

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 773**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/745** (2006.01)

**C07K 5/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2016** **PCT/EP2016/079585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017** **WO17093482**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016** **E 16806055 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3383894**

54 Título: **Medios mejorados para la expresión de proteínas recombinantes dependientes de vitamina k**

30 Prioridad:

**02.12.2015 EP 15197516**

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

**29.01.2021**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING LENGNAU AG (100.0%)**

**Industriestrasse 11  
2543 Lengnau BE, CH**

72 Inventor/es:

**LEE, YIH YEAN;  
LOW, CHEE KIN ANDREW;  
AITKEN, CAMPBELL DOUGLAS;  
BYRNE, STEVEN PATRICK y  
EDWARDS, MARK JOHN FERRES**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 803 773 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

Medios mejorados para la expresión de proteínas recombinantes dependientes de vitamina K

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K expresada en cultivo celular. La presente invención se refiere además a usos y composiciones de materia.

**Antecedentes de la invención**

10 La vitamina K está implicada en la carboxilación de determinados restos de ácido glutámico en proteínas para formar restos de gamma-carboxiglutamato (restos de Gla). Los restos modificados se ubican dentro de dominios proteicos específicos denominados dominios Gla. Los restos de Gla están implicados habitualmente en la unión de calcio. Los restos de Gla son esenciales para la actividad biológica de todas las proteínas de Gla conocidas.

15 La bioquímica de cómo se usa vitamina K para convertir Glu en Gla se ha dilucidado en los últimos treinta años. Dentro de la célula, la vitamina K experimenta reducción de electrones a una forma reducida de vitamina K (denominada vitamina K hidroquinona) por la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKOR). El gen que codifica VKOR (VKORC1) se describe en detalle en Rost y col., 2004 ((2004) Nature, 427, 537-541)). Después, otra enzima oxida la vitamina K hidroquinona para permitir la carboxilación de Glu a Gla; esta enzima se denomina gamma-glutamyl carboxilasa o la carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC). La reacción de carboxilación solo sucederá si la enzima carboxilasa es capaz de oxidar la vitamina K hidroquinona a epóxido de vitamina K al mismo tiempo; se dice que las reacciones de carboxilación y epoxidación son reacciones acopladas. El epóxido de vitamina K se reconvierte después en vitamina K por la vitamina K epóxido reductasa. Estas dos enzimas comprenden el denominado ciclo de vitamina K.

20 En la actualidad, las siguientes proteínas que contienen Gla humano se han caracterizado con respecto al nivel de estructura primaria: los factores de coagulación sanguínea II (protrombina), VII, IX y X, las proteínas anticoagulantes C y S, y la proteína Z dirigida al Factor X, así como la proteína de Gla del hueso osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificación, la proteína del gen 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular y las cuatro proteínas de Gla transmembrana (TMGP) de función aún desconocida. Gas6 puede actuar como un factor de crecimiento que activa la tirosina quinasa receptora Axl y estimula la proliferación celular o previene la apoptosis en algunas células. En todos los casos en los que se conocía su función, la presencia de los restos de Gla en estas proteínas resultó ser esencial para la actividad funcional. Los múltiples restos de Gla permiten que el dominio Gla experimente cambios conformacionales que son necesarios para la actividad de las proteínas dependientes de vitamina K en combinación con la unión a superficies de membranas fosfolipídicas.

25 Las proteínas de coagulación de la sangre dependientes de vitamina K requieren carboxilación completa o casi completa para unirse a superficies de membrana en presencia de iones de calcio. Si los antagonistas de vitamina K inhiben la carboxilación gamma, las proteínas dependientes de vitamina K así subcarboxiladas no pueden formar la estructura dependiente de calcio, lo que da lugar a baja afinidad por membranas fosfolipídicas y menor actividad. La actividad procoagulante ausente de mutantes de factor IX subcarboxilados hallados en pacientes con hemofilia B puede asignarse a cambios conformacionales inducidos por calcio alterados y pérdida de la capacidad de unirse a vesículas fosfolipídicas.

30 Se han desvelado en la técnica anterior procedimientos para expresar proteínas dependientes de vitamina K. El documento WO 2011/003153 desvela un procedimiento para la fermentación de células eucariotas que expresan una o más proteínas dependientes de vitamina K en el que se añaden uno o más compuestos seleccionados de una lista que comprende i) formas reducidas de vitamina K y/o ii) formas reducidas de un análogo de vitamina K y/o iii) formas reducidas de un precursor de vitamina K al medio de cultivo celular antes y/o durante el procedimiento de fermentación. El documento WO 2006/101474 desvela procedimientos para aumentar la cantidad de proteína dependiente de vitamina K carboxilada en una célula, que comprenden introducir en una célula que expresa un primer ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de vitamina K, un segundo ácido nucleico heterólogo que codifica vitamina K epóxido reductasa (VKOR) en condiciones en las que dichos primer y segundo ácidos nucleicos se expresan para producir una proteína dependiente de vitamina K y VKOR, respectivamente. El documento WO 2007/075976 desvela procedimientos para producir proteínas dependientes de vitamina K biológicamente activas, en particular, factor IX. El procedimiento tiene como objetivo producir factor IX a un nivel de al menos aproximadamente 15 mg/l y que es al menos 25 % biológicamente activo. El procedimiento se basa en la coexpresión de una o más enzimas conversoras de aminoácidos básicas emparejadas (PACE), epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR) y gamma-glutamyl carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) en una relación preferida de modo que la proteína dependiente de vitamina K sea producida y procesada eficazmente por una célula recombinante.

35 Se han aplicado medios de cultivo celular que comprenden intermedios de TCA tales como ácido alfa-cetoglutarico para expresión de anticuerpos (documento WO 2007/036291 y Nilsang y col., 2008, Appl Biochem Biotechnol, 151: 489-501).

Se usan proteínas dependientes de vitamina K en el tratamiento de diversos trastornos hemorrágicos. Para usos

terapéuticos, los productos proteicos recombinantes son ventajosos sobre la proteína procedente de plasma, ya que la proteína procedente de plasma tiene un riesgo potencialmente mayor de contaminación por patógenos y se asocia con grandes esfuerzos y gastos, ya que su procedimiento de preparación depende de donantes de plasma humano. Una fuerte necesidad de preparar proteínas dependientes de vitamina K con actividad proteica mejorada. El procedimiento según la presente invención satisface esta necesidad insatisfecha en la técnica.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la complementación de un cultivo celular que expresa una proteína recombinante dependiente de vitamina K con L-glutati6n o un intermedio de TCA aumenta significativamente la actividad biológica de la proteína recombinante dependiente de vitamina K.

En una realizaci6n, la presente invenci6n proporciona un procedimiento para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar células huésped que comprenden un sistema de expresi6n que expresa la proteína recombinante dependiente de vitamina K,
- b) cultivar las células en un medio de cultivo celular que comprende uno o más reactivos potenciadores del cultivo celular y
- c) separar y/o aislar y/o purificar la proteína recombinante dependiente de vitamina K del cultivo celular,

en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular se seleccionan del grupo que consiste en L-glutati6n e intermedios del ciclo de TCA.

En una realizaci6n adicional, la invenci6n se refiere a un procedimiento para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar células huésped que comprenden un sistema de expresi6n que expresa la proteína recombinante dependiente de vitamina K,
- b) cultivar las células en un medio de cultivo celular que comprende uno o más reactivos potenciadores del cultivo celular y
- c) separar y/o aislar y/o purificar la proteína recombinante dependiente de vitamina K del cultivo celular,

en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular se seleccionan del grupo que consiste en L-glutati6n e intermedios del ciclo de TCA.

En una realizaci6n, los intermedios del ciclo de TCA se seleccionan de ácido alfa-cetogluti6rico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico. El o los reactivos potenciadores del cultivo celular est6n presentes preferentemente en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento de la proteína recombinante dependiente de vitamina K y/o para potenciar la actividad de la proteína recombinante dependiente de vitamina K.

En una realizaci6n, se proporciona L-glutati6n a una concentraci6n de 0,5-13 mmol/l, preferentemente 2-10 mmol/l, más preferentemente 3,75-7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido alfa-cetogluti6rico a una concentraci6n de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido succínico a una concentraci6n de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido oxaloacético a una concentraci6n de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido málico a una concentraci6n de 5-50 mmol/l, preferentemente 7,5-30 mmol/l, más preferentemente 10-20 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido fumárico a una concentraci6n de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realizaci6n, se proporciona ácido cítrico a una concentraci6n de 0,5-20 mmol/l, preferentemente 1-15 mmol/l, más preferentemente 1,5-3,75 mmol/l en el cultivo celular.

En una realizaci6n, el cultivo celular es un cultivo discontinuo. En una realizaci6n adicional, el cultivo celular es un cultivo de alimentaci6n semicontinua. El o los reactivos potenciadores de cultivo celular pueden estar presentes en el medio de cultivo celular basal y/o en el medio de alimentaci6n. En una realizaci6n adicional, el cultivo celular es un cultivo de perfusi6n. El o los reactivos potenciadores de cultivo celular pueden estar presentes en el medio de cultivo celular basal y/o en el medio de perfusi6n.

En una realizaci6n preferida, las células huésped son células CHO.

En una realizaci6n, la proteína recombinante dependiente de vitamina K se selecciona de FIX, FVII, FX, FII, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificaci6n y la proteína 6 específica de detenci6n del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular. En una realizaci6n preferida, la proteína dependiente de vitamina K es FVII. En una realizaci6n más preferida, la proteína dependiente de vitamina K

es una proteína de fusión de albúmina FVII.

Se proporciona además el uso de L-glutación, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o ácido cítrico o sales de los mismos para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.

- 5 También se proporciona el uso de un medio de cultivo celular que comprende L-glutación, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o ácido cítrico para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.

Adicionalmente, se proporciona una composición de materia y un biorreactor que comprende la composición de materia.

## 10 **Descripción de las figuras**

- |                 |                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 1A:      | Densidad celular viable (DCV) de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de L-glutación reducido durante 5 o 7 días, respectivamente.                  |
| Figuras 1B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de L-glutación reducido durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.     |
| Figura 2A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido alfa-cetoglutarico durante 5 o 7 días, respectivamente.                    |
| Figuras 2B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido alfa-cetoglutarico durante 7, 9 o 10 días, respectivamente. |
| Figura 3A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido málico durante 5 o 7 días, respectivamente.                                |
| Figuras 3B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido málico durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.             |
| Figura 4A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido succínico durante 5 o 7 días, respectivamente.                             |
| Figuras 4B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido succínico durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.          |
| Figura 5A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido oxaloacético durante 5 o 7 días, respectivamente.                          |
| Figuras 5B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido oxaloacético durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.       |
| Figura 6A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido fumárico durante 5 o 7 días, respectivamente.                              |
| Figuras 6B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido fumárico durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.           |
| Figura 7A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido cítrico durante 5 o 7 días, respectivamente.                               |
| Figuras 7B + C: | Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de ácido cítrico durante 7, 9 o 10 días, respectivamente.            |
| Figura 8A:      | Densidad celular viable de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de piruvato de sodio durante 5 o 7 días, respectivamente (ejemplo comparativo).     |

Figuras 8B + C: Actividad cromogénica de FVII obtenido de células CHO que expresan FVII que se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de piruvato de sodio durante 7, 9 o 10 días, respectivamente (ejemplo comparativo).

### **Descripción detallada de la invención**

La expresión "proteína dependiente de vitamina K" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que requiere vitamina K para la formación de restos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla). Dichas proteínas pueden caracterizarse, por ejemplo, por la presencia de uno o más dominios de carboxilación dependiente de vitamina K/ $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla). Los restos de glutamato en el o los dominios de Gla se modifican después de la traducción mediante carboxilación dependiente de vitamina K para formar restos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla). Esta modificación permite que el o los dominios de Gla experimenten cambios conformacionales que pueden ser importantes tanto para actividad enzimática como para unión al sustrato, incluyendo, por ejemplo, unión de alta afinidad a iones de calcio y, en ocasiones, unión a superficies de membranas fosfolipídicas. Los ejemplos no limitantes de proteínas dependientes de vitamina K incluyen FIX, FVII, FX, FII, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificación y la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular.

La expresión "factor VII" o "FVII" como se usa en el presente documento abarca factor VII de tipo silvestre y su forma activada factor VIIa, y variantes de factor VII y factor VIIa que presentan sustancialmente la misma actividad biológica o actividad biológica mejorada en relación con el factor VII de tipo silvestre o factor VIIa. Por tanto, se entiende que la expresión "factor VII" abarca polipéptidos del factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como los que se han procesado proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse factor VIIa. Normalmente, FVII se convierte en su forma activa factor VIIa (FVIIa) mediante proteólisis del enlace peptídico sencillo en Arg152-Ile153, lo que conduce a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (24 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un enlace disulfuro. A diferencia de otros factores de coagulación dependientes de vitamina K, no se ha descrito para FVII ningún péptido de activación, que se escinde durante la activación de estos otros factores de coagulación dependientes de vitamina K. El sitio de escisión Arg152-Ile153 y algunos aminoácidos cadena abajo muestran homología con el sitio de escisión de activación de otros polipéptidos dependientes de vitamina K. Es esencial para lograr la conformación activa del factor VIIa la formación de un enlace salino después de la escisión de activación entre Ile153 y Asp343. Se puede lograr escisión de activación del factor VII *in vitro* mediante factor Xa, factor XIIa, factor IXa, factor VIIa, proteasa activadora de factor siete (FSAP) y trombina. Møllerup y col., 1995 (Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505) informaron de que también se produce algo de escisión en la cadena pesada en Arg290 y/o Arg315.

También se incluye factor VII recombinante, o variantes del mismo, por ejemplo, en las que se han introducido una o más supresiones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos para modular (p. ej., aumentar, disminuir) al menos una actividad biológica de la proteína. A menos que se especifique otra cosa, el FVII al que se hace referencia en el presente documento puede no estar modificado o puede presentar modificaciones postraduccionales. Además se incluyen proteínas de fusión de FVII, tales como una fusión de FVII-albúmina. FVII puede ser FVII humano. También se incluyen proteínas del factor VII o proteínas relacionadas con FVII de otros organismos, tales como otros mamíferos.

FVII desempeña una función importante en la promoción de la coagulación sanguínea. El modelo actual de coagulación establece que el desencadenante fisiológico de la coagulación es la formación de un complejo entre el factor tisular (FT) y el FVII en la superficie de las células que expresan FT, que normalmente se encuentran fuera de la vasculatura. Esto conduce a la activación del factor IX y el factor X que en última instancia genera algo de trombina. En un bucle de retroalimentación positiva, la trombina activa el factor VIII y el factor IX, la denominada rama "intrínseca" de la cascada de coagulación sanguínea, amplificando de este modo la generación del factor Xa, que es necesario para la generación de la explosión de trombina completa para lograr hemostasia completa. Se ha mostrado que al administrar concentraciones suprafisiológicas del factor VIIa, se logra hemostasia evitando la necesidad del factor VIIIa y el factor IXa. La clonación del ADNc para el factor VII (documento US 4.784.950) hizo posible desarrollar el factor VII activado como un producto farmacéutico. El factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988.

El FVII se usa en el tratamiento de la hemofilia A y B en pacientes que desarrollaron inhibidores contra factores de reemplazo. La hemofilia A y B son trastornos de la coagulación hereditarios. Resultan de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor VIII de coagulación sanguínea (hemofilia A) o de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor IX de coagulación sanguínea (hemofilia B) y afectan casi exclusivamente a hombres con una incidencia entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por portadoras que no son en sí mismas clínicamente hemófilas. La manifestación clínica de la hemofilia A y B es una mayor tendencia a la hemorragia. El objetivo de la terapia para hemofilia es tratar o prevenir la hemorragia, reduciendo de este modo el daño incapacitante de articulaciones y tejidos, y mejorando la calidad de vida. Tanto en hemofilia A como en hemofilia B, el problema médico más grave en el tratamiento de la enfermedad es la generación de aloanticuerpos inhibidores contra los factores de reemplazo. Hasta el 30 % de todos los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos inhibidores contra el factor VIII. Aparecen anticuerpos inhibidores contra el factor IX en menor medida pero con consecuencias más graves, ya que son menos susceptibles a la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria y tienen un mayor potencial para desencadenar reacciones alérgicas cuando se unen al factor IX. El tratamiento para pacientes con hemofilia A (deficiencia de FVIII) o hemofilia B (deficiencia de factor IX) que han desarrollado anticuerpos inhibidores

(hemofilia congénita con inhibidores, CHWI) contra FVIII o factor IX (especialmente inhibidores de títulos altos) es difícil, ya que el reemplazo normal con factor VIII o IX no es eficaz.

También se puede usar FVII como terapia para tratar la hemorragia asociada con pérdida de sangre perioperatoria y traumática en sujetos con sistemas de coagulación normales. Por ejemplo, se puede administrar FVII a un paciente para promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con traumatismo y cirugía y, además, reducir la necesidad de transfusión de sangre. Se puede usar FVII además en el tratamiento de la hemofilia adquirida, deficiencia congénita de FVII y trombastenia de Glanzmann.

La expresión "factor IX" como se usa en el presente documento abarca el factor IX de tipo silvestre y variantes del factor IX y IXa que presentan sustancialmente la misma actividad biológica o una actividad biológica mejorada con respecto al factor IX o IXa de tipo silvestre. Se entiende, por tanto, que la expresión factor IX abarca polipéptidos del factor IX en su forma no escindida (zimógeno), así como los que se han procesado proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse factor IXa.

Determinadas realizaciones pueden incluir la producción recombinante del factor IX o factor IXa de tipo silvestre, o variantes de los mismos, por ejemplo, en las que se han introducido una o más supresiones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos para modular (p. ej., aumentar, disminuir) al menos una actividad biológica de la proteína. El factor IX puede ser el factor IX humano. Sin embargo, también se incluyen secuencias relacionadas con el factor IX de otros organismos, tales como otros mamíferos conocidos en la técnica.

La expresión "factor X", como se usa en el presente documento, abarca factor X y Xa de tipo silvestre y variantes del factor X y Xa que presentan sustancialmente la misma actividad biológica o actividad biológica mejorada con respecto al factor X o Xa de tipo silvestre. Se entiende, por tanto, que la expresión factor X abarca polipéptidos del factor X en su forma no escindida (zimógeno), así como los que se han procesado proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse factor Xa.

Determinadas realizaciones pueden incluir la producción recombinante del factor X o factor Xa de tipo silvestre, o variantes de los mismos, por ejemplo, en las que se han introducido una o más supresiones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos para modular (p. ej., aumentar, disminuir) al menos una actividad biológica de la proteína. El factor X puede ser el factor X humano. Sin embargo, también se incluyen secuencias relacionadas con el factor X de otros organismos, tales como otros mamíferos conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, el producto proteico dependiente de vitamina K es el factor II, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificación y la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular.

El término "albúmina", como se usa en el presente documento, incluye polipéptidos de la familia de proteínas de albúmina, tales como seroalbúmina humana, incluyendo variantes y derivados de las mismas, tales como variantes de albúmina modificadas por ingeniería genética o químicamente y fragmentos de proteínas de albúmina. La seroalbúmina humana (HSA o HA), es una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura y es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también actúa como portador de ligandos endógenos y exógenos. Entre otros beneficios, la fusión con HSA o un fragmento o variante de la misma puede aumentar la vida útil, semivida en suero y/o actividad terapéutica de su compañero de fusión. La albúmina puede fusionarse con su compañero de fusión en el extremo N y/o en el extremo C. La parte de albúmina de una proteína de fusión también puede proceder de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero. La parte de albúmina de la proteína de fusión de albúmina puede ser de un animal diferente que la otra parte de proteína de la proteína de fusión.

La expresión "reactivo potenciador del cultivo celular" como se usa en el presente documento se refiere a uno cualquiera de los intermedios de L-glutión y TCA.

La expresión "L-glutión" (GSH; nombre de IUPAC: (2S)-2-amino-5-[[[(2R)-1-(carboximetilamino)-1-oxo-3-sulfanilpropan-2-il]amino]-5-oxopentanoico) como se usa en el presente documento se refiere a un tripéptido con un enlace peptídico gamma entre el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato y el grupo amina de cisteína que está unido por enlace peptídico normal a una glicina ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). "L-glutión" como se usa en el presente documento se refiere a L-glutión reducido.

La expresión "intermedios de TCA" o "intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico" como se usa en el presente documento incluye ácido  $\alpha$ -cetoglutarico (ácido alfa-cetoglutarico), ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico. La expresión intermedio de TCA también se refiere a ácido isocítrico y succinil-coenzima A (succinil-CoA).

La expresión "ácido alfa-cetoglutarico" como se usa en el presente documento se refiere a ácido alfa-cetoglutarico o sales del mismo. La expresión "ácido succínico" como se usa en el presente documento se refiere a ácido succínico o sales del mismo. La expresión "ácido oxaloacético" como se usa en el presente documento se refiere a ácido oxaloacético o sales del mismo. La expresión "ácido málico" como se usa en el presente documento se refiere a ácido málico o sales del mismo. La expresión "ácido fumárico" como se usa en el presente documento se refiere a ácido fumárico o sales del mismo. La expresión "ácido cítrico" como se usa en el presente documento se refiere a ácido

cítrico o sales del mismo.

Como se usa en el presente documento, "actividad cromogénica" se refiere a la actividad de una proteína dependiente de vitamina K en un ensayo que mide la actividad enzimática de la proteína dependiente de vitamina K por hidrólisis de un sustrato que da lugar a un producto cromogénico. Dichos ensayos están disponibles en el mercado de, p. ej., Chromogenix.

La expresión "células huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a células de cualquier línea celular adecuada para la expresión de proteínas. La línea celular puede ser de origen mamífero. Son ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero adecuadas las células HEK 293 (células 293 de riñón embrionario humano), células BHK (células de riñón de cría de hámster), células COS-1, células 3T3, células CHO (células de ovario de hámster chino), células de hibridoma, células de mieloma de ratón NS0, células de mieloma de ratón NS1, células de mieloma de ratón Sp2/0, células de retinoblastoma humano PER.C6, células Vero de mono verde africano y células MDCK (células de riñón canino Mardin-Darby).

La expresión "medio de cultivo celular" como se usa en el presente documento es un medio para cultivar células de mamífero que comprende un mínimo de nutrientes esenciales y componentes necesarios para el crecimiento celular, tales como vitaminas, oligoelementos, sales, aminoácidos, hidratos de carbono en un medio preferentemente tamponado. Son ejemplos no limitantes para dicho medio de cultivo celular medios disponibles en el mercado y medios patentados. El medio de cultivo celular puede ser un medio de cultivo celular basal. El medio de cultivo celular también puede ser un medio de cultivo celular basal al que se ha añadido el medio de alimentación u otros aditivos.

La expresión "medio basal" como se usa en el presente documento es un medio de cultivo celular para cultivar células de mamífero. Se refiere al medio en el que las células se cultivan desde el inicio de un cultivo celular. No se usa como aditivo para otro medio, sin embargo, se pueden añadir diversos componentes al medio. Al medio basal se pueden añadir opcionalmente aditivos, medio de alimentación o medio de perfusión adicionales durante el cultivo celular. El medio de cultivo celular proporciona en general nutrientes necesarios para el crecimiento celular, tales como fuentes de carbono, aminoácidos, vitaminas y glucosa.

La expresión "medio de alimentación" como se usa en el presente documento se refiere a una formulación nutritiva concentrada usada como alimento en un cultivo celular. El medio de alimentación se añade a un cultivo celular durante el cultivo de células. Se proporciona como una formulación concentrada para evitar la dilución del medio de cultivo celular. La velocidad de alimentación varía dependiendo del procedimiento. La velocidad de alimentación debe entenderse como una velocidad de alimentación promedio durante el periodo de alimentación. Un medio de alimentación tiene habitualmente concentraciones mayores de los componentes que deben reponerse que el medio basal. El medio de alimentación repone los componentes que se consumen durante el cultivo celular, tales como aminoácidos e hidratos de carbono. El alimento se puede añadir en diferentes modos, tales como continuo o periódico. El medio de alimentación se puede añadir diariamente, pero también se puede añadir con más frecuencia, tal como dos veces al día, o con menos frecuencia, como cada dos días.

La expresión "medio de perfusión", como se usa en el presente documento, se refiere a un medio adecuado para reemplazar el medio de cultivo celular que se ha eliminado de un cultivo celular durante el cultivo de células. El medio de perfusión puede tener una formulación similar o idéntica al medio basal. Sin embargo, en el medio de perfusión, pueden estar presentes varios componentes en concentraciones mayores o menores o incluso estar ausentes en comparación con el medio basal. El medio de perfusión también puede comprender componentes que no están presentes en el medio basal.

El medio de cultivo celular, el medio basal, el medio de alimentación y/o el medio de perfusión pueden estar exentos de suero, definidos químicamente, exentos de proteínas de origen humano o animal y/o exentos de proteínas.

Un "medio sin suero" como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo celular para cultivo celular *in vitro*, que no contiene suero de origen animal. Esto se prefiere ya que el suero puede contener contaminantes o patógenos de dicho animal. Además, el suero carece de una definición clara y puede variar en su composición de un lote a otro.

Un "medio químicamente definido" como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo celular para cultivo celular *in vitro*, en el que todos los componentes son conocidos. Más específicamente, no contiene ningún complemento indefinido, tal como suero animal o hidrolizados de plantas. Sin embargo, puede comprender hidrolizados si se han analizado todos los componentes y se conoce la composición exacta del hidrolizado.

Un medio "sin proteínas de origen animal o humano" como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo celular que no contiene ningún componente proteico de una fuente animal o humana. Sin embargo, dicho medio puede comprender proteínas recombinantes procedentes de, p. ej., cultivo celular de expresión o expresión bacteriana.

Un "medio sin proteínas" como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo celular para cultivo celular *in vitro* que no comprende proteínas, excepto proteínas producidas por la célula para cultivar, en el que la proteína se refiere a polipéptidos de cualquier longitud, pero excluye aminoácidos individuales, dipéptidos o tripéptidos.

La expresión "cultivo celular" o "cultivo" incluye cultivo de células y procedimientos de fermentación en todas las

escalas (p. ej., desde placas de microtitulación hasta biorreactores a gran escala, es decir, desde una escala sub ml a una escala >1000 l), en todos los modos de procedimiento diferentes (p. ej., discontinuo, alimentación semicontinua, perfusión), en todos los modos de control de procedimiento (p. ej., sistemas no controlados, totalmente automatizados y controlados con control de, p. ej., pH, temperatura, contenido de oxígeno), en todo tipo de sistemas de fermentación (p. ej., sistemas de un solo uso, sistemas de acero inoxidable, sistemas de material de vidrio). Se realiza cultivo celular en condiciones (temperatura, suministro de oxígeno, etc.) que se establecen para las líneas celulares respectivas utilizadas. Las células pueden agitarse o sacudirse para aumentar la oxigenación y/o dispersión de nutrientes durante el cultivo.

La expresión "alimentación semicontinua" como se usa en el presente documento se refiere a un cultivo celular en el que las células se alimentan de manera continua o periódica con un medio de alimentación que contiene nutrientes. La alimentación puede comenzar poco después de comenzar el cultivo celular el día 0 o más habitualmente uno, dos o tres días después de comenzar el cultivo. La alimentación puede seguir un programa determinado, tal como todos los días, cada dos días, etc. Como alternativa, el cultivo puede supervisarse con respecto a crecimiento celular, nutrientes o subproductos tóxicos y la alimentación pueden ajustarse en consecuencia. En general, los siguientes parámetros se determinan con frecuencia diariamente y abarcan la concentración de células viables, concentración de productos y metabolitos tales como glucosa, galactosa, pH, osmolaridad (una medida del contenido de sal) y amonio (inhibidor del crecimiento que afecta negativamente a la velocidad de crecimiento). En comparación con cultivos discontinuos (en los que no se produce alimentación), se pueden obtener títulos de producto mayores en el modo de alimentación semicontinua. Normalmente, un cultivo de alimentación semicontinua se detiene en algún momento y se recogen las células y/o la proteína de interés en el medio.

La expresión "cultivo de perfusión" como se usa en el presente documento se refiere a un cultivo celular en el que se añade medio de perfusión de manera continua o semicontinua durante el cultivo celular. La adición puede comenzar poco después de comenzar el cultivo celular el día 0 o uno o más días después de comenzar el cultivo. Una parte de las células, el medio de cultivo celular y/o los componentes en el medio se recogen de manera continua o semicontinua durante el cultivo celular. La recogida puede comenzar cuando comienza la adición de medio de perfusión. Los componentes recogidos (p. ej., proteínas) pueden purificarse opcionalmente. La cantidad de medio de perfusión añadida a un cultivo celular depende habitualmente de la cantidad de medio de cultivo celular eliminado del cultivo durante la recogida. El cultivo puede supervisarse con respecto a crecimiento celular, nutrientes o subproductos tóxicos y la velocidad de perfusión (cantidad de medio de perfusión añadida a lo largo del tiempo) puede ajustarse en consecuencia.

Se conocen a partir de la técnica anterior procedimientos para introducir ADN que codifica una proteína dependiente de vitamina K en una célula huésped con el fin de lograr expresión de la proteína dependiente de vitamina K (p. ej., Kim y col., Anal Bioanal Chem (2010), 379: 3173-3178). El ADN que codifica la proteína dependiente de vitamina K puede codificar además elementos reguladores. Deberían seleccionarse elementos adecuados en función de la célula huésped. Los procedimientos preferidos de transfección incluyen el procedimiento de Lipofectamine®, precipitación con fosfato de calcio y electroporación. La presente invención se puede llevar a cabo con células hospedadoras transfectadas transitoriamente o transfectadas de manera estable. En una realización preferida, las células huésped se transfectan de manera estable con ADN que codifica la proteína dependiente de vitamina K.

La proteína dependiente de vitamina K puede ser FVII. En una realización, el FVII es FVII humano. En una realización adicional, el FVII es una proteína de fusión. En una realización preferida adicional, el FVII es una proteína de fusión de albúmina. Se describe una proteína de fusión de albúmina FVII, p. ej., en el documento WO 2007/090584.

La proteína dependiente de vitamina K puede ser el factor IX. En una realización, el factor IX es el factor IX humano. En una realización adicional, el factor IX es una proteína de fusión. El factor IX puede ser una proteína de fusión de albúmina.

La proteína dependiente de vitamina K puede ser el factor X. En una realización, el factor X es el factor IX humano. En una realización adicional, el factor X es una proteína de fusión. El factor X puede ser una proteína de fusión de albúmina.

La proteína dependiente de vitamina K también puede ser una cualquiera de FII, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificación y la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular. En una realización, la proteína dependiente de vitamina K es proteína humana. En una realización adicional, la proteína dependiente de vitamina K es una proteína de fusión. La proteína dependiente de vitamina K puede ser una proteína de fusión de albúmina.

En una realización, el cultivo celular es un cultivo discontinuo. El cultivo se inocula con una cantidad adecuada de células huésped y medio basal. En un cultivo discontinuo, las células crecen en el medio basal durante todo el cultivo.

En otra realización, el cultivo celular es un cultivo de alimentación semicontinua. El cultivo se inocula con una cantidad adecuada de células huésped y medio basal. Se añade medio de alimentación durante el cultivo para reponer nutrientes y/o complementos. En una realización, la alimentación se añade de manera continua. En otra realización, la alimentación se añade periódicamente. La adición de la alimentación puede comenzar el día 0, día 1 o en cualquier



momento posterior desde el momento de inoculación del cultivo. Además, se pueden añadir múltiples alimentos diferentes que comprenden nutrientes o complementos diferentes de manera independiente entre sí al cultivo celular. En una realización, el estado de los nutrientes o complementos del cultivo se supervisa durante todo el cultivo y el alimento se añade según las necesidades del cultivo.

5 En otra realización, el cultivo celular es un cultivo de perfusión. El cultivo se inocula con una cantidad adecuada de células huésped y medio basal. El medio de perfusión se añade durante el cultivo para reponer los nutrientes y/o para compensar el medio eliminado mediante recogida. En una realización, el medio de perfusión se añade de manera continua. El medio de perfusión se puede añadir a una velocidad de 0,5 a 2 volúmenes de cultivo al día. En otra realización, el medio de perfusión se añade de manera semicontinua.

10 En una realización, las células huésped que expresan la proteína dependiente de vitamina K se cultivan durante un periodo de tiempo de al menos 5 días, preferentemente durante un periodo de tiempo de al menos 7 días, más preferentemente durante un periodo de tiempo de al menos 9 días.

En una realización, se proporciona L-glutión a una concentración de 0,5-13 mmol/l, preferentemente 2-10 mmol/l, más preferentemente 3,75-7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido alfa-cetoglutarico a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido succínico a una concentración de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido oxaloacético a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido málico a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 7,5-30 mmol/l, más preferentemente 10-20 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido fumárico a una concentración de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido cítrico a una concentración de 0,5-20 mmol/l, preferentemente 1-15 mmol/l, más preferentemente 1,5-3,75 mmol/l en el cultivo celular.

En una realización, se proporciona L-glutión a una concentración de al menos 0,5 mmol/l, preferentemente al menos 2 mmol/l, más preferentemente al menos 3,75 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido alfa-cetoglutarico a una concentración de al menos 5 mmol/l, preferentemente al menos 10 mmol/l, más preferentemente al menos 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido succínico a una concentración de al menos 2 mmol/l, preferentemente al menos 5 mmol/l, más preferentemente al menos 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido oxaloacético a una concentración de al menos 5 mmol/l, preferentemente al menos 10 mmol/l, más preferentemente al menos 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido málico a una concentración de al menos 5 mmol/l, preferentemente al menos 7,5 mmol/l, más preferentemente al menos 10 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido fumárico a una concentración de al menos 2 mmol/l, preferentemente al menos 5 mmol/l, más preferentemente al menos 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, se proporciona ácido cítrico a una concentración de al menos 0,5 mmol/l, preferentemente al menos 1 mmol/l, más preferentemente al menos 1,5 mmol/l en el cultivo celular.

En una realización preferida, se proporciona ácido alfa-cetoglutarico en el cultivo celular. En el cultivo celular, se pueden proporcionar uno o más del grupo que consiste en L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico a las concentraciones indicadas y se pueden combinar entre sí. En una realización, el medio de cultivo celular comprende una combinación de dos o más cualesquiera de L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico. En una realización adicional, se combina ácido alfa-cetoglutarico con uno o más de L-glutión, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.

El medio basal puede ser cualquier medio basal de cultivo celular convencional disponible en el mercado que comprenda al menos las cantidades mínimas de nutrientes necesarias para el crecimiento celular. En una realización, el medio basal está exento de suero. En una realización preferida, el medio basal está definido químicamente. En otra realización preferida, el medio basal está exento de proteínas de origen animal o humano. En una realización preferida adicional, el medio basal está exento de proteínas.

En una realización, se proporciona L-glutión a una concentración de 0,5-13 mmol/l, preferentemente 2-10 mmol/l, más preferentemente 3,75-7,5 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido alfa-cetoglutarico a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido succínico a una concentración de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido oxaloacético a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 10-40 mmol/l, más preferentemente 15-30 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido málico a una concentración de 5-50 mmol/l, preferentemente 7,5-30 mmol/l, más preferentemente 10-20 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido fumárico a una concentración de 2-50 mmol/l, preferentemente 5-30 mmol/l, más preferentemente 7,5-15 mmol/l en el medio basal. En una realización, se proporciona ácido cítrico a una concentración de 0,5-20 mmol/l, preferentemente 1-15 mmol/l, más preferentemente 1,5-3,75 mmol/l en el medio basal.

En el medio basal, se pueden proporcionar uno o más del grupo que consiste en L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico a las concentraciones indicadas y se

pueden combinar entre sí. El medio de alimentación puede ser cualquier medio de alimentación convencional disponible en el mercado que comprenda nutrientes y complementos que se consuman durante el cultivo celular en altas concentraciones. En una realización, el medio de alimentación está exento de suero. En una realización preferida, el medio de alimentación está definido químicamente. En otra realización preferida, el medio de alimentación está exento de proteínas de origen animal o humano. En una realización preferida adicional, el medio de alimentación está exento de proteínas.

En una realización, el reactivo potenciador del cultivo celular se proporciona en el medio basal y se añade un medio de alimentación al cultivo celular, en el que el medio de alimentación comprende nutrientes que se consumen durante el cultivo celular.

El medio de alimentación puede comprender uno o más de L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico. En una realización, el medio de alimentación se añade al cultivo celular en una cantidad suficiente para mantener la concentración del reactivo potenciador del cultivo celular respectivo en el cultivo celular. En una realización, el L-glutatión por encima de una concentración de 0,5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 2 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 3,75 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de L-glutatión se mantiene a una concentración entre 0,5-13 mmol/l, preferentemente entre 2-10 mmol/l, más preferentemente entre 3,75-7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido alfa-cetoglutarico se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de alfa-cetoglutarico se mantiene a una concentración entre 5-50 mmol/l, preferentemente entre 10-40 mmol/l, más preferentemente entre 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido succínico se mantiene por encima de una concentración de 2 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido succínico se mantiene a una concentración entre 2-50 mmol/l, preferentemente entre 5-30 mmol/l, más preferentemente entre 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido oxaloacético se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido oxaloacético se mantiene a una concentración entre 5-50 mmol/l, preferentemente entre 10-40 mmol/l, más preferentemente entre 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido málico se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido málico se mantiene a una concentración entre 5-50 mmol/l, preferentemente entre 7,5-30 mmol/l, más preferentemente entre 10-20 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido fumárico se mantiene por encima de una concentración de 2 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido fumárico se mantiene a una concentración entre 2-50 mmol/l, preferentemente entre 5-30 mmol/l, más preferentemente entre 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido cítrico se mantiene por encima de una concentración de 0,5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 1 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 1,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido cítrico se mantiene a una concentración entre 0,5-20 mmol/l, preferentemente entre 1-15 mmol/l, más preferentemente entre 1,5-3,75 mmol/l en el cultivo celular.

En el medio de alimentación, se pueden combinar entre sí uno o más del grupo que consiste en L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.

El medio de perfusión puede ser cualquier medio de perfusión convencional. El medio de perfusión puede ser idéntico al medio basal. En una realización, el medio de perfusión está exento de suero. En una realización preferida, el medio de perfusión está definido químicamente. En otra realización preferida, el medio de perfusión está exento de proteínas de origen animal o humano. En una realización preferida adicional, el medio de perfusión está exento de proteínas.

En una realización, el medio de perfusión comprende uno o más de L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico. En una realización, el medio de perfusión se añade al cultivo celular en una cantidad suficiente para mantener la concentración del reactivo potenciador del cultivo celular respectivo en el cultivo celular. En una realización, el L-glutatión por encima de una concentración de 0,5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 2 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 3,75 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de L-glutatión se mantiene a una concentración entre 0,5-13 mmol/l, preferentemente entre 2-10 mmol/l, más preferentemente entre 3,75-7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido alfa-cetoglutarico se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de alfa-cetoglutarico se mantiene a una concentración entre 5-50 mmol/l, preferentemente entre 10-40 mmol/l, más preferentemente entre 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido succínico se mantiene por encima de una concentración de 2 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido succínico se mantiene a una concentración entre 2-50 mmol/l, preferentemente entre 5-

30 mmol/l, más preferentemente entre 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido oxaloacético se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido oxaloacético se mantiene a una concentración entre 5-50 mmol/l, preferentemente entre 10-40 mmol/l, más preferentemente entre 15-30 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido málico se mantiene por encima de una concentración de 5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 10 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido málico se mantiene a una concentración entre 5- 50 mmol/l, preferentemente entre 7,5-30 mmol/l, más preferentemente entre 10-20 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido fumárico se mantiene por encima de una concentración de 2 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 5 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 7,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido fumárico se mantiene a una concentración entre 2-50 mmol/l, preferentemente entre 5-30 mmol/l, más preferentemente entre 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular. En una realización, el ácido cítrico se mantiene por encima de una concentración de 0,5 mmol/l, preferentemente por encima de una concentración de 1 mmol/l, más preferentemente por encima de una concentración de 1,5 mmol/l en el cultivo celular. En una realización adicional, la concentración de ácido cítrico se mantiene a una concentración entre 0,5-20 mmol/l, preferentemente entre 1-15 mmol/l, más preferentemente entre 1,5-3,75 mmol/l en el cultivo celular.

En el medio de perfusión, se pueden combinar entre sí uno o más del grupo que consiste en L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.

Después de la expresión de proteínas, la proteína recombinante dependiente de vitamina K puede purificarse del cultivo celular. En una realización, la proteína dependiente de vitamina K se secreta al medio y la proteína dependiente de vitamina K puede purificarse del sobrenadante. Por lo tanto, el procedimiento de purificación puede implicar la eliminación de las células huésped y otros sólidos del cultivo celular. Dicha eliminación puede lograrse, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración. En una realización, la proteína recombinante dependiente de vitamina K se purifica adicionalmente mediante cromatografía, tal como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía multimodal. El procedimiento de purificación puede implicar además centrifugación, precipitación con etanol y/o diálisis. En una realización, la proteína dependiente de vitamina K se concentra después de la purificación. El procedimiento puede implicar etapas adicionales de separación y/o aislamiento.

Algunos procedimientos comprenden además medir la actividad cromogénica de la proteína dependiente de vitamina K. En realizaciones específicas, la proteína recombinante dependiente de vitamina K ha aumentado la actividad cromogénica en relación con una proteína dependiente de vitamina K producida en condiciones similares, pero en las que el medio de cultivo celular no comprende un intermedio de TCA y/o L-glutión.

En una realización, la actividad cromogénica del FVII preparado según el procedimiento de la invención aumenta en 20 % en comparación con el FVII preparado en condiciones similares, pero en las que el medio de cultivo celular no comprende un intermedio de TCA y/o L-glutión. En otra realización, la actividad cromogénica del FVII preparado según el procedimiento de la invención aumenta en 50 % en comparación con el FVII preparado en condiciones similares, pero en las que el medio de cultivo celular no comprende un intermedio de TCA y/o L-glutión. En una realización adicional, la actividad cromogénica del FVII preparado según el procedimiento de la invención aumenta en 100 % en comparación con el FVII preparado en condiciones similares, pero en las que el medio de cultivo celular no comprende un intermedio de TCA y/o L-glutión. En otra realización, la actividad cromogénica del FVII preparado según el procedimiento de la invención aumenta en 200 % en comparación con el FVII preparado en condiciones similares, pero en las que el medio de cultivo celular no comprende un intermedio de TCA y/o L-glutión.

Se proporciona además el uso de L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o ácido cítrico o sales de los mismos para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.

También se proporciona el uso de un medio de cultivo celular que comprende L-glutión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o ácido cítrico para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.

En una realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende células huésped que comprenden un sistema de expresión que expresa una proteína recombinante dependiente de vitamina K y un medio de cultivo celular como se describe en el presente documento. Además se proporciona un biorreactor que comprende la composición de materia.

El procedimiento proporcionado en el presente documento es para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K. En consecuencia, empleando el procedimiento de la invención, una proteína dependiente de vitamina K se puede preparar de manera más eficaz que con los procedimientos desvelados en la técnica anterior. En particular, la presencia de L-glutión o un intermedio de TCA en el medio de cultivo celular durante la expresión de la proteína FVII dependiente de vitamina K aumenta la actividad de FVII (figuras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B, 4C, 5B, 5C, 6B, 6C, 7B y 7C). El piruvato de sodio que se usó como control no influye en el rendimiento y/o la actividad

del FVII (figuras 8B y 8C). En general, la presencia de L-glutati3n, un intermedio de TCA o piruvato de sodio en el medio de cultivo celular solo tiene una influencia menor en la densidad celular viable (DCV) (figuras 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A y 8A).

Sin desear quedar ligado a teor3a alguna, se proporciona la siguiente explicaci3n para el efecto logrado: Para la expresi3n de una prote3na dependiente de vitamina K, es necesaria vitamina K para la formaci3n de restos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla). La  $\gamma$ -carboxilaci3n del 3cido glut3mico est3 acoplada a la ruta de reciclaje de la vitamina K y depende del potencial reductor celular. La hip3tesis es que la adici3n de un intermedio de TCA al cultivo proporciona una fuente adicional de intermedios que alimentan el ciclo de TCA generando NADH adicional (es decir, potencial reductor) necesario para mantener la  $\gamma$ -carboxilaci3n de restos de 3cido glut3mico de prote3nas dependientes de vitamina K. La adici3n de L-glutati3n al cultivo ayuda de manera similar a mantener un ambiente redox favorable para la  $\gamma$ -carboxilaci3n del 3cido glut3mico.

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### Cultivo celular

La l3nea celular de ovario de h3mster chino que expresa la prote3na de fusi3n del factor VII humano recombinante se cre3 usando el sistema de expresi3n GS (Lonza). Estas c3lulas se mantuvieron en medio CD-CHO AGT disponible en el mercado (Invitrogen) complementado con 50  $\mu$ g/l de bisulfito s3dico de menadiona reducido (rMSB) (Richman), metionina sulfoximina 25  $\mu$ M (MSX) (Sigma) e insulina 1 mg/l (Novo Nordisk). Las c3lulas se cultivaron en matraces de agitaci3n mantenidos a 37  $^{\circ}$ C con atm3sfera de CO<sub>2</sub> al 8 % y se subcultivaron cada 3 d3as a 3 x 10<sup>5</sup> c3lulas/ml.

Se usaron c3lulas de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos (al final de los pases regulares de 3 d3as) para los experimentos. Las c3lulas se centrifugaron, se elimin3 la cantidad adecuada de medios gastados y los sedimentos celulares se resuspendieron en medios gastados restantes a una concentraci3n celular de 3 x 10<sup>6</sup> c3lulas/ml. Se usaron 50  $\mu$ l de esta suspensi3n celular para inocular cada pocillo de una placa de 96 pocillos deepwell cuadrados de fondo en V de polipropileno (Corning) que conten3a 450  $\mu$ l de un medio de cultivo celular basado en DMEM/F12 complementado con diferentes niveles de L-glutati3n reducido (Sigma). Los intervalos de concentraci3n de L-glutati3n reducido probados fueron 0,01 - 15 mM con un control negativo exento de L-glutati3n reducido correspondiente. Todos los cultivos conten3an 213  $\mu$ g/l de rMSB para mantener el procesamiento celular adecuado del factor VII. Todas las etapas de manipulaci3n de l3quidos se realizaron utilizando una plataforma rob3tica Tecan Freedom EVO 200 (Tecan).

Las placas de cultivo se sellaron con una membrana transpirable (Corning) para mantener la esterilidad y los cultivos se mantuvieron a 37  $^{\circ}$ C con atm3sfera de CO<sub>2</sub> al 8 % en una incubadora agitadora (Kuhner) que funciona a 350 rpm con un di3metro orbital de 25 mm.

#### Determinaci3n del crecimiento y la viabilidad celular

La densidad y la viabilidad celular en el cultivo se determinaron fuera de l3nea a partir de una muestra de cultivo obtenida el d3a 5 y el d3a 7 (contados a partir de la inoculaci3n del cultivo) usando un cit3metro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec), utilizando yoduro de propidio (Miltenyi Biotec) para tinci3n de viabilidad. Los resultados se muestran en la figura 1A. Los resultados muestran que en la mayor3a de las concentraciones probadas, L-glutati3n no tiene ning3n efecto sobre la densidad celular viable.

#### Cuantificaci3n del factor VII recombinante

La actividad cromog3nica del factor VII recombinante en los cultivos se determin3 a partir de muestras de sobrenadante diluidas en serie obtenidas los d3as 7, 9 y 10 (contados a partir de la inoculaci3n del cultivo) utilizando un equipo cromog3nico disponible en el mercado equipo de factor VII COASET (Chromogenix). El ensayo se adapt3 para su uso con el analizador autom3tico de hemostasia Sysmex CS-5100 (Siemens Healthcare) y se realiz3 seg3n las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en las figuras 1B y 1C. Los resultados muestran que la presencia de L-glutati3n en el cultivo celular aumenta la actividad cromog3nica de FVII.

### Ejemplo 2:

#### Cultivo celular

La l3nea celular de ovario de h3mster chino que expresa la prote3na de fusi3n del factor VII humano recombinante se cre3 usando el sistema de expresi3n GS (Lonza). Estas c3lulas se mantuvieron en medio CD-CHO AGT disponible en el mercado (Invitrogen) complementado con 50  $\mu$ g/l de bisulfito s3dico de menadiona reducido (rMSB) (Richman), metionina sulfoximina 25  $\mu$ M (MSX) (Sigma) e insulina 1 mg/l (Novo Nordisk). Las c3lulas se cultivaron en matraces de agitaci3n mantenidos a 37  $^{\circ}$ C con atm3sfera de CO<sub>2</sub> al 8 % y se subcultivaron cada 3 d3as a 3 x 10<sup>5</sup> c3lulas/ml.

Se usaron c3lulas de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos (al final de los pases regulares de 3 d3as) para los experimentos. Las c3lulas se centrifugaron, se elimin3 la cantidad adecuada de medios gastados y los sedimentos celulares se resuspendieron en medios gastados restantes a una concentraci3n celular de 3 x 10<sup>6</sup> c3lulas/ml. Se

usaron 50 µl de esta suspensión celular para inocular cada pocillo de una placa de 96 pocillos deepwell cuadrados de fondo en V de polipropileno (Corning) que contenía 450 µl de un medio de cultivo celular basado en DMEM/F12 complementado con diferentes niveles de ácido alfa-cetoglutarico (Sigma), ácido málico (Sigma), ácido succínico (Sigma), ácido oxaloacético (Sigma), ácido fumárico (Sigma), ácido cítrico (Sigma) o piruvato de sodio (Sigma). Los intervalos de concentración de ácido alfa-cetoglutarico, ácido málico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido fumárico y ácido cítrico probados fueron de 0,06 - 60 mM con controles negativos correspondientes sin complementos. El intervalo de concentración de piruvato de sodio probado fue de 0,01 - 10 mM con un control negativo correspondiente sin complementos. Todos los cultivos contenían 213 µg/l de rMSB para mantener el procesamiento celular adecuado del factor VII. Todas las etapas de manipulación de líquidos se realizaron utilizando una plataforma robótica Tecan Freedom EVO 200 (Tecan).

Las placas de cultivo se sellaron con una membrana transpirable (Corning) para mantener la esterilidad y los cultivos se mantuvieron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 8 % en una incubadora agitadora (Kuhner) que funciona a 350 rpm con un diámetro orbital de 25 mm.

#### **Determinación del crecimiento y la viabilidad celular**

La densidad y la viabilidad celular se determinaron como se ha descrito para el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las figuras 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A y 8A. Los resultados muestran que en la mayoría de las concentraciones probadas, los complementos indicados no tienen ningún efecto sobre la densidad celular viable.

#### **Cuantificación del factor VII recombinante**

La actividad cromogénica del factor VII recombinante en los cultivos se determinó como se ha descrito para el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las figuras 2B, 2C, 3B, 3C, 4B, 4C, 5B, 5C, 6B, 6C, 7B, 7C, 8B y 8C. Los resultados muestran que la presencia de un intermedio de ciclo de TCA en el cultivo celular aumenta la actividad cromogénica de FVII. El piruvato de sodio que se usó como control negativo no tiene ningún efecto sobre la actividad cromogénica del FVII.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para mejorar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K que comprende las siguientes etapas:
  - a) proporcionar células huésped que comprenden un sistema de expresión que expresa la proteína recombinante dependiente de vitamina K,
  - b) cultivar las células en un medio de cultivo celular que comprende uno o más reactivos potenciadores del cultivo celular y
  - c) separar y/o aislar y/o purificar la proteína recombinante dependiente de vitamina K del cultivo celular, en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular se seleccionan del grupo que consiste en L-glutatión e intermedios del ciclo de TCA.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los intermedios del ciclo de TCA se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo celular comprende una combinación de dos o más cualesquiera de L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succínico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular se proporcionan en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento de la proteína recombinante dependiente de vitamina K y/o para potenciar la actividad de la proteína recombinante dependiente de vitamina K.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona L-glutatión para obtener una concentración de 0,5-13 mmol/l en el cultivo celular.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que se proporciona L-glutatión para obtener una concentración de 3,75-7,5 mmol/l en el cultivo celular.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido alfa-cetoglutarico para obtener una concentración de 5-50 mmol/l en el cultivo celular.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se proporciona ácido alfa-cetoglutarico para obtener una concentración de 15-30 mmol/l en el cultivo celular.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido succínico para obtener una concentración de 2-50 mmol/l en el cultivo celular.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que se proporciona ácido succínico para obtener una concentración de 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido oxaloacético para obtener una concentración de 5-50 mmol/l en el cultivo celular.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se proporciona ácido oxaloacético para obtener una concentración de 15-30 mmol/l en el cultivo celular.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido málico para obtener una concentración de 5-50 mmol/l en el cultivo celular.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se proporciona ácido málico para obtener una concentración de 10-20 mmol/l en el cultivo celular.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido fumárico para obtener una concentración de 2-50 mmol/l en el cultivo celular.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que se proporciona ácido fumárico para obtener una concentración de 7,5-15 mmol/l en el cultivo celular.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona ácido cítrico para obtener una concentración de 0,5-20 mmol/l en el cultivo celular.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que se proporciona ácido cítrico para obtener una concentración de 1,5-3,75 mmol/l en el cultivo celular.
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el glutatión y/o el o los intermedios de TCA se proporcionan al comienzo del cultivo celular.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el cultivo celular es un cultivo de

alimentación semicontinua y en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular están presentes en el medio de cultivo celular basal y/o en el medio de alimentación.

21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el cultivo celular es un cultivo de perfusión y en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular están presentes en el medio de cultivo celular basal y/o en el medio de perfusión.
22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el medio de cultivo celular está exento de cualquier proteína de origen humano o animal.
23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que las células huésped son células CHO.
24. Uso de L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succinico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o ácido cítrico o sales de los mismos para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.
25. Uso de un medio de cultivo celular que comprende L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succinico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y/o cítrico para potenciar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K.
26. Una composición de materia que comprende
  - a) células huésped que comprenden un sistema de expresión que expresa una proteína recombinante dependiente de vitamina K, y
  - b) un medio de cultivo celular que comprende uno o más reactivos potenciadores del cultivo celular a una concentración eficaz para mejorar la actividad de una proteína recombinante dependiente de vitamina K, en el que el o los reactivos potenciadores del cultivo celular se seleccionan del grupo que consiste en L-glutatión, ácido alfa-cetoglutarico, ácido succinico, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico.
27. Un biorreactor que comprende la composición de materia de la reivindicación 26.
28. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, el uso de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, la composición de materia de la reivindicación 26 o el biorreactor de la reivindicación 27, en los que la proteína recombinante dependiente de vitamina K se selecciona de FIX, FVII, FX, FII, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, la proteína de Gla de matriz (MGP) inhibidora de la calcificación y la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) reguladora del crecimiento celular.
29. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, el uso de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, la composición de materia de la reivindicación 26 o el biorreactor de la reivindicación 27, en los que la proteína recombinante dependiente de vitamina K es una proteína FVII.
30. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, el uso de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, la composición de materia de la reivindicación 26 o el biorreactor de la reivindicación 27, en los que la proteína recombinante dependiente de vitamina K es una proteína de fusión FVII.
31. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, el uso de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, la composición de materia de la reivindicación 26 o el biorreactor de la reivindicación 27, en los que la proteína recombinante dependiente de vitamina K es una proteína de fusión de albúmina FVII.

Figura 1A

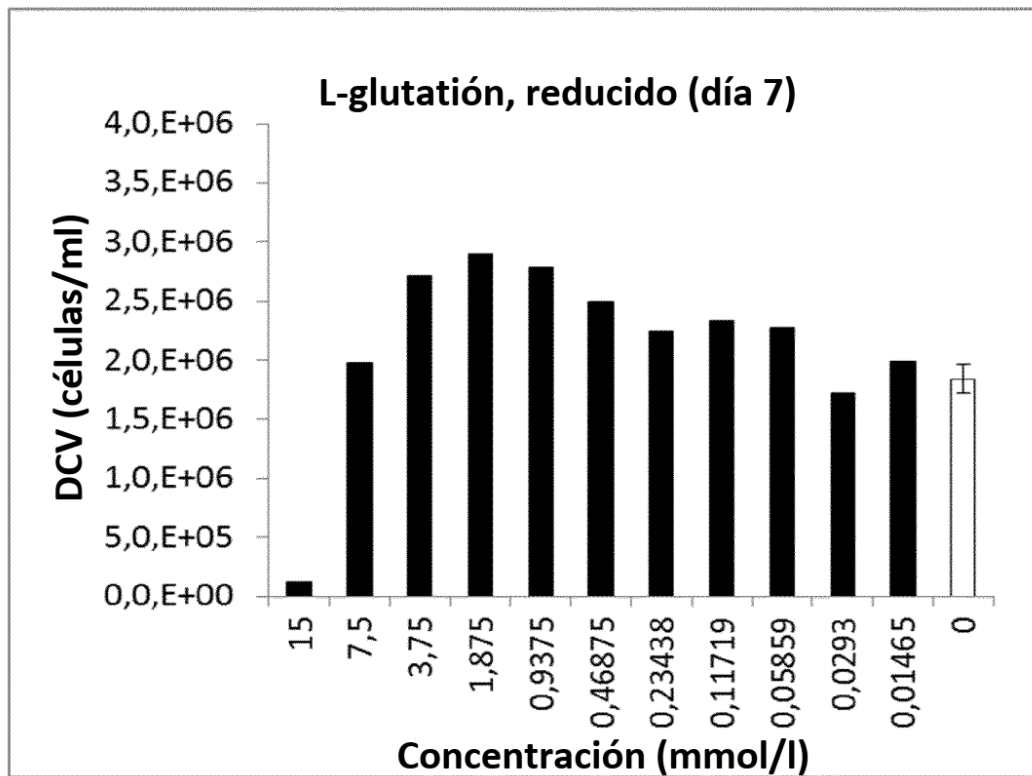
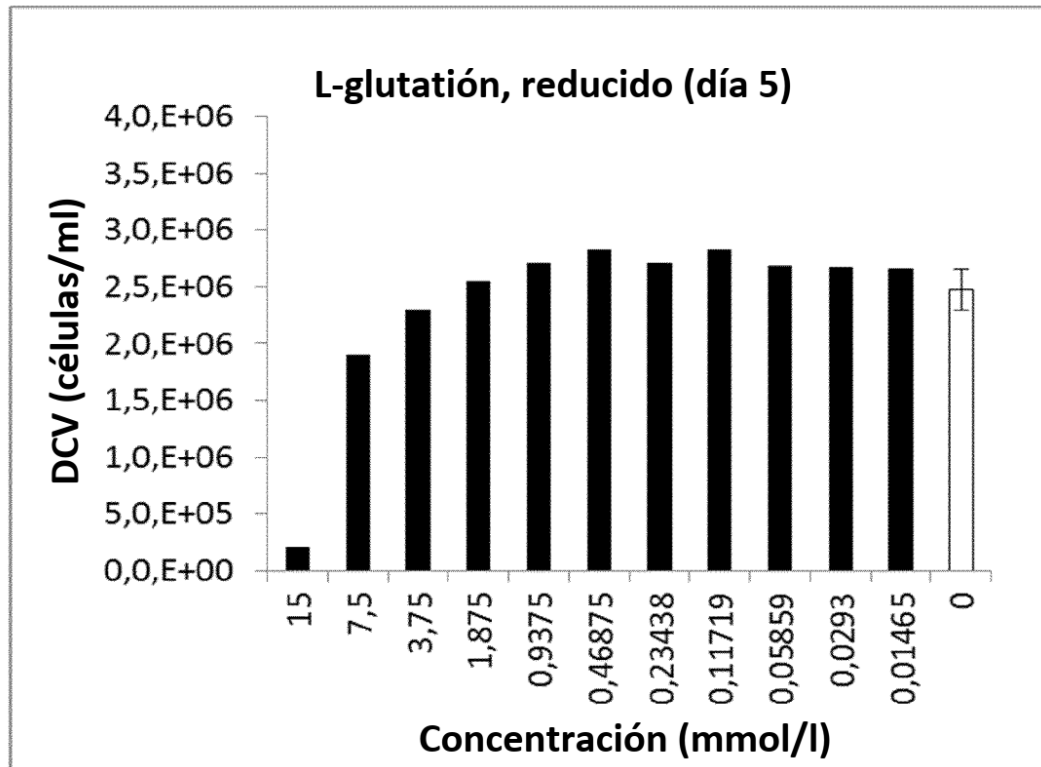




Figura 1B

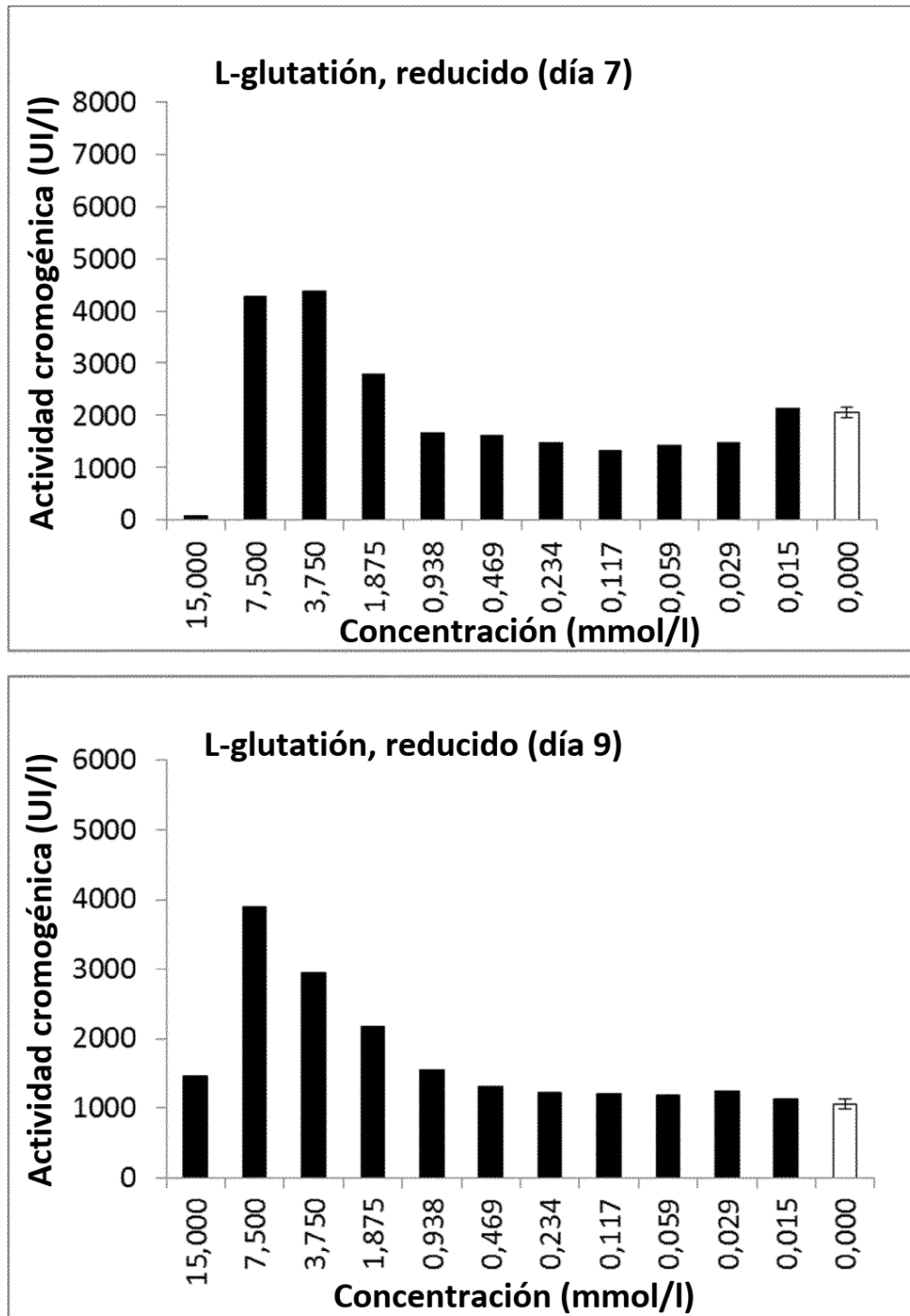


Figura 1C

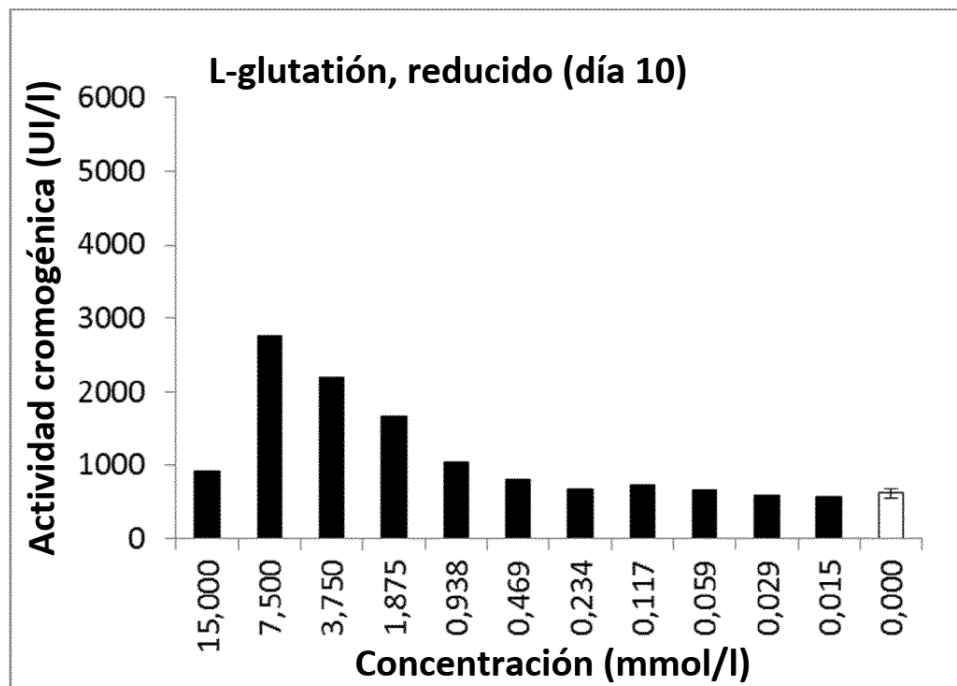


Figura 2A

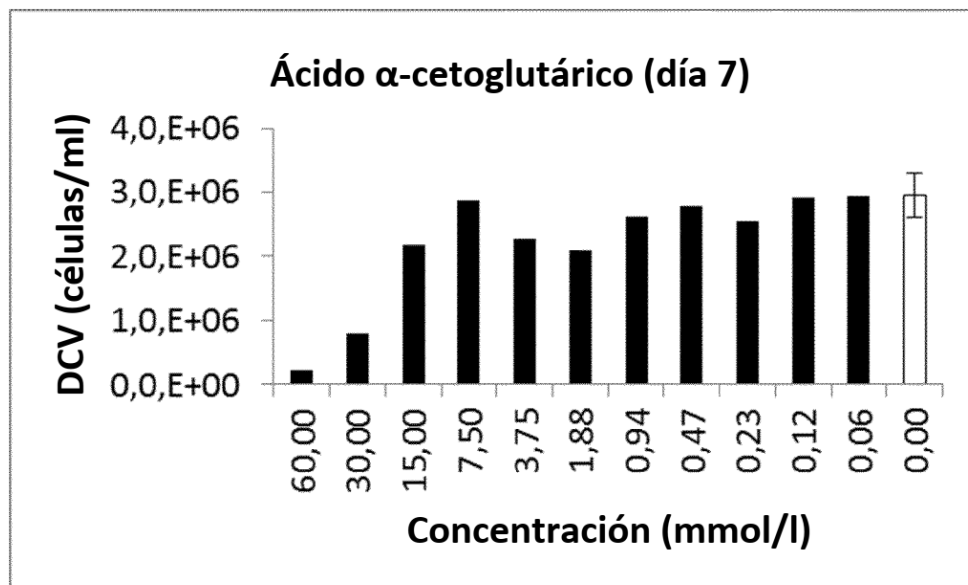
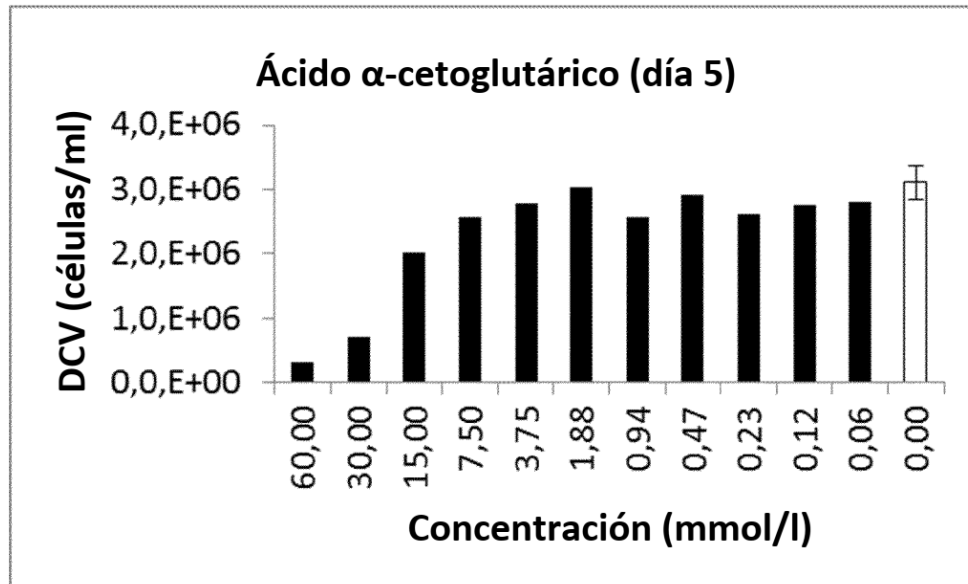


Figura 2B

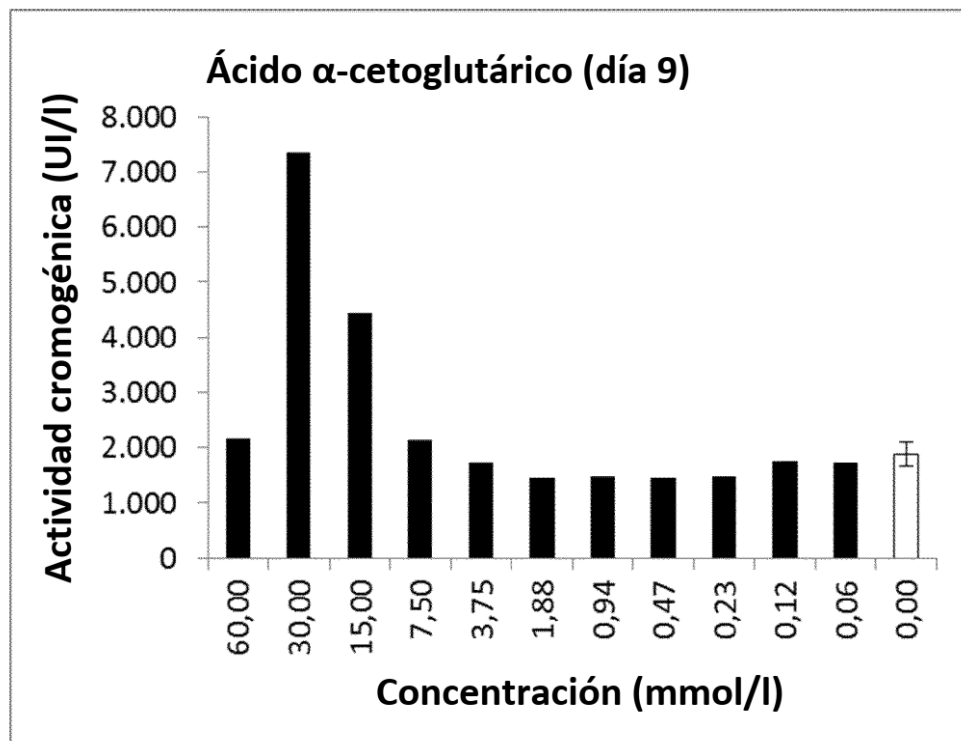
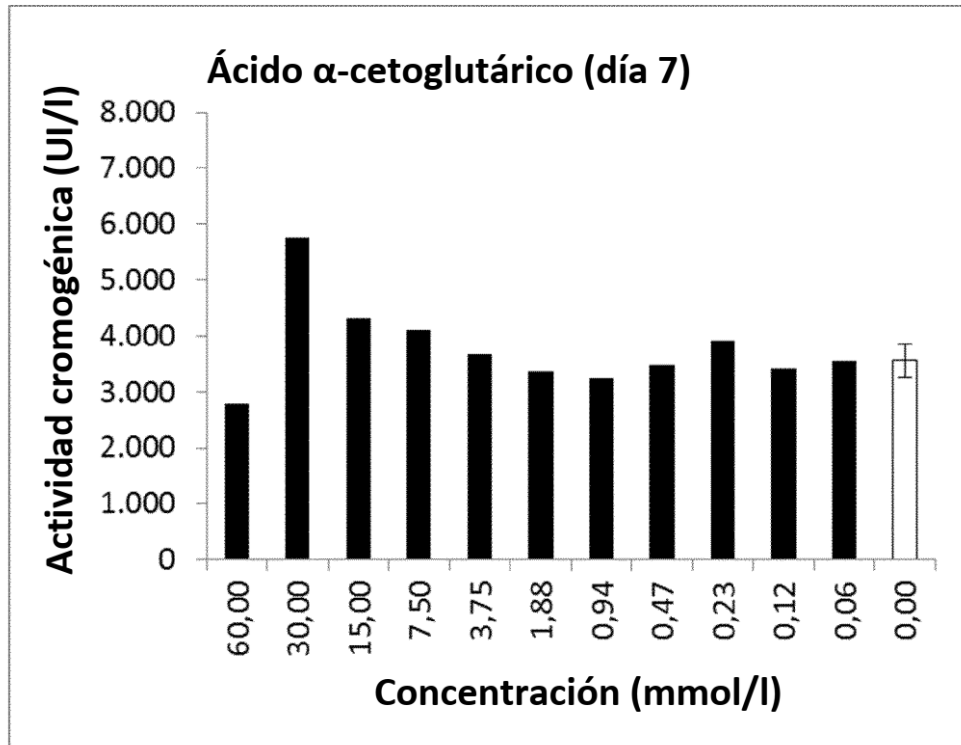


Figura 2C

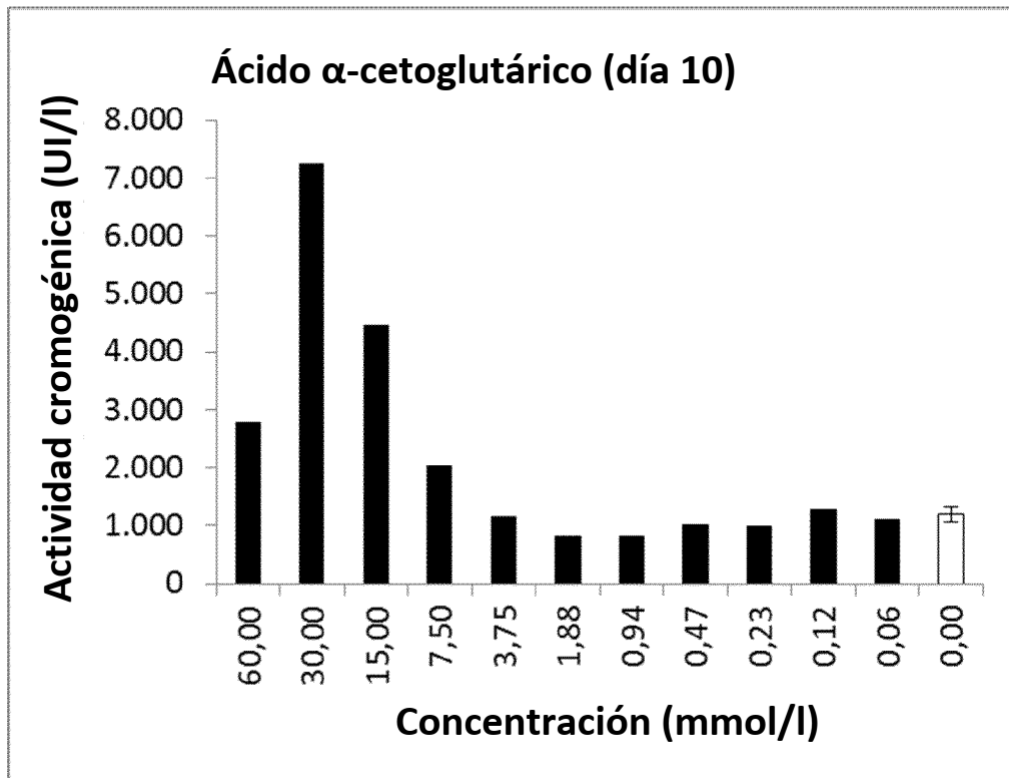


Figura 3A

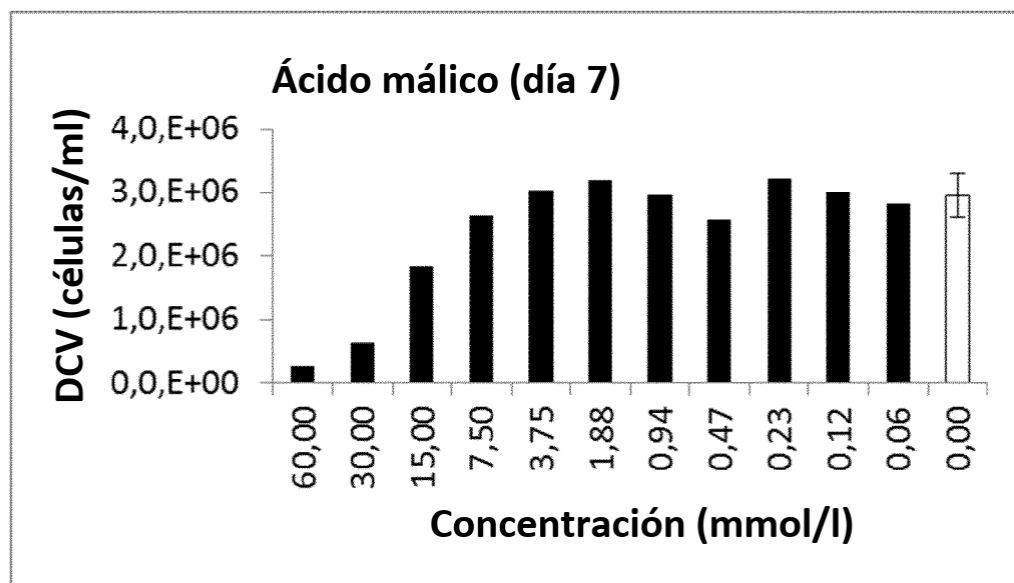
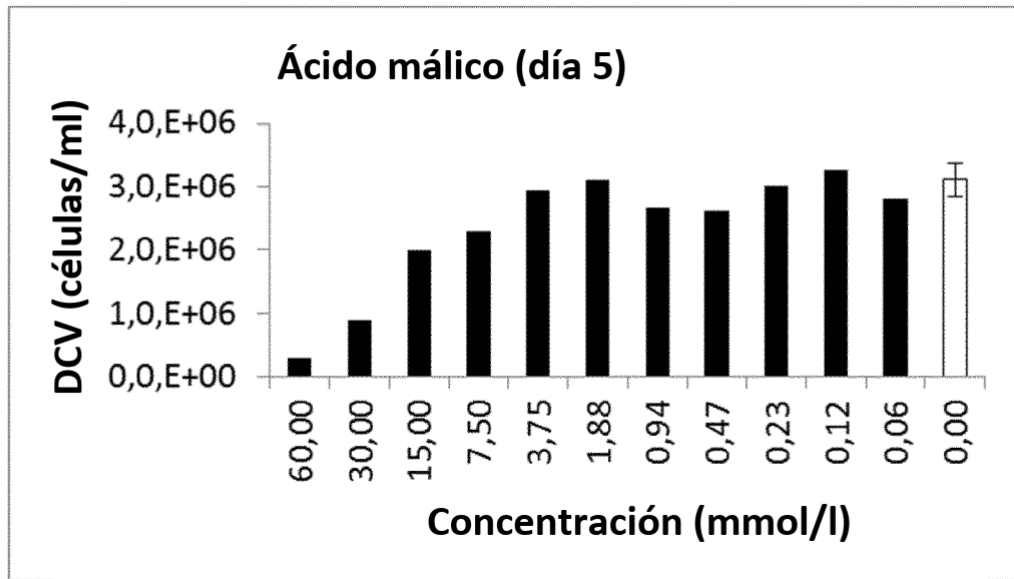


Figura 3B

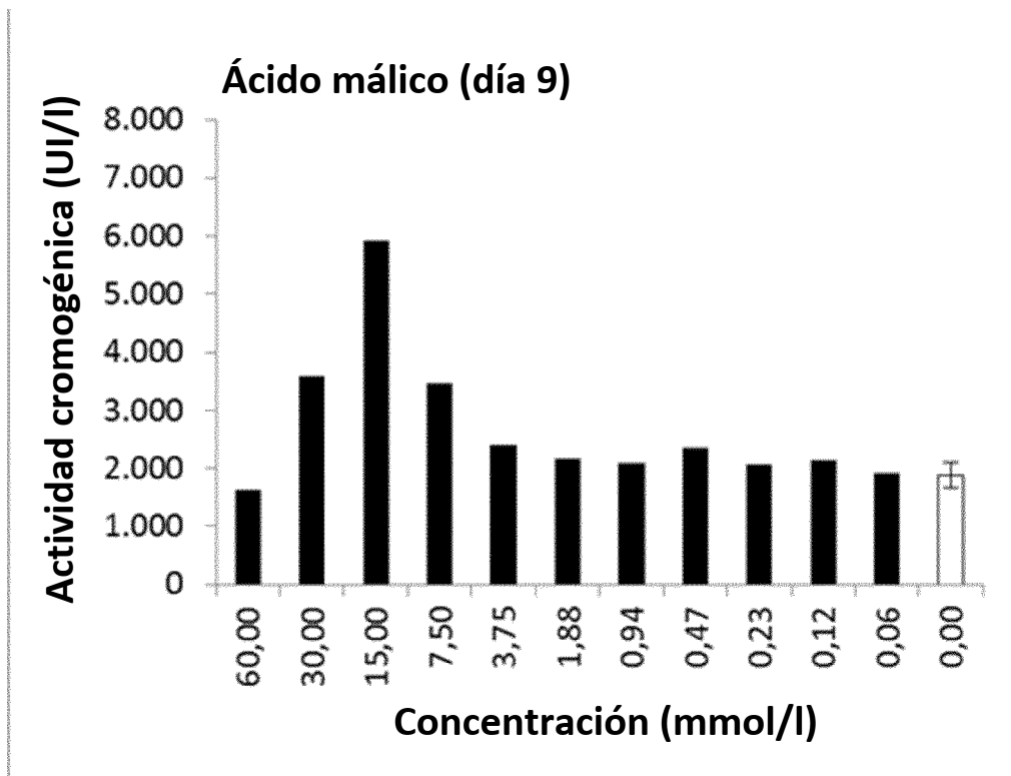
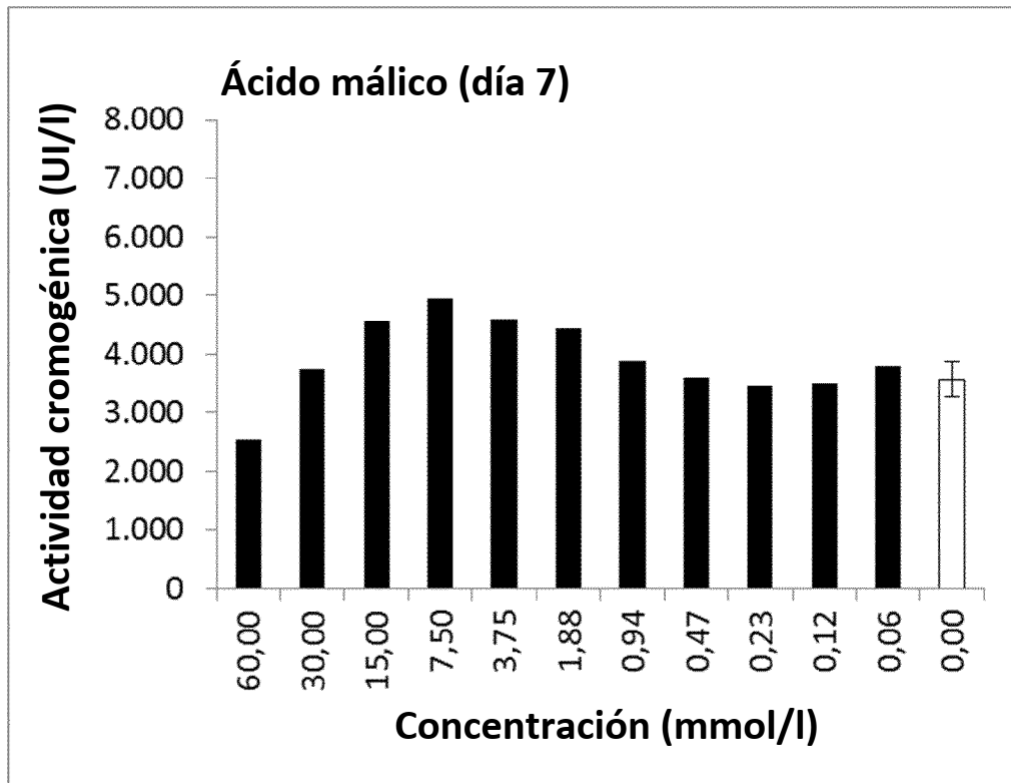


Figura 3C

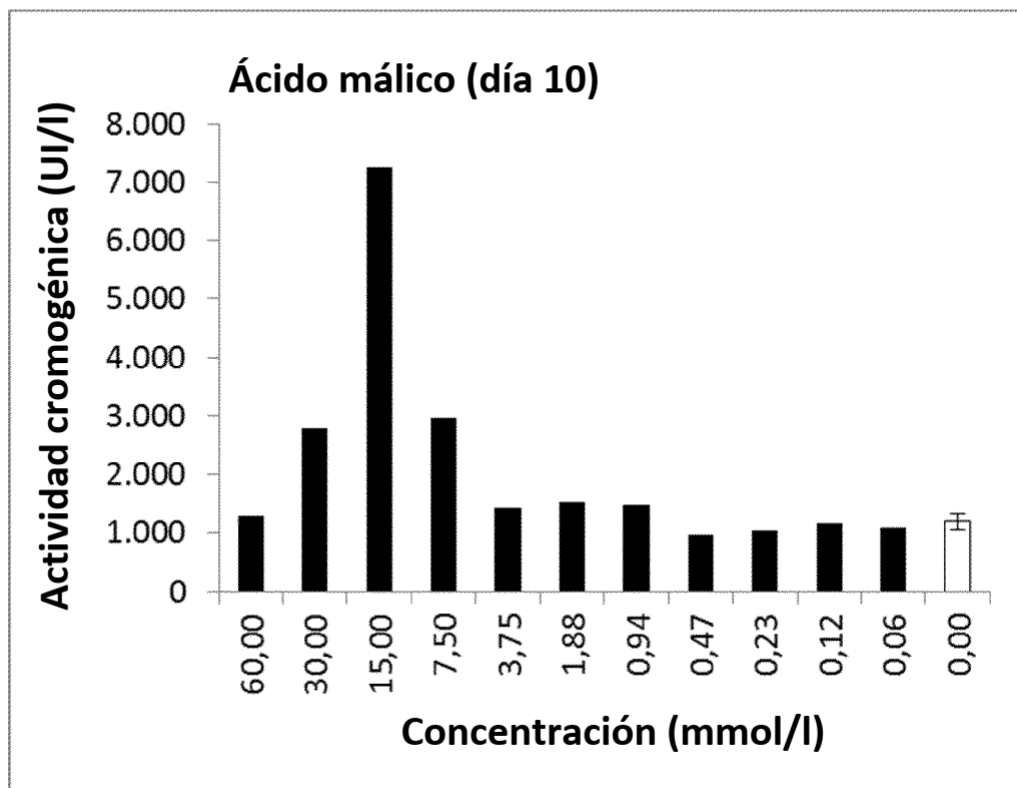




Figura 4A

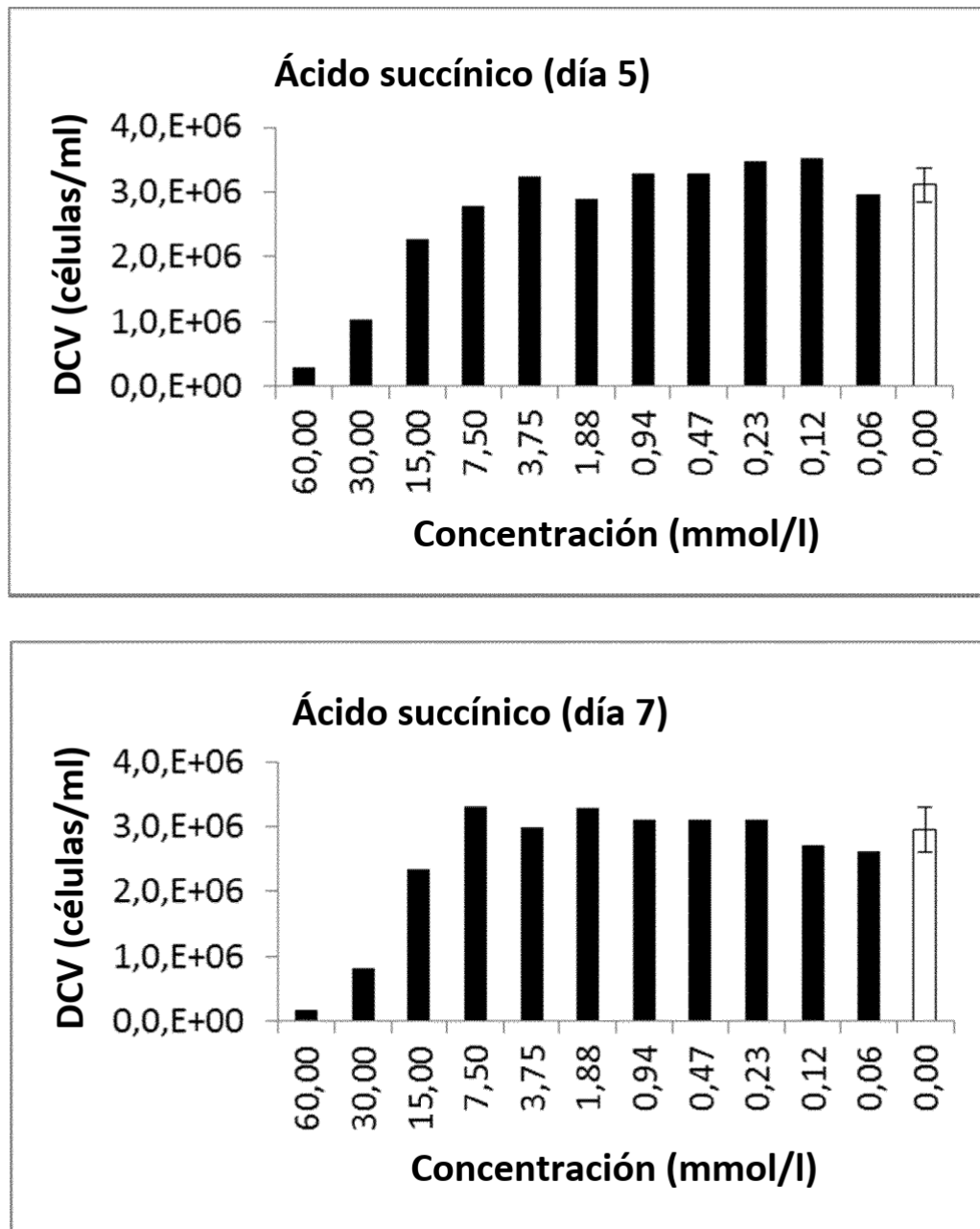


Figura 4B

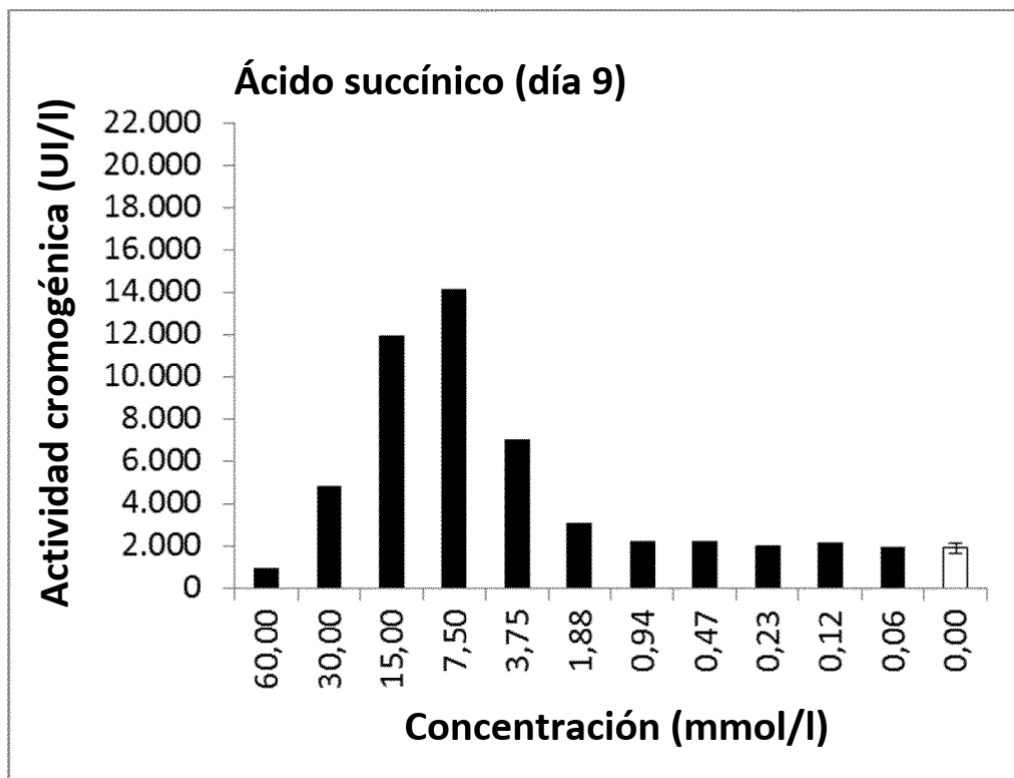
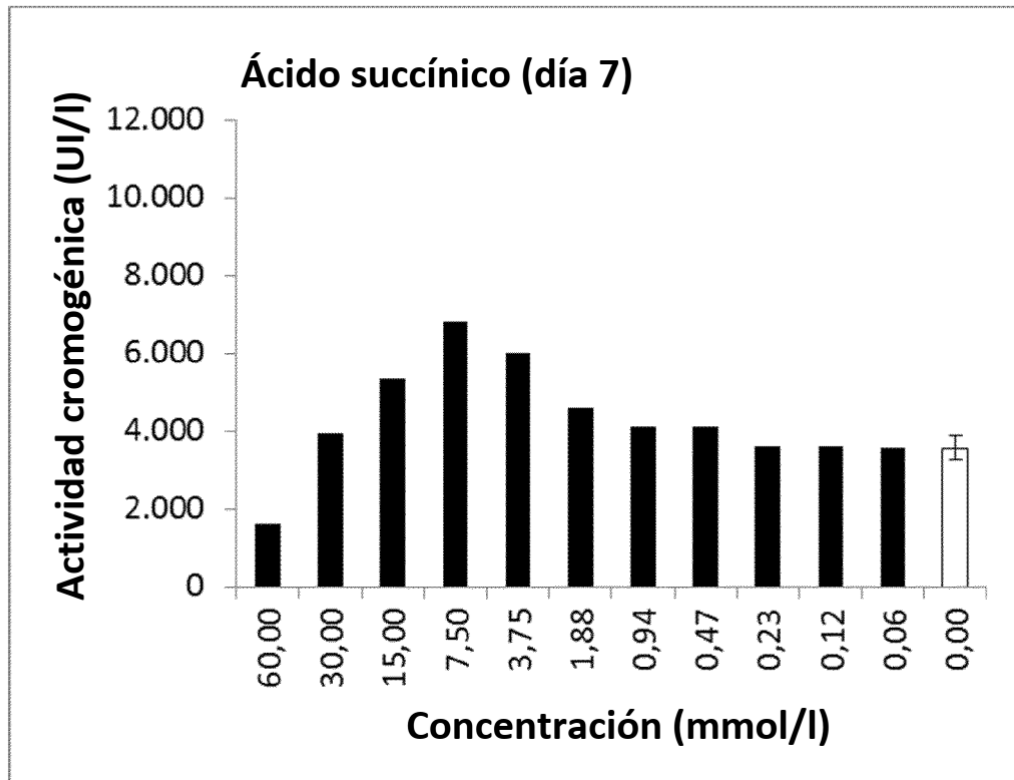


Figura 4C

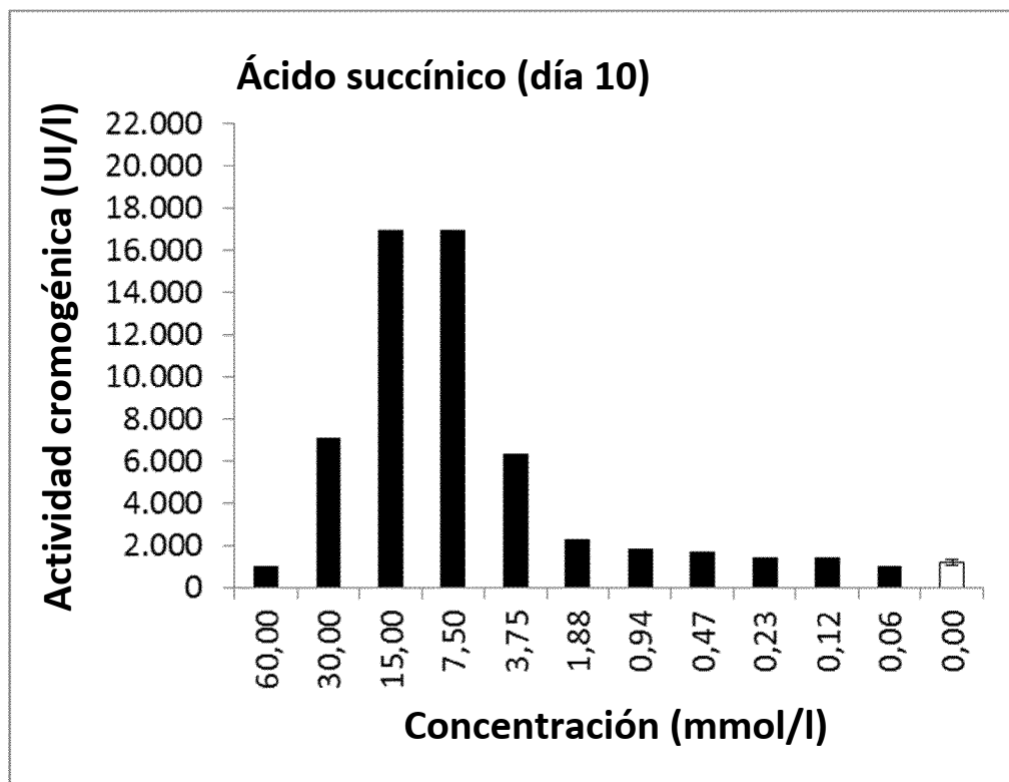


Figura 5A

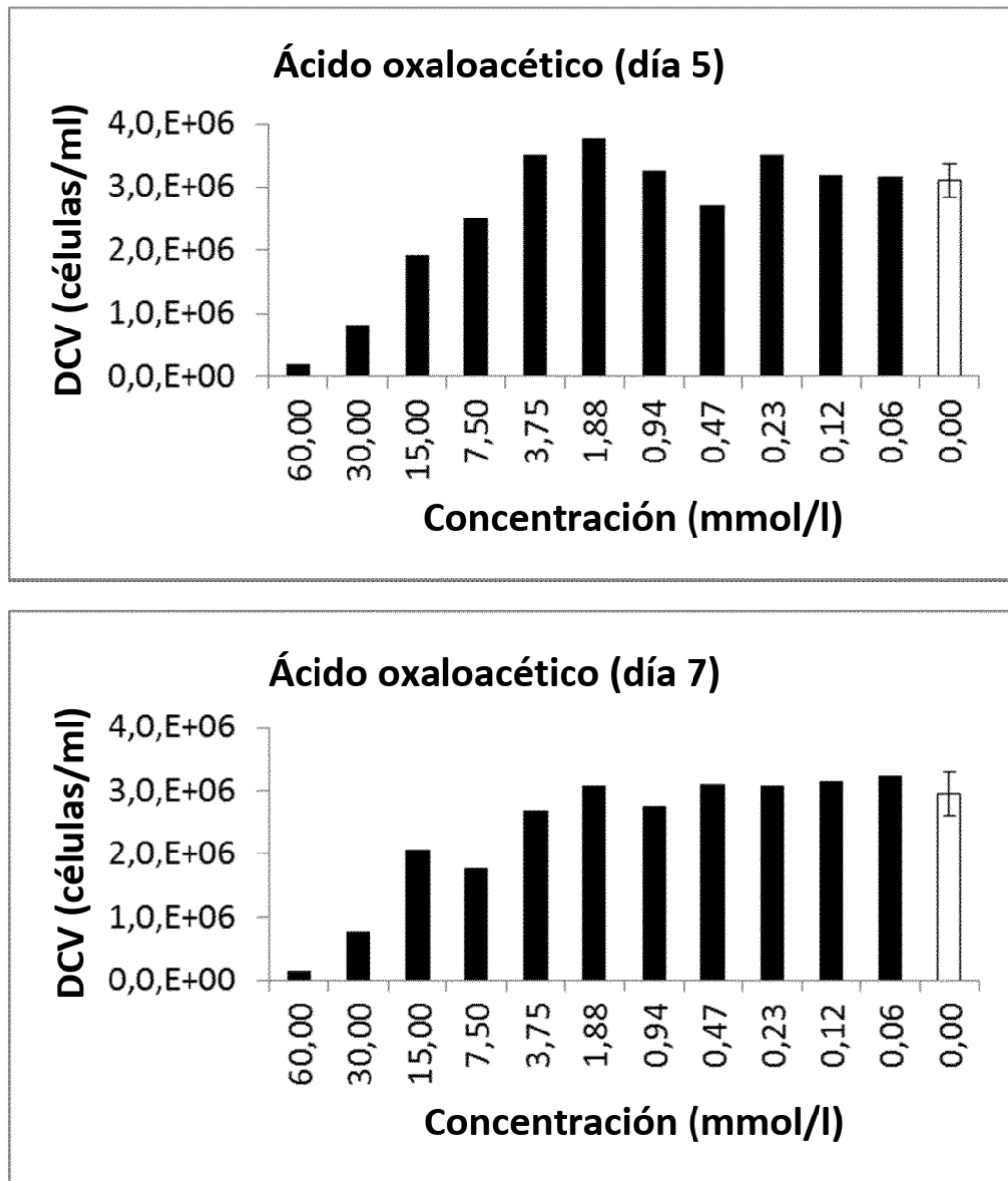


Figura 5B

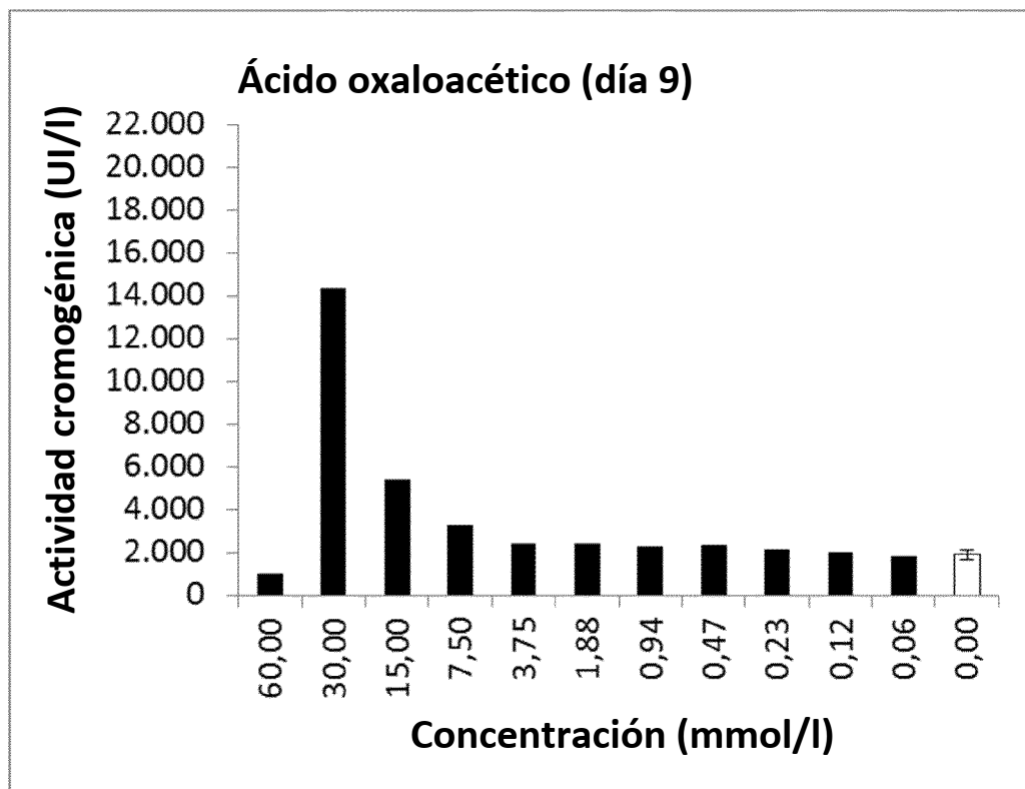
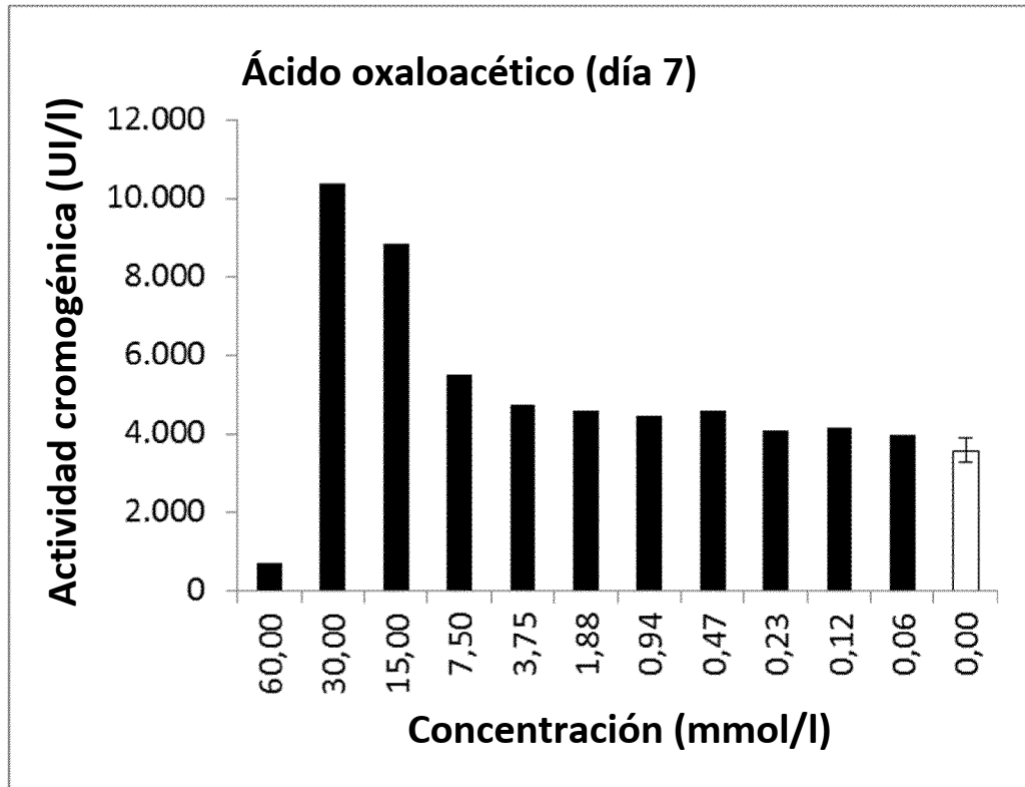


Figura 5C

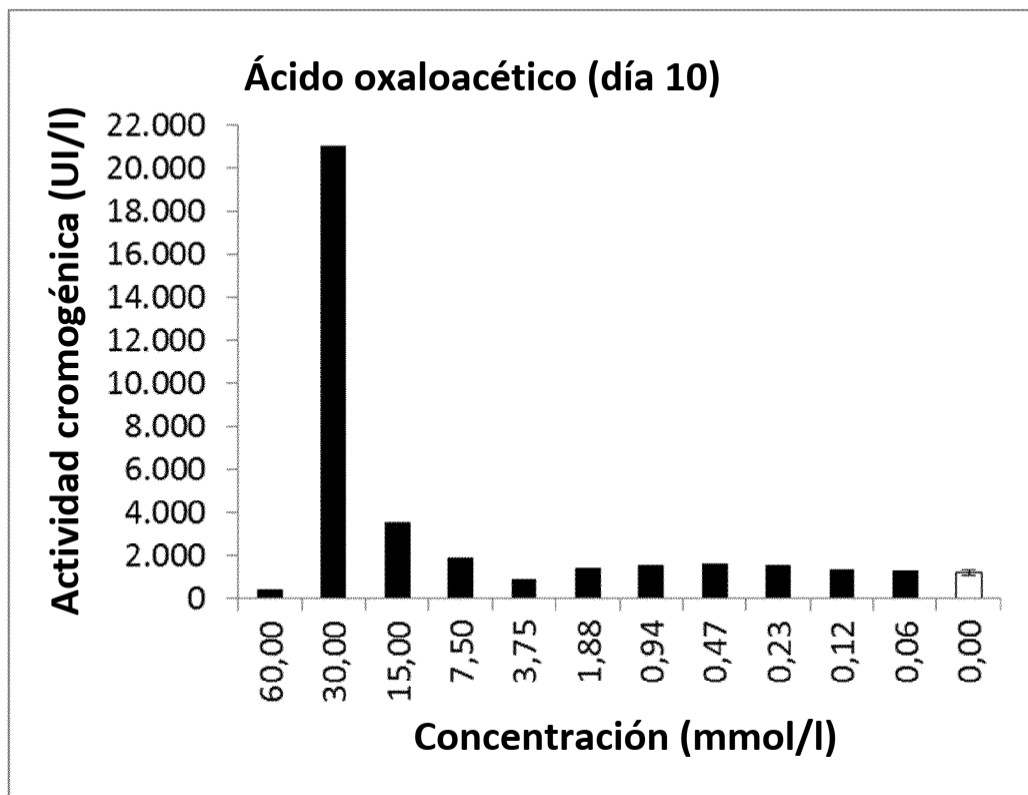


Figura 6A

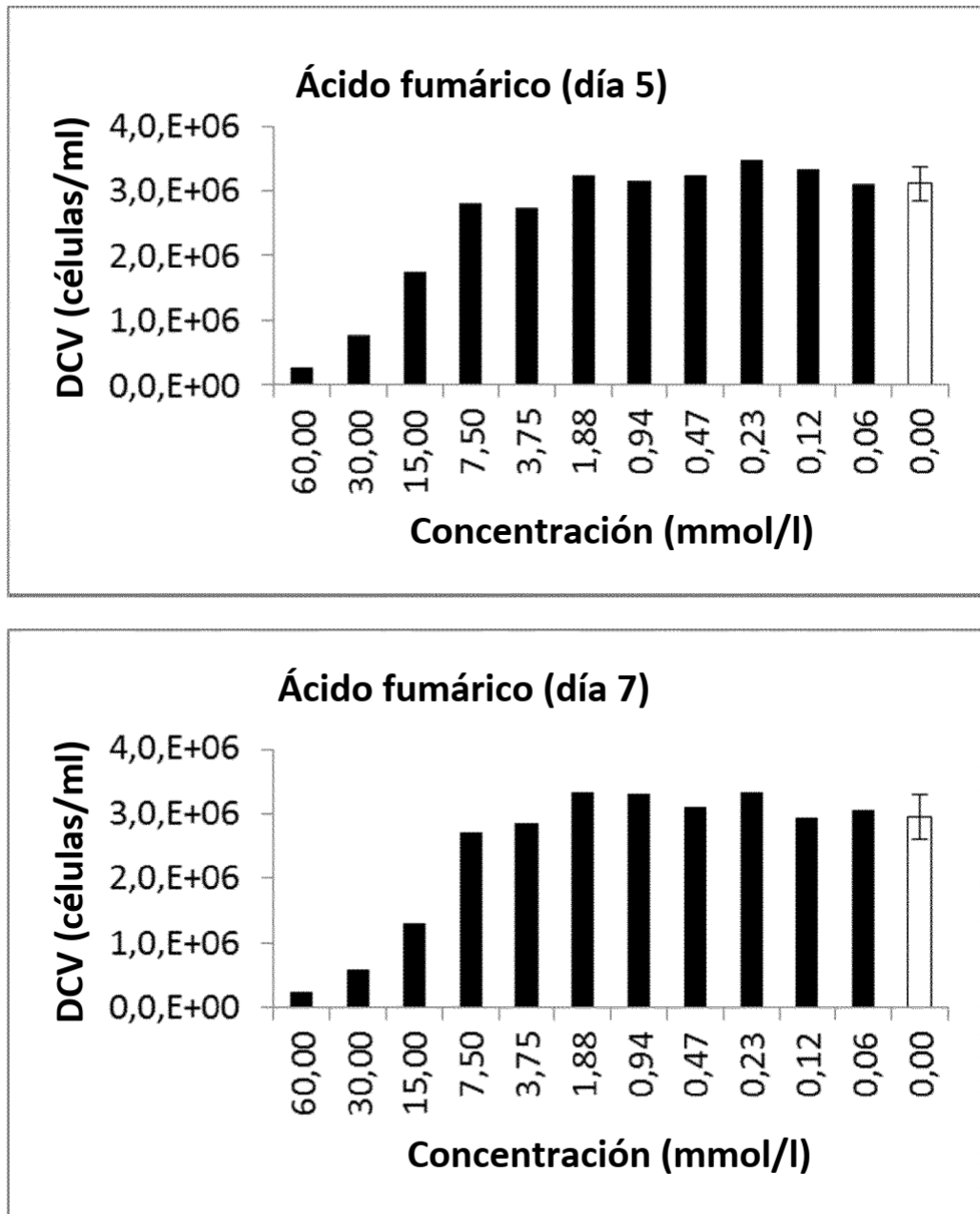


Figura 6B

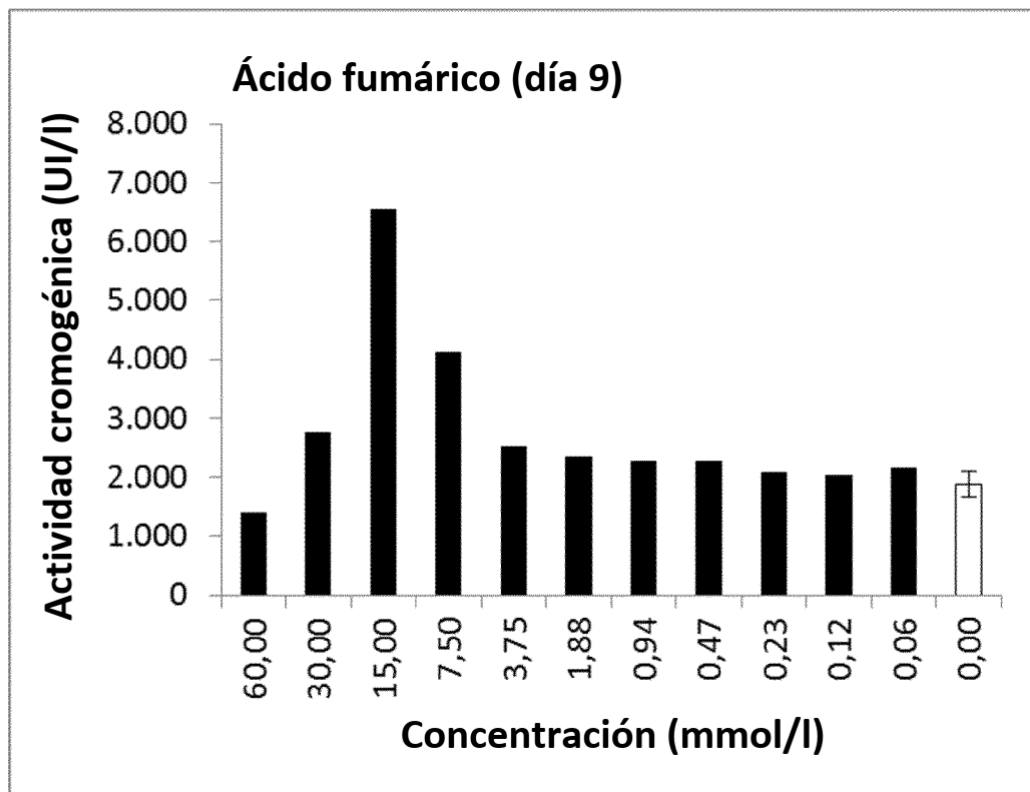
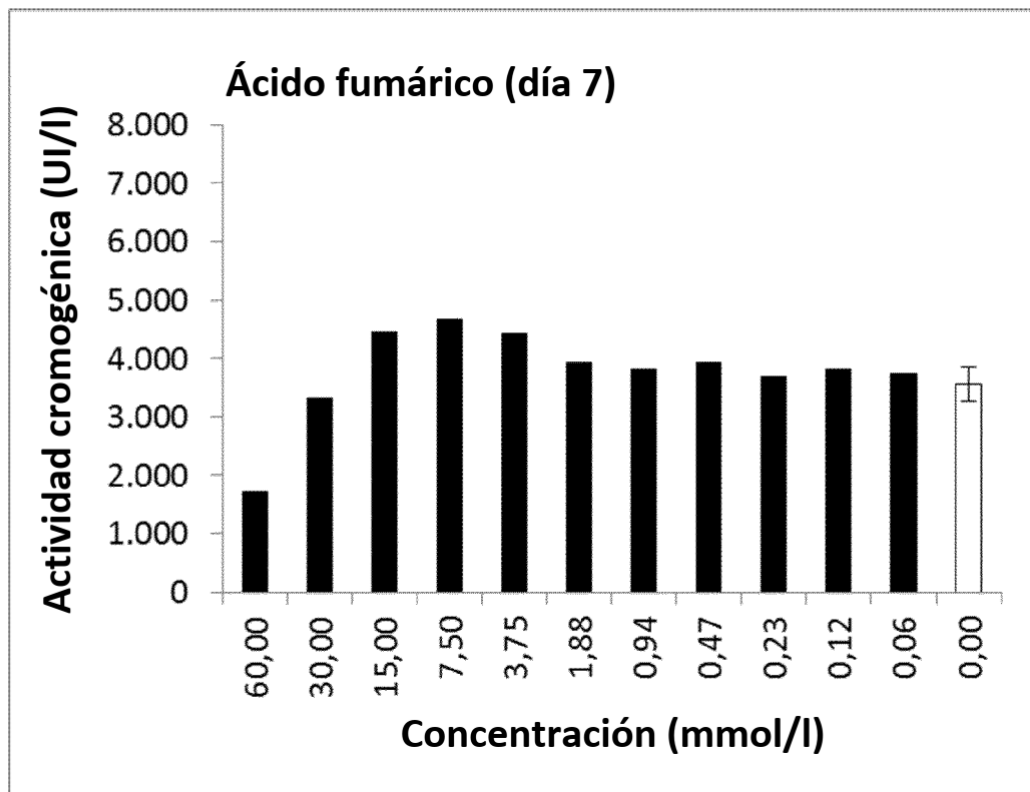




Figura 6C

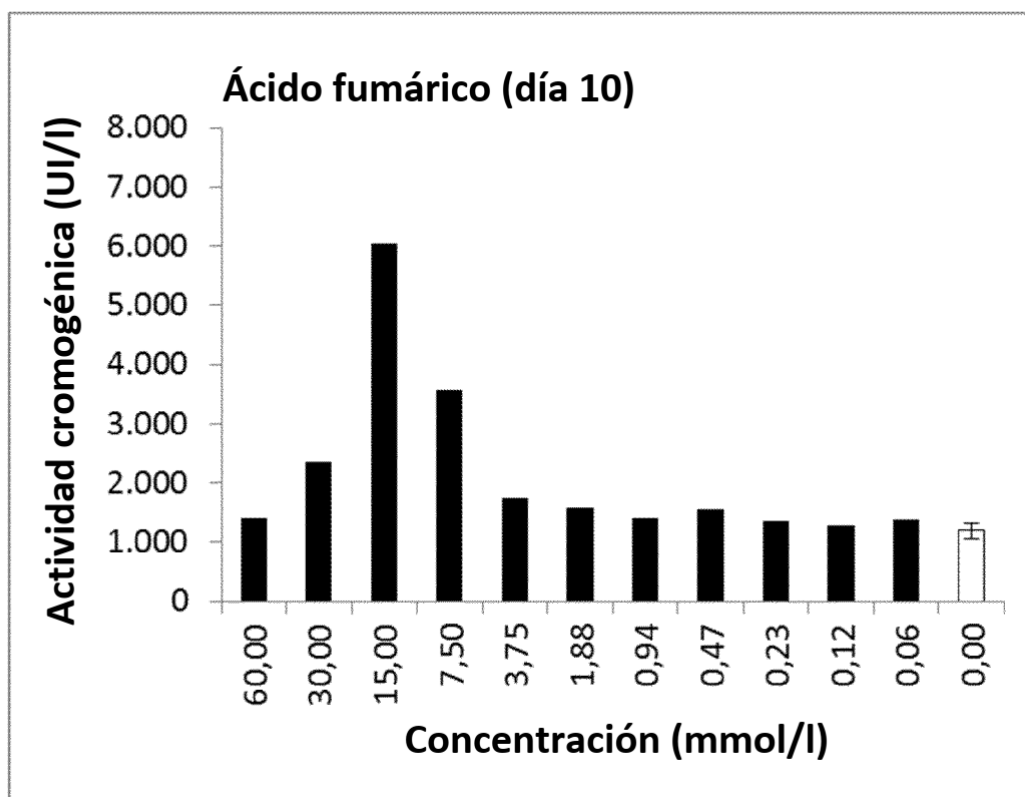


Figura 7A

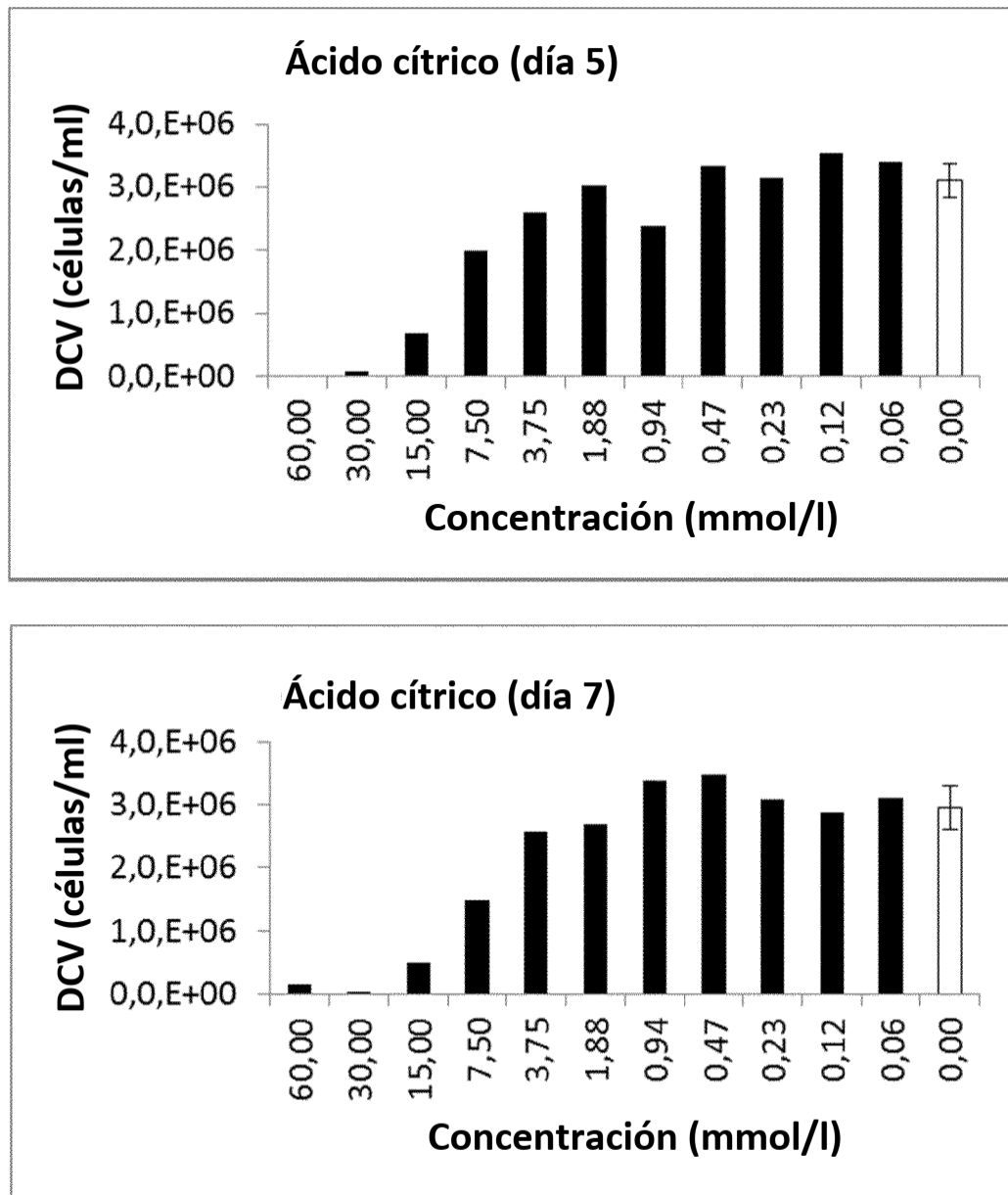


Figura 7B

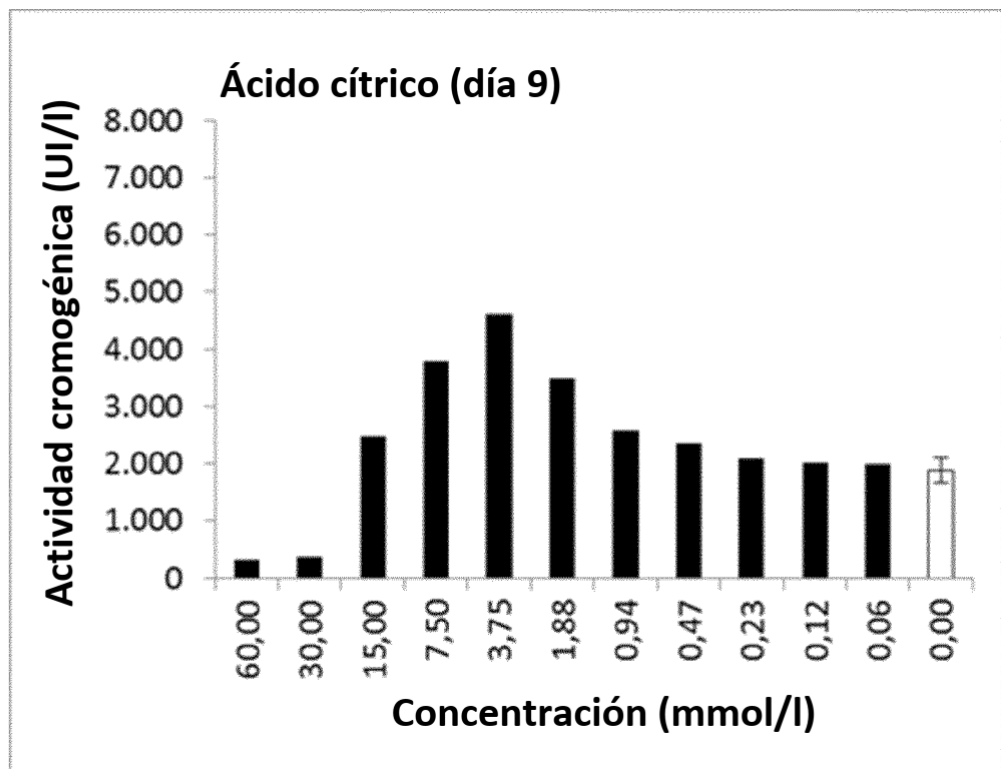
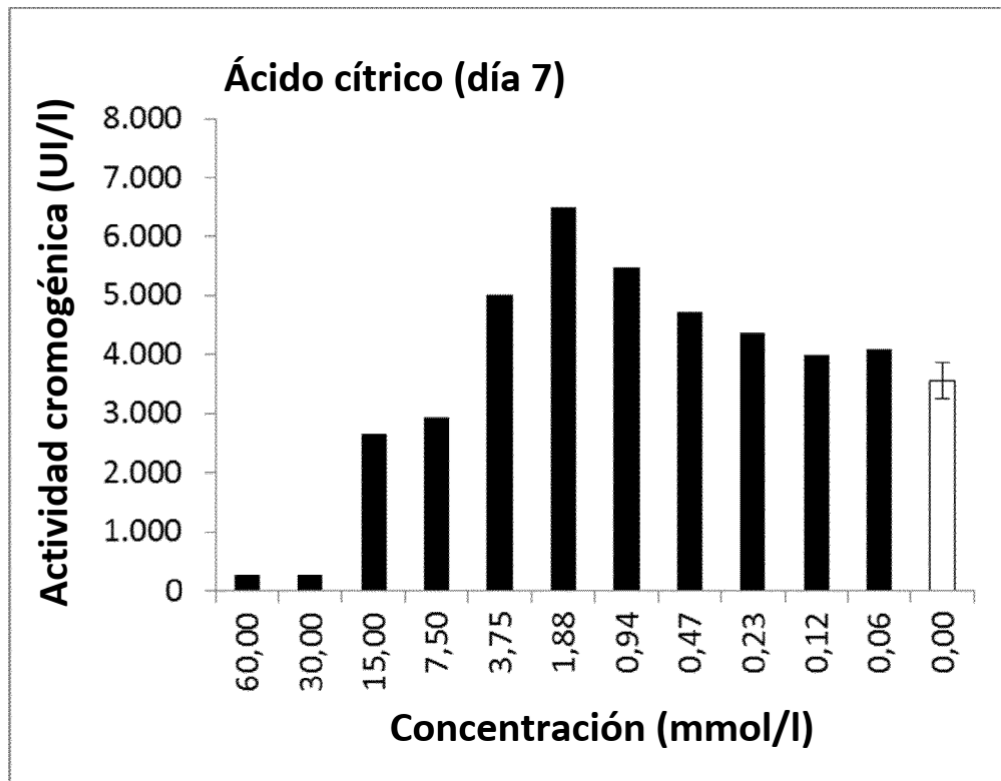


Figura 7C

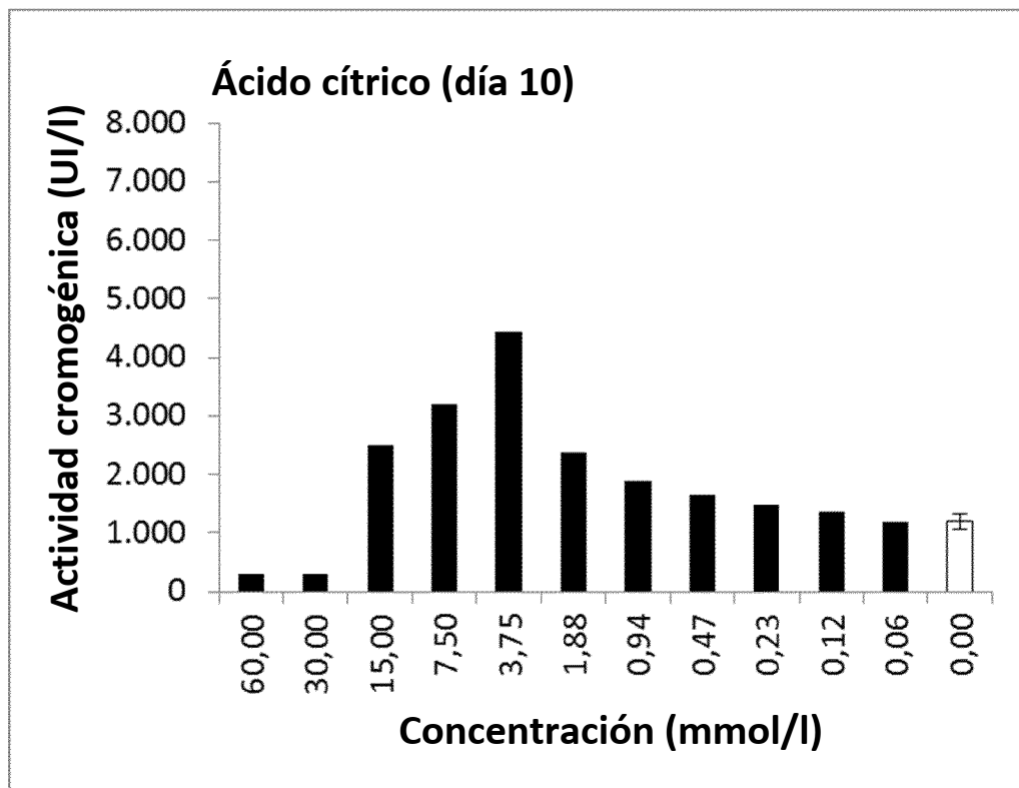


Figura 8A

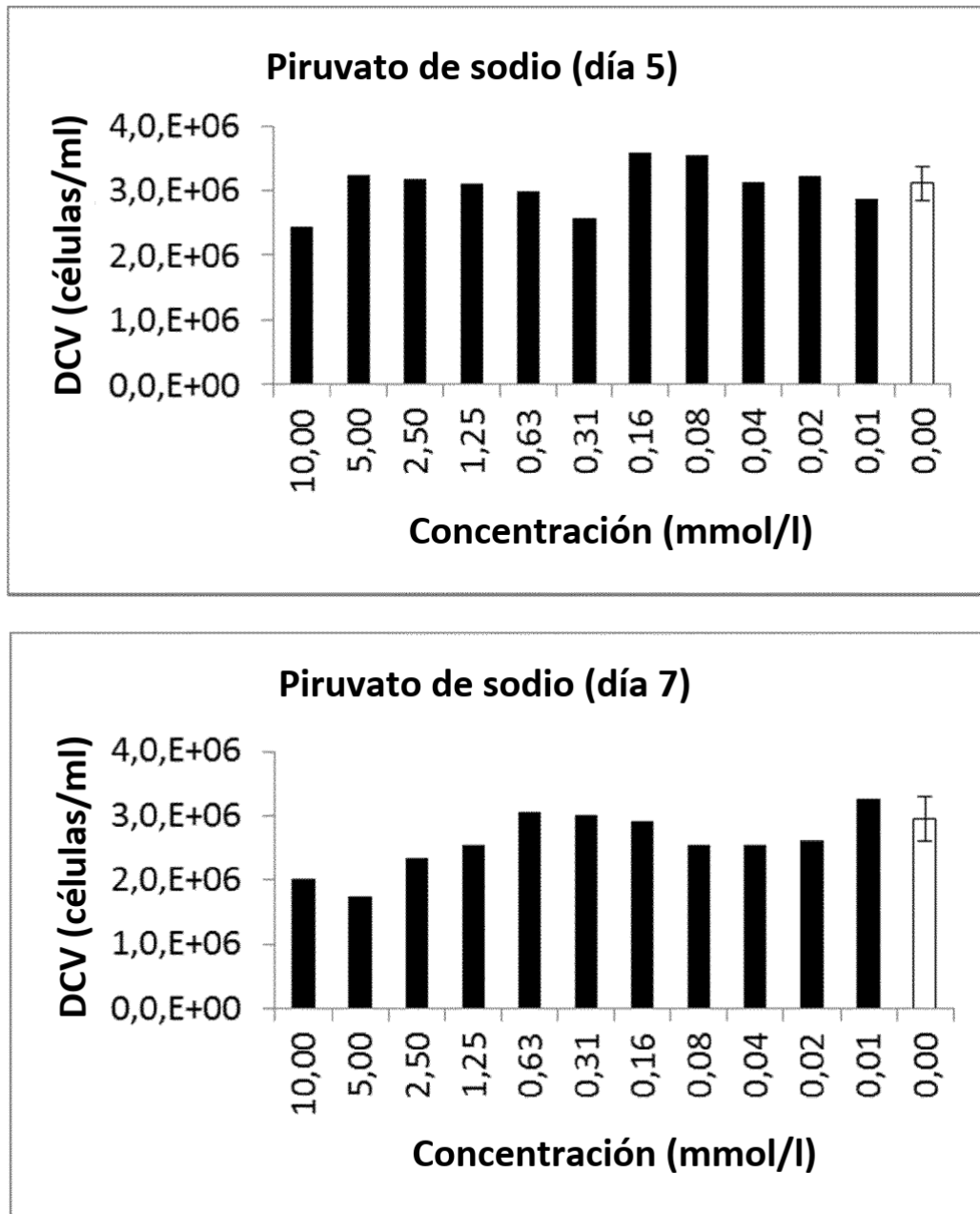


Figura 8B

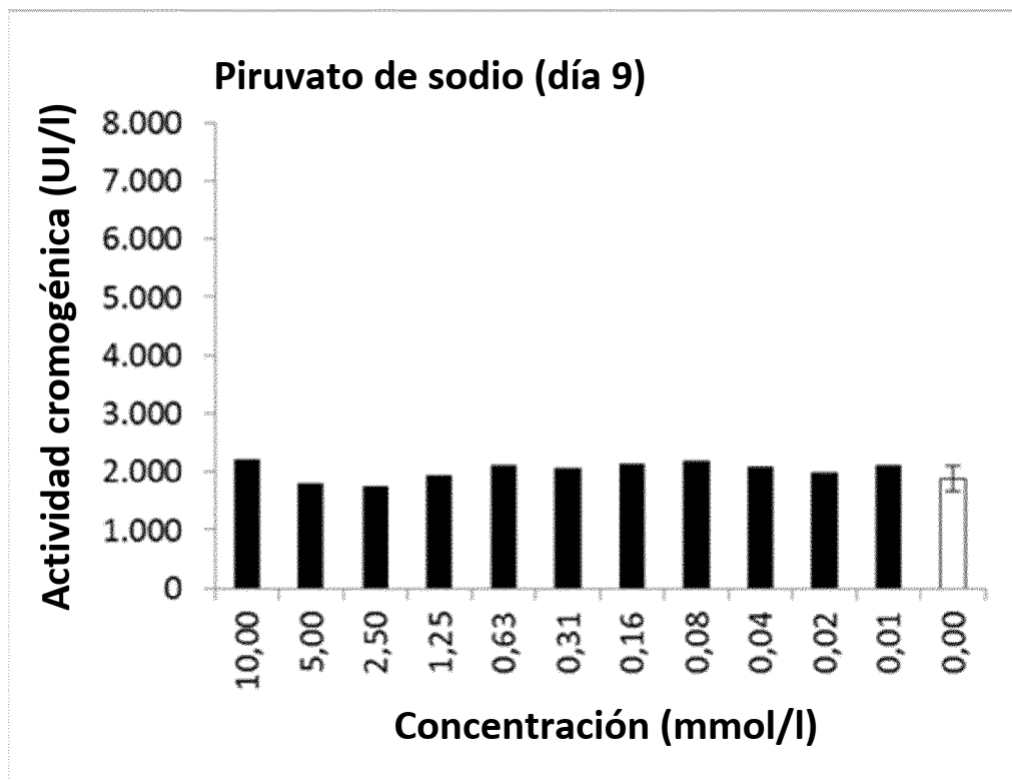
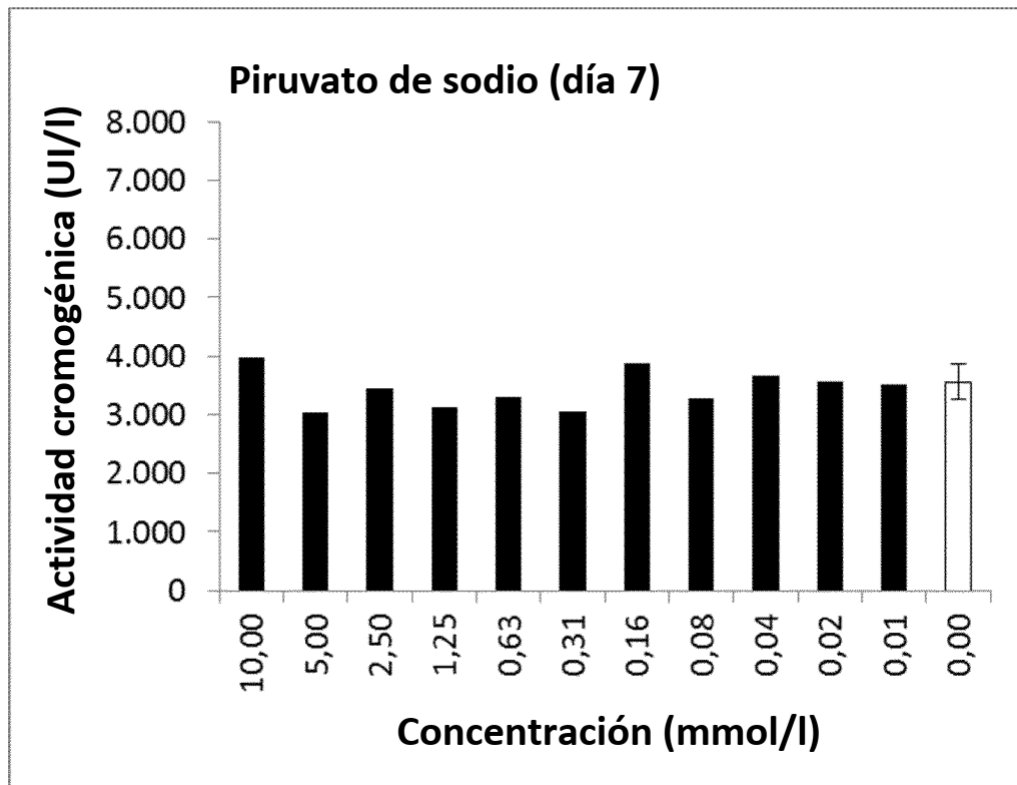


Figura 8C

