas en células mamíferas tiene la ventaja de suministrar proteínas que contienen glicosilación natural. Las glicoproteínas producidas a partir de mamíferos contienen fracciones de carbohidrato de cadena externa que son marcadamente diferentes de las fracciones de carbohidrato de cadena externa presentes en glicoproteínas producidas a partir de eucariotas inferiores. El uso de células mamíferas como huéspedes para la producción de proteínas de mamífero segregadas tienen la ventaja significativa sobre la secreción de eucariotas inferiores de que las células mamíferas tienen un sistema secretor que reconoce fácilmente y procesa de forma adecuada proteínas dirigidas a la secreción, que no es necesariamente verdadero para eucariotas inferiores.

La expresión eficaz de secuencias de codificación en huéspedes eucarióticos pueden también requerir la expresión de proteínas asociadas que son requeridas para el tratamiento, estabilización o modificación de la proteína para conseguir actividad biológica. La expresión óptima de proteínas recombinantes biológicamente activas puede también ser dependiente de la presencia de factores específicos de traducción y/o de transcripción. Estas proteínas pueden estar presentes en células huéspedes a niveles tan bajos que la expresión eficaz de proteínas recombinantes está limitada. Ejemplos de proteínas que requieren modificación específica postraduccionales incluyen determinados factores de coagulación, que requieren gamma-carboxilación de residuos específicos de ácido glutámico para la actividad biológica y pueden también requerir la conversión de residuos específicos de ácido aspártico a ácido beta-hidroxi aspártico para la actividad biológica.

La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes sanguíneos, o factores, que finalmente dan lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos que participan en la denominada cascada de coagulación son proenzimas o zimógenos, proteínas enzimáticamente inactivas que son convertidas en enzimas proteolíticamente activas por la acción de un activador que en sí mismo es un factor de coagulación activado. Los factores de coagulación que han sufrido tal conversión y generalmente llamados factores activos son designados añadiendo el sufijo "a" minúscula (p. ej. factor VIIa).

El factor VII es una glicoproteína traza del plasma que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo (Williams *et al.*, J. Biol. Chem. 264, 1989, págs. 7536-7543; Rao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, págs. 6687-6691). El Factor VII monocatenario puede ser convertido en factor VIIa bicatenario por el Factor Xa, Factor XIIa, Factor IXa o trombina *in vitro*. Se considera que el Factor Xa es un activador fisiológico importante del Factor VII. Como otras proteínas diferentes del plasma implicadas en la hemostasis, el Factor VII depende de la vitamina K para la expresión en una forma activa, la vitamina K siendo requerida para la γ -carboxilación de residuos múltiples de ácido glutámico reagrupados en el N-término de la proteína. El dominio conteniendo ácido γ -carboxiglutámico (Gla) es seguido de dos dominios que son homólogos al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) mientras que la parte de la serina proteasa ocupa la mitad C-terminal de la molécula.

Las proteínas implicadas en la cascada de coagulación son también frecuentemente procesadas hasta proteínas maduras por seccionamiento en los residuos de aminoácidos dibásicos. Así, el factor VII es sintetizado con un propéptido de 38 aminoácidos N-terminal, que es seccionado C-terminalmente por dos pares de argininas (R-R-R-R). Hay varias enzimas candidatas que pueden intervenir en este tratamiento *in vivo*, algunas de las cuales operan preferentemente en el retículo endoplásmico (ER) y algunas en el aparato de Golgi en una forma ligada a la membrana.

Otra modificación importante postraduccionales del factor VII es la gamma-carboxilación de 10 residuos de ácido glutámico localizados cerca del punto de seccionamiento del propéptido. La secuencia de eventos está indicada por el hecho de que la presencia del propéptido y su secuencia correcta parece importante para el proceso de gamma-carboxilación (Busby *et al.*, Curr. Adv. in Vit. K. Res. 173-181 (1987) y Ul-rich *et al.*, J. Biol. Chem. 263 (20) 9697-9702 (1988), que ocurre en el ER catalizado por una carboxilasa ligada a la membrana.

La endoproteasa Kex2 de levadura de *Saccharomyces* es una proteasa que procesa específicamente el precursor del α -factor de tipo acoplamiento y un factor asesino. Las propiedades de la endoproteasa Kex2 son indicadas como las

ES 2 315 022 T3

siguientes: (1) Kex2 secciona en el c-terminal de la secuencia Lys-Arg para la escisión del α -factor de tipo acoplamiento de su precursor, y en el C-terminal de la secuencia Lys-Arg y la secuencia Pro-Arg para liberar el factor asesino maduro; (2) se intentó una purificación de la misma, y se descubrió que la enzima está presente en una fracción de la membrana y que requiere iones de calcio para la activación de la misma; (3) Kex2 es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 100 a 120 K Dalton; (4) Kex2 secciona específicamente en el C-terminal de las secuencias Arg-Arg, Lys-Arg, y Pro-Arg (BBRC, 144, 807-814, 1987).

En WO 90/01550 los plásmidos se describen como portadores de unidades de expresión policistrónica que incluyen una guía intercistrónica. En US 5460950 (Barr *et al.*) las células huéspedes se describen expresantes de PACE, una endoproteasa humana, capaz de seccionar polipéptidos precursores donde la secuencia codificante de PACE y la secuencia codificante del polipéptido precursor está operativamente enlazada a una secuencia de control de la expresión que permite la coexpresión de las dos secuencias. Se dan ejemplos de coexpresión de PACE y vWF y de coexpresión de PACE y factor de coagulación IX.

EP 319944 (Mulvihill *et al.*) expone un método para la coexpresión de una proteína de interés y una segunda proteína que procesa la proteína de interés de alguna manera. Se dan ejemplos de coexpresión de la proteína C y KEX2, coexpresión del factor VII y factor IX, y coexpresión de trombina y KEX2.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método para la producción de factor VII que comprende

- a) cultivar una línea celular mamífera que comprende una secuencia de ADN codificante de la endoproteasa KEX2 o una variante de la endoproteasa KEX2, donde dicha variante es seleccionada del grupo que consiste en KEX2 1-613 y KEX2 1-674, y una secuencia de ADN codificante de FVII en un medio de cultivo adecuado, bajo condiciones donde dicha endoproteasa KEX2 o variante de endoproteasa KEX2 y dicho FVII son expresados; y
- b) aislar el Factor VII del medio.

La endoproteasa KEX2 puede ser truncada en su extremo C-terminal de ese modo puede ser privada de su región transmembrana. Además una señal de retención en ER puede ser añadida al extremo C-terminal de la endoproteasa truncada.

El medio de cultivo es preferiblemente un medio sin suero y la línea celular mamífera es preferiblemente una línea celular CHO o una línea celular BHK.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se utiliza en este caso el término "KEX2" significa el gen de la endoproteasa de levadura de *S. cerevisiae*.

Como se utiliza en este caso el término "Kex2 de longitud total" significa la secuencia completa de Kex2 del aminoácido 1 a 814.

Como se utiliza en este caso el término "Kex2 truncada" significa una enzima Kex2 donde el extremo C-terminal ha sido eliminado, en particular del aminoácido 814 al aminoácido 614 o 675, respectivamente.

Como se utiliza en este caso el término "ER" significa: retículo endoplasmático.

Como se utiliza en este caso el término "señal de retención en ER" significa KDEL en el C-terminal.

Como se utiliza en este caso el término "una endoproteasa de tipo Kex2" significa una endoproteasa de levadura con una secuencia de aminoácidos que tiene cierta homología a la secuencia de aminoácidos de Kex2 de longitud total de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%. Las secuencias de aminoácidos de la Kex2 como la endoproteasa de levadura como puede diferir de la secuencia de aminoácidos de Kex2 de longitud total por inserción o delección de uno o más residuos aminoácidos y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia natural por residuos aminoácidos diferentes. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza inferior, es decir las sustituciones de aminoácidos conservadoras no afectan significativamente al doblamiento y/o la actividad de la endoproteasa. Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (tales como arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (tales como ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (tales como glutamina y asparragina), aminoácidos hidrofóbicos (tales como leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (tales como fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (tales como glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, p. ej., por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, *En, The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los cambios que ocurren más frecuentemente son: Ala/Ser, Val/Ile,

ES 2 315 022 T3

Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly al igual que las mismas a la inversa.

5 Con el término “un derivado de una endoproteasa de levadura” se entiende una secuencia C-terminalmente truncada que puede contener una señal de retención en ER fijada al extremo C-terminal.

El método según la presente invención generalmente comprende:

10 (a) introducir en la línea celular mamífera un(os) sistema(s) de vector comprendiendo ADN que codifica la endoproteasa KEX2 o una variante de endoproteasa KEX2, donde dicha variante es seleccionada del grupo que consiste en KEX2 1-613 y KEX2 1-674, y el factor VII de codificación de ADN; y

15 (b) hacer crecer las células mamíferas transfectadas en un medio apropiado bajo condiciones donde dicha endoproteasa KEX2 o variante de endoproteasa KEX2 y FVII son expresados; y

(c) aislamiento del factor VII.

20 El sistema de vectores preferiblemente comprenderá dos vectores separados que son capaces de expresar FVII y la endoproteasa, respectivamente. En esta forma de realización de la presente invención, las células mamíferas son cotransfectadas con los dos vectores y luego son cultivadas en un medio de cultivo adecuado. De forma alternativa un clon de expresión del factor VII ya establecido puede ser transfectado con un vector capaz de expresar la endoproteasa. El sistema de vectores puede también comprender un único vector comprendiendo el cassette de expresión de FVII y el cassette de expresión de la endoproteasa.

25 Las células mamíferas usadas como células huéspedes en el método de la presente invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células COS, células HEK 293 o cualquier número de otras líneas celulares disponibles inmortalizadas, p. ej., de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

30 Ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares COS (ATCC CRL 1650), BHK (ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10), CHL (ATCC CCL39), HEK 293 (ATCC CRL 1573) o CHO (ATCC CCL 61). Métodos para transfectar células mamíferas y secuencias de ADN de expresión introducidas en las células están descritas en p. ej. Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327 - 341; Loyter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422 - 426; Wigler *et al.*, *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; y Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1 (1982), 841 - 845.

40 El vector puede ser cualquier vector que puede ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que deba ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser tal que, al introducirse en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique con el(los) cromosoma(s) en el(los) que haya sido integrado. El vector es preferiblemente un vector de expresión donde la secuencia de ADN codificante está operativamente enlazada a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión es derivado del ADN plásmido o vírico, o puede contener elementos de ambos. El término, “operativamente enlazado” indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para los objetivos destinados, p. ej. la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido.

50 El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped y puede ser derivado de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN codificante en células mamíferas son el promotor SV40 (Subramani *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 1 (1981), 854 -864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter *et al.*, *Science* 222 (1983), 809 - 814) o el promotor tardío más importante del adenovirus 2.

55 La secuencia de ADN codificante puede también, ser operativamente conectada a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humana (Palmiter *et al.*, *op. cit.*) o el terminador *ADH3* (McKnight *et al.*, *op. cit.*).

60 El vector puede además comprender elementos tales como señales de poliadenilación (p. ej. de SV40 o la región Elb del adenovirus 5), secuencias potenciadoras transcripcionales (p. ej. el potenciador SV40) y secuencias potenciadoras traduccionales (p. ej. aquellas que codifican los ARNs del adenovirus VA).

65 El vector también puede contener preferiblemente una región codificante del péptido señal, que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al terminal amino del polipéptido FVII que puede dirigir el polipéptido FVII expresado en la vía secretora de la célula huésped. El péptido señal puede ser homólogo o heterólogo a la línea celular huésped mamífera y puede ser el péptido señal natural.

ES 2 315 022 T3

Finalmente, el vector puede comprender una secuencia de ADN que le permita replicarse en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de tal secuencia en una célula mamífera es el origen de replicación SV40. Las células mamíferas transfectadas son cultivadas en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la coexpresión de FVII y la endoproteasa a partir de lo cual FVII es recuperado del medio de cultivo. El medio cultivo usado para las células mamíferas puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer células mamíferas, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El FVII producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtración mediante una sal, p. ej. sulfato amónico, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

Los ejemplos siguientes son ofrecidos sólo como ilustración, no como limitación.

Ejemplo 1

Construcción de plásmido de expresión KEX2

Fig.1 destaca la construcción del plásmido de expresión Kex2 usando pcDNA3 de Invitrogen como cassette de expresión. A partir de un clon genómico de KEX2 en el plásmido pME568, el N-terminal de 800 bp de la región codificante fue subclonado en pUC19 Acc651-Xba1 después de la introducción de un sitio Acc651 de 15 bp hacia arriba del ATG inicial por PCR del N-terminal de 375 bp usando los cebadores:

Hacia abajo : 5' **ACCTGGTACCCATTATAAGATGAAAG** 3' (Sec ID:1)
Acc651

Hacia arriba : 5' **GGTAACAAGCTTIGAGTCC** 3' (sec ID: 2)
Hind3

Este fragmento Acc651-Hind3 de 375 bp's fue ligado al fragmento contiguo a Hind3-Xba1 de 420 bp's y clonado en pUC19. A partir del plásmido resultante, pHW1252, el fragmento Acc651-Xba1 de 1800 bp fue cortado e insertado con el fragmento Xba1-SnaB1 C-terminal de 1750 bp de pME568 en pcDNA3 Acc651-EcoRV de 5.4 kb para producir el plásmido de expresión pHW1253. La secuencia de KEX2 en pHW1253 es esencialmente como se describe en Philippsen, P. *et al.* Nature 387 (suppl.), 93-98 (1997) en The Yeast Genome Directory.

Ejemplo 2

Coexpresión de Kex2 con FVII

Células de riñón de cría de hámster (BHK) que expresan FVII (Berkner *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 531-541 (1986)) fueron transfectadas con 2 µg de plásmido pH1253 como se describe en el ejemplo 1, usando el método de amina LipoFect como se describe por el proveedor (Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark). Clones estables fueron seleccionados en un medio (medio Eagle modificado Du Ibecco, 10% de suero fetal de ternera, 100 UI de Penicilina, 100 UI de Estreptomina, 1 mmol/l de Napirovato y 5 mg/l de vitamina K1) conteniendo 1 mg/l de Geneticina G418 (Gibco). Después de la selección, los clones estables fueron seleccionados usando cilindros de clonación y mantenidos a 37°C en una atmósfera conteniendo el 5% de CO₂.

Los clones estables fueron seleccionados en un FVII-ELISA (Novo Nordisk) para la producción de FVII. La actividad enzimática de Kex2 de 1 millón de células de los clones anteriores fue determinada esencialmente como se describe por N. C. Rockwell, G. T. Wang, G. A. Kraft, y R. S. Fuller., Biochemistry 36 (7): 1912 - 1917, 1997. La línea celular original productora de FVII fue cultivada en paralelo y usada como referencia.

ES 2 315 022 T3

Estamos viendo una correlación positiva entre la expresión de Kex 2 y la secreción de FVII en esta línea celular BHK, con 2-3 veces más FVII producido en los clones que coexpresan Kex2.

5 Ejemplo 3

Construcción de plásmido de expresión de FVII

10 Un ADNc de FVII con regiones delecionadas no traducidas fue preparado por PCR con Taq polimerasa usando los cebadores siguientes:

15 AAC GGA TCC ACC ATG GTC TCC CAG GCC CTC AGG (Sec ID 3)

ACG GAA TTC ACT AGT CTA GGG AAA TGG GGC TCG CAG GA (Sec ID 4)

20

y el ADNc de FVII humano como molde (Hagen *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1986, págs. 2412-2416). El fragmento de PCR fue clonado en el vector PBluescript II KS+ (Stratagene) y la secuencia fue verificada. El ADNc fue transferido como un fragmento de BamHI-SpeI al vector Zem219b de expresión celular de mamífero (Busby *et al.* J. Biol. Chem. 266, 1991, págs. 15286-15292), que lleva un metal-lothionin de ratón en el promotor para conducir el ADNc insertado y el ADNc de dihidrofolato-reductasa conducido por un promotor SV40 para el uso como un marcador seleccionable. El plásmido resultante fue designado pLN174.

30 Ejemplo 4

Transfección de FVII de células CHO con y sin el ADNc de KEX2 y medición de la producción FVII de células transfectadas

35 Las células CHO-K1 (ATCC CCL 61) adaptadas para el crecimiento en suspensión fueron transfectadas con:

- 40 a. el plásmido de expresión pLN174 de FVII (ejemplo a) y el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) sin ADNc insertado.
- b. el plásmido de expresión pLN174 de FVII (ejemplo a) y el vector de expresión pcDNA3/KEX2

usando el reactivo de transfección Qiafect. Se seleccionaron transfectantes dobles usando 1 μ M de metotrexato y 700 μ g/ml de Geneticina (Gibco). Cuando los clones fueron visibles por el ojo desnudo los cultivos fueron transferidos a matraces en T para un cultivo adicional.

45

Las agrupaciones de transfectantes (a y b como se ha descrito anteriormente) fueron sembrados en matraces T25 (0,25 x 10⁶ células por matraz) para la medición de producción de FVII. Cuando las células se adherieron al sustrato, se añadió un medio fresco conteniendo 5 μ g/ml de vitamina K1. El medio de cultivo fue cosechado después de 2 días adicionales y evaluado para actividad de FVII con un kit ELISA (DAKO). Como se puede observar a partir de la tabla abajo la cotransfección de pcDNA3/KEX2 y FVII da un nivel de expresión 5 veces mayor de inmunoreactividad de FVII en comparación con FVII cuando es cotransfectado con el vector pcDNA3 sólo.

55

Tipo de célula	Plásmidos usados para transfección	concentración de FVII μ g/ml
60 a	pLN174/pcDNA3	0,18
b	pLN174/pcDNA3+KEX2	0,90

65

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9001550 A [0009]
- US 5460950 A, Barr [0009]
- EP 319944 A, Mulvihill [0010]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **Williams et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 7536-7543 [0005]
- **Rao et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6687-6691 [0005]
- **BUSBY et al.** *Curr. Adv. in Vit. K. Res.*, 1987, 173-181 [0007]
- **UL-RICH et al.** *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, no. 20. 9697-9702 [0007]
- **BBRC**, 1987, vol. 144, 807-814 [0008]
- **H. NEURATH R. L. HILL** *The Proteins Academic Press*, 1979. [0019]
- **KAUFMAN SHARP** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0024]
- **SOUTHERN; BERG** *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327-341 [0024]
- **LOYTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 422-426 [0024]
- **WIGLER et al.** *Cell*, 1978, vol. 14, 725- [0024]
- **CORSARO; PEARSON** *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603- [0024]
- **GRAHAM; VAN DER EB** *Virology*, 1973, vol. 52, 456- [0024]
- **NEUMANN et al.** *EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0024]
- **SUBRAMANI et al.** *Mol. Cell Biol.*, 1981, vol. 1, 854-864 [0026]
- **PALMITER et al.** *Science*, 1983, vol. 222, 809-814 [0026]
- **PHILIPPSSEN, P. et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 93-98 [0033]
- **BERKNER et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 51, 531-541 [0034]
- **N. C. ROCKWELL; G. T. WANG; G. A. KRAFT; R. S. FULLER.** *Biochemistry*, 1997, vol. 36, no. 7. 1912-1917 [0034]
- **HAGEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 2412-2416 [0035]
- **BUSBY et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15286-15292 [0035]

ES 2 315 022 T3

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de factor VII (FVII) que comprende:

5 a) Cultivo de una línea celular de mamífero que comprende una secuencia de ADN que codifica endoproteasa Kex2 o una variante de endoproteasa KEX2, donde dicha variante es seleccionada del grupo que consiste en KEX2 1-613 y KEX2 1-674, y una secuencia de ADN que codifica FVII en un medio de cultivo adecuado, bajo condiciones donde dicha endoproteasa KEX2 o variante de endoproteasa KEX2 y dicho FVII son expresados; y

10 b) Aislamiento de FVII del medio.

2. Método según la reivindicación 1, donde dicha endoproteasa KEX2 o variante de endoproteasa KEX2 tiene una señal de retención en ER en forma de aminoácidos KDEL añadidos al extremo C-terminal.

15 3. Método según la reivindicación 1, donde el medio de cultivo es un medio sin suero.

4. Método según la reivindicación 1, donde la línea celular de mamífero es seleccionada del grupo que consiste en líneas celulares CHO, BHK y HEK 293.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

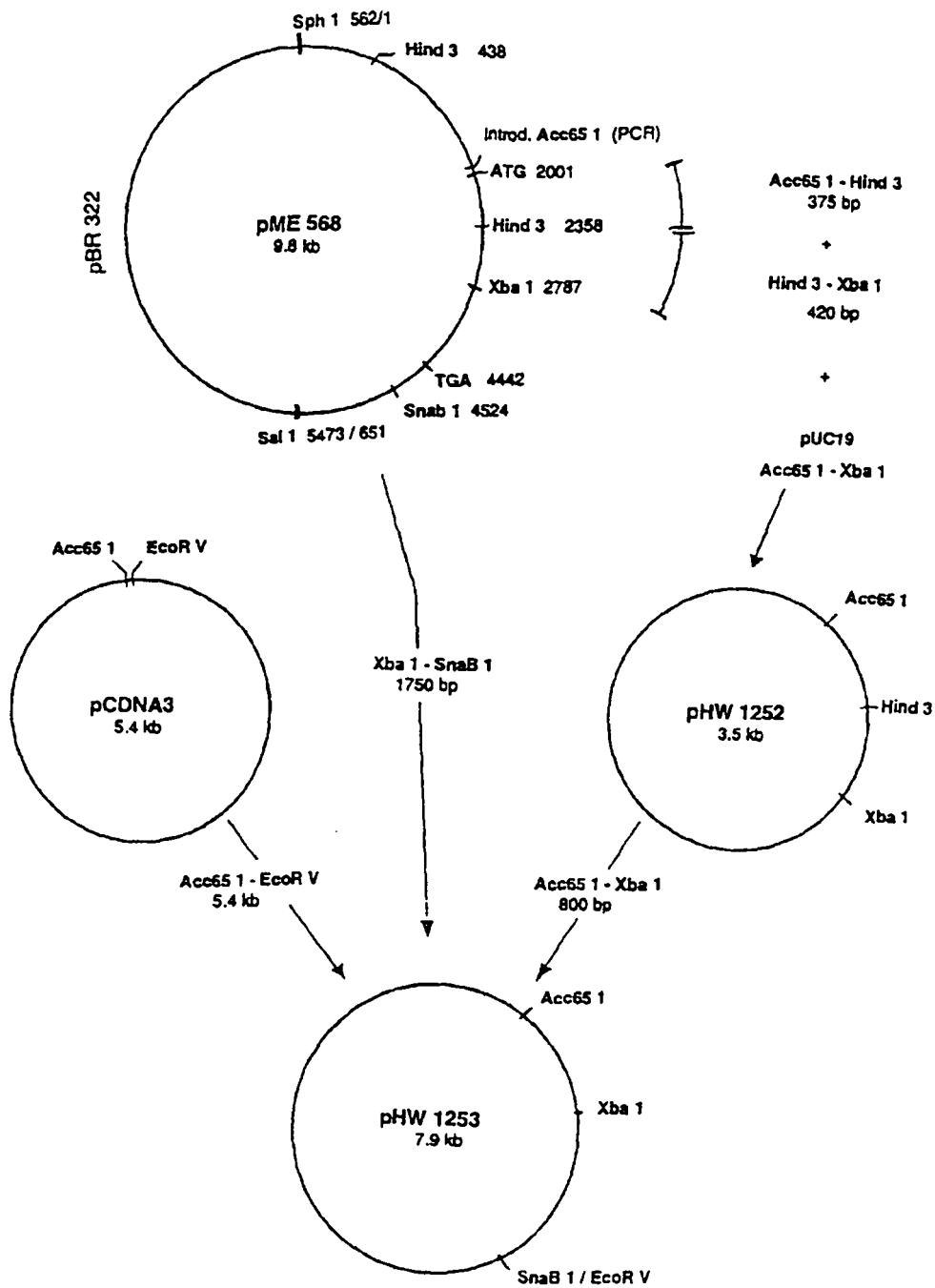


Fig. 1

ES 2 315 022 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Novo Nordisk A/S
- 5 <120> Método para obtener FVII
- <130> 5565sec
- 10 <140> 5565
- <141> 1998-11-06
- <160> 4
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 1
- <400> 1
- 30
- acctggtagc ccattataag atgaaag 27**
- 35 <210> 2
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 40
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 2
- 45 <400> 2
- ggtaacaagc ttgagtcc 18**
- 50
- <210> 3
- <211> 33
- <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial:cebador 3
- 60
- <400> 3
- 65 **aacggatcca ccatggtctc ccaggccctc agg 33**
- <210> 4

ES 2 315 022 T3

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 2

10 <400> 4

acggaattca ctagtctagg gaaatggggc tcgcagga 38

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65