

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201790360** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2017.06.30

(51) Int. Cl. *C12N 9/64* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.08.12

(54) **ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОСТЬЮ ПРОЦЕССИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
ФАКТОРА X В ФУРИН-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ
МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

(31) **62/036,438**

(32) **2014.08.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2015/044883**

(87) **WO 2016/025615 2016.02.18**

(71) Заявитель:

**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Бём Эрнст, Хорлинг Франциска, Кён
Ядранка, Доккаль Михель (AT)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения полностью процессированного зрелого фактора X в системе экспрессии, продуцирующей контролируемое количество фурина от 50 до 300 Ед./мл супернатанта культуры. Кроме того, настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, системам экспрессии и экспрессирующим векторам для экспрессии фурина и фактора X.

A1

201790360

201790360

A1

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОСТЬЮ ПРОЦЕССИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФАКТОРА
X В ФУРИН-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

Область изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к системам экспрессии, трансформированным клеткам и способам, относящимся к ним, для экспрессии полностью процессированного и активного рекомбинантного фактора X в присутствии фурина.

Уровень техники

[0002] Фактор свертывания X человека (FX), активированный FX (FXa) и их варианты используют в качестве терапевтических средств при нарушениях свертывания крови, включая, в качестве неограничивающих примеров, гемофилию и болезнь Виллебранда. FX, витамин K-зависимая сериновая протеаза, синтезируется в виде одноцепочечного белка-предшественника в эндоплазматическом ретикулуме с последующим внутриклеточным протеолитическим расщеплением фурином в аппарате Гольджи перед секрецией продуцирующей клеткой в кровоток или в среду для культивирования в случае рекомбинантной экспрессии. Три участка расщепления фурином в FX отвечают за правильный протеолитический процессинг FX. Зрелая форма FX является двухцепочечной молекулой, соединенной дисульфидной связью, состоящей из тяжелой и легкой цепи, образующейся после расщепления белка-предшественника. Дальнейшие модификации молекулы включают γ -карбоксилирование легкой цепи и N- и O-связанное гликозилирование активационного пептида, соединенного с тяжелой цепью.

[0003] Помимо FX, дополнительные витамин K-зависимые факторы свертывания, несущие консенсусный участок распознавания Arg-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 4), являются субстратами повсеместно экспрессирующейся эндопротеазы фурина, также известной как фермент, расщепляющий спаренные аминокислотные остатки (PASE). Необходимый протеолитический процессинг рекомбинантных белков каскада свертывания нарушен в системах экспрессии на основе культур клеток по причине ограничений внутриклеточного процессинга при высокопроизводительной

экспрессии. Аналогично фактору Виллебранда и фактору свертывания IX (FIX), проявляющим недостаточный протеолитический процессинг при высоких степенях экспрессии в рекомбинантных клетках млекопитающих, секреция FX в низкопродуцирующих клонах клеток CHO отличается полностью процессированным FX, в то время как высокопродуцирующие клоны содержат непроцессированный одноцепочечный FX и множество непроцессированных форм легкой цепи FX в дополнение к правильно процессированным тяжелым и легким цепям FX. Типы и степени непроцессированной легкой цепи FX варьируются среди отдельных клонов клеток и в разных условиях культивирования клеток, таких как плотность клеток. Дополнительная коэкспрессия фурина *in vivo* или инкубация фурина *in vitro* после культивирования клеток необходима для поддержания эндогенного протеолитического аппарата фурина, облегчающего расщепление интактного белка.

[0004] Коэкспрессия фурина необходима для экспрессии полностью процессированного FX с высоким выходом. Однако, в настоящее время не известен пороговый уровень фурина, который обеспечивал бы высокую процентную долю интактного процессированного FX в системах культур клеток. Высокие уровни фурина являются токсичными, таким образом, для уровней экспрессии фурина FX-продуцирующими системами экспрессии млекопитающих необходимо найти баланс между уровнями, являющимися токсичными, но потенциально приводящими к 100% процессинга белка-предшественника FX, и слишком низкими уровнями, приводящими к здоровым культурам клеток, в которых продуцируется субоптимальный процессированный FX.

Сущность изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к системе экспрессии фурина и фактора X человека (FX) в одной линии клеток и, таким образом, получению критической концентрации фурина в супернатанте культуры для получения полностью процессированного и полностью активного FX с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры.

[0006] Таким образом, настоящее изобретение относится к трансформированной клетке, содержащей нуклеотидную

последовательность, кодирующую фурин человека, таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин в супернатант культуры, где функциональный фурин секретируется в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов. В одном из вариантов осуществления трансформированные клетки дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

[0007] Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и второму экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0008] Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека и белка, расщепляемого фурином и содержащего мотив Arg-

(Lys/Arg)-Arg, линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

[0009] Настоящее изобретение также относится к трансформированной клетке, содержащей первую нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую FX человека, таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретировать функциональный фурин и FX в супернатант культуры, где фурин секретировается в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов и, по меньшей мере, 85% FX является полностью процессированным. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая FX, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая FX, находятся в одном экспрессирующем векторе.

[0010] Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор

включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и второму экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии FX линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую FX, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0011] Настоящее изобретение дополнительно относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека и FX, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую FX, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0012] Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантного белка, включающему трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg; где линия клеток, трансфицированная с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретует функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 40 до

приблизительно 80 часов или от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов. В одном из вариантов осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно. В другом варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора. В еще одном варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

[0013] В одном из вариантов осуществления белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протеином C, протеином S или протеином Z. В другом варианте осуществления белок является фактором X.

[0014] Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантного белка, включающему трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии FX линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FX; где линия клеток, трансфицированная с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретирует функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов. В одном из вариантов осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно. В другом

варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора. В еще одном варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

[0015] В другом варианте осуществления клетки способны секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов, и где по меньшей мере 90% FX является полностью процессированным. В другом варианте осуществления клетки способны секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов, и где по меньшей мере 95% FX является полностью процессированным.

[0016] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному FX, продуцируемому трансформированной клеткой, представленной в настоящем описании.

[0017] Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантному FX, продуцируемому системой экспрессии, представленной в настоящем описании.

[0018] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному FX, получаемому способом, представленным в настоящем описании.

[0019] Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии рекомбинантного FX, адаптированной для секреции фурина в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0020] Настоящее изобретение также относится к способу

получения зрелого, полностью процессированного FX, включающему систему экспрессии, секретирующую фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

Краткое описание чертежей

[0021] На Фиг. 1А изображен экспрессирующий вектор RCL.012-74.pD3H-фурин, и на фиг. 1В изображена нуклеотидная последовательность вектора (SEQ ID NO: 1). Последовательность фурина человека подчеркнута и инициаторный кодон и стоп-кодон подчеркнуты двойной линией.

[0022] На фиг. 2 изображена нуклеотидная последовательность фурина человека (SEQ ID NO: 2). Инициаторный кодон и стоп-кодон подчеркнуты двойной линией.

[0023] На фиг. 3 изображена аминокислотная последовательность фурина человека (SEQ ID NO: 3).

[0024] На фиг. 4 изображена степень полностью процессированного фактора X (FX) в культурах. Денситометрический количественный анализ осуществляли с помощью вестерн-блоттинга FX в восстановительных условиях и окрашивали с помощью поликлонального антитела против FX. Клоны (ID клона 42-52) демонстрировали до 4 видов FX с различными пиксельными интенсивностями, включая непроецессированный одноцепочечный FX (рамка 1, 5, 9 и т.д.), тяжелую цепь FX (рамка 2, 6, 10 и т.д.), непроецессированную пропептид-содержащую легкую цепь FX (рамка 3, 7, 11 и т.д.) и процессированную легкую цепь FX (рамка 4, 8, 12 и т.д.). Пиксельную интенсивность рамок 45-48 определяли для вычитания фона.

[0025] На фиг. 5 изображена концентрация секретируемого фурина и процентная доля полностью процессированного FX/общего FX в культуре. Существует дозозависимая взаимосвязь между концентрацией секретируемого фурина в супернатанте культуры клеток (определяемой с помощью анализа активности фурина) и % полностью процессированного FX/общего FX (определяемой с помощью денситометрического количественного анализа соответствующих полос вестерн-блоттинга).

[0026] На фиг. 6 изображен анализ дозы фурина и полностью процессированного FX. С помощью данных (круги) с клеточно-специфичным средним (темные линии) и средним для выборки (светлые линии) с использованием модели E_{\max} прогнозировали процентную долю полностью процессированного FX/общего FX (%) как функцию концентрации фурина.

[0027] На фиг. 7A-D изображена проверка достоверности модели E_{\max} . На фиг. 7A изображен остаток ответа по сравнению с прогнозируемым ответом, где точки данных расположены симметрично вокруг нуля, что свидетельствует об отсутствии систематического тренда. На фиг. 7B изображен нормальный график Q-Q для остатков, свидетельствующий о том, что предположение нормально распределенных ошибок имеет силу, т.к. точки данных расположены вокруг линии идентичности. На фиг. 7C изображен остаток ответа по сравнению с линией клеток, где точки данных расположены симметрично вокруг нуля, что свидетельствует об отсутствии систематического тренда. На фиг. 7D изображены наблюдаемые и прогнозируемые значения, построенные относительно друг друга, свидетельствующие о хорошем соответствии данных, т.к. точки данных расположены симметрично вокруг линии идентичности.

[0028] На фиг. 8 изображена нулевая модель для тестирования гипотезы о том, что степень процессинга FX не зависит от концентрации фурина. Данные (круги) и аппроксимированная нулевая модель с интерсептами позволяет лишь предполагать, что процессированный FX не зависит от концентрации фурина (клеточно-специфичное среднее и среднее для выборки обозначены как темные и светлые линии, соответственно).

[0029] На фиг. 9 изображена кривая доза-ответ и вычисленные минимальные концентрации фурина для выхода 90% и 95% процессированного FX. Прогнозируемое среднее для выборки полностью процессированного FX/общего FX (%) как функция концентрации фурина (черная линия) вместе с концентрациями фурина, приводящими к получению 90% и 95% полностью процессированного FX/общего FX, получали посредством числовой оптимизации аппроксимированной модели.

Подробное описание изобретения

[0030] Настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, эукариотическим системам экспрессии, способам получения рекомбинантных белков и рекомбинантным белкам, получаемым способами, все из которых предназначены для экспрессии фурина и фактора X (FX) в одной линии клеток и, таким образом, получения критической концентрации фурина в супернатанте культуры для получения полностью процессированного и зрелого FX с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры.

[0031] Общей для трансформированных клеток, эукариотических систем экспрессии и способов получения рекомбинантных белков является способность клетки-хозяина продуцировать устойчивые уровни рекомбинантного фурина. Фурин необходим для расщепления конкретных белков млекопитающего, включая FX, из формы белка-предшественника в зрелую, полностью процессированную форму. Низкие концентрации фурина в супернатанте культуры системы экспрессии приводят к накоплению пропептид-содержащих и других непроцессированных или частично процессированных форм белка. Слишком высокие концентрации фурина приводят к нарушению роста клеток-хозяев и, в конечном итоге, гибели клеток.

[0032] Как применяют в настоящем описании, термин "фурин" включает полноразмерный фурин, а также любой фрагмент фурина, способный расщеплять консенсусный участок распознавания Arg-X-Lys/Arg-Arg. В этой области известны активные укороченные формы фурина, и они пригодны для использования в настоящем изобретении. Неограничивающие примеры подходящих фрагментов фурина можно найти в U.S. 6210926 и Preininger et al. (Cytotechnology 30:1-15, 1999), включенных в настоящее описание в качестве ссылок в части описания, касающейся укороченных форм рекомбинантного фурина.

[0033] В объеме настоящего изобретения находятся варианты белков фурина и фактора X, представленные в настоящем описании. Например, можно осуществлять консервативные замены аминокислот, которые, хотя и изменяют первичную последовательность белка или пептида, как правило, не изменяют его функцию. Консервативные аминокислотные замены, как правило, включают замены в следующих группах: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая

кислота, глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин; серин, треонин; и лизин, аргинин; фенилаланин, тирозин.

[0034] В настоящее изобретение также включены слитые белки, или другие модификации, или FX с повышенным временем полужизни после введения индивидууму. Их примерами будут слитые белки с Fc-доменом иммуноглобулина, доменом альбумина, удлинённым (XTEN) рекомбинантным полипептидом (см. US 8673860, включённый в настоящее описание в качестве ссылки в части описания, касающейся полипептидов XTEN), поли-Glu- или поли-Asp-последовательностями, трансферрином или PAS (Pro Ala Ser)-содержащими полипептидами, присоединёнными к последовательности FX.

[0035] Модификации (как правило, не изменяющие первичную последовательность) включают химическую дериватизацию полипептидов *in vivo* или *in vitro*, например, ацетилирование или карбоксилирование. В настоящее изобретение также включены модификации гликозилирования, например, осуществляемые посредством модификации профилей гликозилирования полипептида в течение его синтеза и процессинга или на последующих этапах процессинга; например, посредством подвергания полипептида воздействию ферментов, влияющих на гликозилирование, например, ферментов гликозилирования или дегликозилирования млекопитающего. В настоящее изобретение также включены последовательности, содержащие фосфорилированные аминокислотные остатки, например, фосфотирозин, фосфосерин или фосфотреонин. Белки также можно модифицировать химически после очистки с использованием водорастворимых биосовместимых полимеров, например, полиэтиленгликоля, полисиаловой кислоты или гидроксиэтилкрахмала.

[0036] В настоящее изобретение также включены полипептиды, модифицированные общепринятыми способами молекулярной биологии для улучшения их устойчивости к протеолитической деградации или для оптимизации свойств растворимости. Аналоги таких полипептидов включают аналоги, содержащие остатки, иные, чем природные L-аминокислоты, например, D-аминокислоты или неприродные синтетические аминокислоты. Пептиды по изобретению

не ограничены продуктами любых конкретных примеров способов, приведенных в настоящем описании.

[0037] Настоящее изобретение, в целом, относится к системам, трансформированным клеткам, экспрессирующим векторам и способам получения по меньшей мере одного рекомбинантного белка млекопитающего, посттрансляционно процессируемого фурином (рекомбинантного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина). Белок млекопитающего является одним или несколькими из фактора Виллебранда, фактора II, фактора IX, фактора X, протеина C, протеина S или протеина Z. В другом варианте осуществления белок является FX.

[0038] Концентрация фурина в супернатанте культуры находится в оптимальном диапазоне для получения зрелых, полностью процессированных белков с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры после определенного периода культивирования. Таким образом, применимая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего составляет от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 400 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 350 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 250 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 200 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 175 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 150 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 125 Ед./мл или от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 100 Ед./мл. В одном из вариантов осуществления концентрация фурина в супернатанте культуры составляет не менее 50 Ед./мл.

[0039] В другом варианте осуществления применимая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 60 Ед./мл, от приблизительно 55 Ед./мл до приблизительно 65 Ед./мл, от приблизительно 60 Ед./мл до приблизительно 70 Ед./мл, от

приблизительно 65 Ед./мл до приблизительно 75 Ед./мл, от
 приблизительно 70 Ед./мл до приблизительно 80 Ед./мл, от
 приблизительно 75 Ед./мл до приблизительно 85 Ед./мл, от
 приблизительно 80 Ед./мл до приблизительно 90 Ед./мл, от
 приблизительно 85 Ед./мл до приблизительно 95 Ед./мл, от
 приблизительно 90 Ед./мл до приблизительно 95 Ед./мл, от
 приблизительно 95 Ед./мл до приблизительно 105 Ед./мл, от
 приблизительно 100 Ед./мл до приблизительно 110 Ед./мл, от
 приблизительно 115 Ед./мл до приблизительно 125 Ед./мл, от
 приблизительно 120 Ед./мл до приблизительно 130 Ед./мл, от
 приблизительно 125 Ед./мл до приблизительно 135 Ед./мл, от
 приблизительно 130 Ед./мл до приблизительно 140 Ед./мл, от
 приблизительно 135 Ед./мл до приблизительно 145 Ед./мл, от
 приблизительно 140 Ед./мл до приблизительно 150 Ед./мл, от
 приблизительно 145 Ед./мл до приблизительно 155 Ед./мл, от
 приблизительно 150 Ед./мл до приблизительно 160 Ед./мл, от
 приблизительно 155 Ед./мл до приблизительно 165 Ед./мл, от
 приблизительно 160 Ед./мл до приблизительно 170 Ед./мл, от
 приблизительно 165 Ед./мл до приблизительно 175 Ед./мл, от
 приблизительно 170 Ед./мл до приблизительно 180 Ед./мл, от
 приблизительно 175 Ед./мл до приблизительно 185 Ед./мл, от
 приблизительно 180 Ед./мл до приблизительно 190 Ед./мл, от
 приблизительно 185 Ед./мл до приблизительно 195 Ед./мл или от
 приблизительно 190 Ед./мл до приблизительно 200 Ед./мл. В другом
 варианте осуществления применяемая концентрация фурина в
 супернатанте культуры для получения зрелого, полностью
 процессированного белка млекопитающего после определенного
 периода культивирования составляет от приблизительно 50 Ед./мл
 до приблизительно 60 Ед./мл, или приблизительно 57 Ед./мл. В
 другом варианте осуществления применяемая концентрация фурина в
 супернатанте культуры для получения зрелого, полностью
 процессированного белка млекопитающего составляет от
 приблизительно 90 Ед./мл до приблизительно 100 Ед./мл, или
 приблизительно 96 Ед./мл.

[0040] В других вариантах осуществления применяемая
 концентрация фурина в супернатанте культуры для получения

зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет менее приблизительно 400 Ед./мл, менее приблизительно 375 Ед./мл, менее приблизительно 350 Ед./мл, менее приблизительно 325 Ед./мл, менее приблизительно 300 Ед./мл, менее приблизительно 275 Ед./мл, менее приблизительно 250 Ед./мл, менее приблизительно 225 Ед./мл, менее приблизительно 200 Ед./мл, менее приблизительно 175 Ед./мл, менее приблизительно 150 Ед./мл, менее приблизительно 125 Ед./мл или менее приблизительно 100 Ед./мл.

[0041] В других вариантах осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет более приблизительно 50 Ед./мл, более приблизительно 60 Ед./мл, более приблизительно 70 Ед./мл, более приблизительно 80 Ед./мл, более приблизительно 90 Ед./мл, более приблизительно 100 Ед./мл, более приблизительно 110 Ед./мл, более приблизительно 120 Ед./мл, более приблизительно 130 Ед./мл, более приблизительно 140 Ед./мл, более приблизительно 150 Ед./мл, более приблизительно 160 Ед./мл, более приблизительно 170 Ед./мл, более приблизительно 180 Ед./мл, более приблизительно 190 Ед./мл или более приблизительно 200 Ед./мл.

[0042] В целях по настоящему изобретению уровней фурина в супернатантах культур, представленных в настоящем описании, достигают в пределах периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 96 часов после начала культивирования (после культивирования в течение от приблизительно 12 часов до приблизительно 96 часов), и они отражают уровни фурина, накапливающегося в супернатанте культуры в течение этого периода. В других вариантах осуществления желаемых уровней фурина в супернатантах культур достигают в пределах от приблизительно 18 часов до приблизительно 90 часов, от приблизительно 24 часов до приблизительно 84 часов, от приблизительно 30 часов до приблизительно 78 часов, от приблизительно 36 до приблизительно 72 часов, от приблизительно

40 часов до приблизительно 80 часов, от приблизительно 42 часов до приблизительно 68 часов или от приблизительно 48 часов до приблизительно 72 часов после начала культивирования или после культивирования в течение указанного периода времени.

[0043] Альтернативно, уровни фурина в супернатантах культур, представленных в настоящем описании, выражают как концентрацию фурина, секретлируемого количеством клеток на объем супернатанта культуры в сутки. В неограничивающем примере концентрацию фурина выражают как Ед./ 10^6 клеток/день. В другом варианте осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего составляет от приблизительно 20 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 25 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 30 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 35 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 40 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 45 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 50 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 55 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 60 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 75 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 20 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 70 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 20 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 65 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 20 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 60 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 20 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 55 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 25 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 55 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 25 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 50 Ед./ 10^6 клеток/день, от приблизительно 25 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 45 Ед./ 10^6 клеток/день или от приблизительно 25 Ед./ 10^6 клеток/день до приблизительно 40 Ед./ 10^6 клеток/день.

[0044] Концентрация фурина в супернатанте культуры является

достаточной для процессинга по меньшей мере приблизительно 75% белка-предшественника млекопитающего в зрелый, функциональный белок. Белок является любым белком, транслируемым в виде белка-предшественника и процессируемым в зрелую форму, по меньшей мере, частично, под действием фурина. В одном из вариантов осуществления белок является FX. В других вариантах осуществления концентрация фурина является достаточной для процессинга по меньшей мере приблизительно 80% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 82% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 84% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 86% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 88% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 90% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 92% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 93% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 94% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 95% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 96% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 97% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 98% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 99% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX или для процессинга 100% белка-предшественника FX

млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX.

[0045] Как применяют в настоящем описании, термин "белок-предшественник" относится к белку-предшественнику, являющемуся неактивным и превращающемуся в активную форму посредством расщепления и, необязательно, других посттрансляционных модификаций в клетке после синтеза.

[0046] Таким образом, настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, адаптированным для секреции фурина и белка млекопитающего, такого как FX. Трансформированные клетки могут являться любой эукариотической клеткой, подходящей для секреции белков млекопитающего, независимо от того, продуцируют ли клетки эндогенный фурин. Подходящие линии клеток для получения трансформированных клеток включают, в качестве неограничивающих примеров, клетки яичника китайского хомяка (CHO), эмбриональные клетки почки человека, клетки почки примата (например, клетки COS, HEK293), фибробласты (например, фибробласты мышцы) и миеломные клетки мышцы (например, NS0-GS). Подходящие линии клеток способны к экспрессии белков млекопитающего на высоком уровне и способны к посттрансляционным модификациям, например, гликозилированию, образованию дисульфидных связей, фосфорилированию и γ -карбоксилрованию. Способы селекции и культивирования клеток-хозяев и индукции клеток-хозяев для экспрессии полипептида, как правило, известны специалисту в этой области.

[0047] Настоящее изобретение также относится к системам экспрессии, содержащим клетки, подходящие для получения белков млекопитающего, и по меньшей мере одному экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии по меньшей мере одного белка млекопитающего. Как правило, доступны эукариотические экспрессирующие векторы для экспрессии в клетках млекопитающих. Чтобы сделать возможной экспрессию фурина и белка млекопитающего, такого как FX, способами, представленными в настоящем описании, нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, встраивают в эукариотическую клетку способами трансфекции, трансформации или инфицирования с использованием

экспрессирующего вектора, посредством чего экспрессируются полипептиды. Экспрессия фурина и/или белков млекопитающего может являться транзиторной или стабильной. Нуклеотидные последовательности фурина и белка млекопитающего присутствуют в виде плазмиды или в виде части вирусного или невирусного экспрессирующего вектора. Особенно подходящие вирусные векторы включают, в качестве неограничивающих примеров, бакуловирусы, вирусы осповакцины, аденовирусы, цитомегаловирусы, аденоассоциированные вирусы, репликационно-компетентные лентивирусы (RCL) и вирусы герпеса. Неограничивающие примеры вирусных эукариотических экспрессирующих векторов включают векторы Rc/CMV, Rc/RSV, RCL и SV40. Неограничивающие примеры невирусных эукариотических экспрессирующих векторов включают виросомы, липосомы, катионные липиды, плазмиды и полилизин-конъюгированную ДНК. Неограничивающие примеры плазмидных экспрессирующих векторов включают pSLX, pcDNA и другие векторы, известные специалистам в этой области.

[0048] В другом варианте осуществления в настоящем описании представлен экспрессирующий вектор, содержащий кодирующую фурин нуклеотидную последовательность, кодирующую белок млекопитающего нуклеотидную последовательность, такую как кодирующая FX нуклеотидная последовательность, или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления последовательности фурина и белка экспрессируются из одного экспрессирующего вектора. В другом варианте осуществления последовательность фурина и последовательности белка экспрессируются из разных экспрессирующих векторов. В одном из вариантов осуществления, если нуклеотидные последовательности фурина и белка экспрессируются из одного экспрессирующего вектора, их, необязательно, разделяют внутренним участком связывания рибосомы (IRES). Гены могут экспрессироваться с одного или нескольких промоторов. Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие каждый белок, могут быть ориентированы в противоположных направлениях на плазмиде или в одном направлении. Экспрессирующие векторы дополнительно содержат произвольные элементы и другие регуляторные последовательности

для эффективной продукции белков млекопитающего, как понятно специалистам в этой области.

[0049] Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, делающим возможной экспрессию фурина и других белков млекопитающего с использованием рекомбиназа-опосредованной замены кассет.

[0050] Если фурин и белок млекопитающего экспрессируются из разных экспрессирующих векторов, то экспрессирующие векторы будут иметь разные селективные маркеры таким образом, что клетки, трансформированные с использованием вектора, можно подвергать селекции. Такие подвергнутые селекции клетки затем можно выделять и выращивать в моноклональных культурах.

[0051] Промоторы, делающие возможной конститутивную, регулируемую, тканеспецифическую, специфическую в отношении типа клеток, специфическую в отношении клеточного цикла или метаболически-специфическую экспрессию в эукариотических клетках, подходят, например, для экспрессии в клетках млекопитающих. Регулируемыми элементами являются промоторы, последовательности активаторов, энхансеры, сайленсеры и/или репрессорные последовательности. Примерами регулируемых элементов, делающих возможной конститутивную экспрессию в эукариотах, являются промоторы, распознаваемые РНК-полимеразой III, или вирусные промоторы, энхансер цитомегаловируса (CMV), промотор CMV, промотор SV40 или промоторы длинных концевых повторов (LTR), например, полученные из MMTV (вируса опухоли молочной железы мыши), и другие вирусные последовательности промоторов и активаторов, полученные, например, из вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы человека (HPV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), промоторы белков теплового шока или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Примерами регулируемых элементов, делающих возможной индуцируемую экспрессию в эукариотах, является тетрациклиновый оператор в комбинации с соответствующим репрессором. Экспрессия нуклеотидных последовательностей фурина и белка млекопитающего также может происходить под контролем тканеспецифических, или белок-специфических, промоторов.

Неограничивающими примерами белок-специфических промоторов являются промоторы гена FX или промоторы гена фурина.

[0052] В определенных вариантах осуществления клетки трансформируют с использованием другого белка, помимо фурина и белка млекопитающего. В одном из вариантов осуществления дополнительный белок является витамин К-эпоксидредуктазой (VKOR). В определенных вариантах осуществления дополнительный белок экспрессируется с того же экспрессирующего вектора, что и один или оба из фурина и белка млекопитающего, или дополнительный белок экспрессируется с другого экспрессирующего вектора.

[0053] Настоящее изобретение также относится к системам экспрессии, содержащим клетки-хозяева и один или несколько экспрессирующих векторов, адаптированных для экспрессии фурина и по меньшей мере одного дополнительного белка млекопитающего, например, FX.

[0054] Настоящее изобретение также относится к способам получения полностью процессированных рекомбинантных белков млекопитающего, для которых необходимо наличие фурина, таких как FX. В одном из вариантов осуществления стабильную линию клеток, продуцирующую рекомбинантный фурин, получают, а затем трансфицируют с использованием экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность для по меньшей мере одного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина. Стабильные линии клеток, продуцирующие рекомбинантный фурин, можно получать и хранить для трансфекции с использованием экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность для по меньшей мере одного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина, при необходимости. Альтернативно, с помощью экспрессирующих векторов для фурина и для белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина, такого как FX, можно трансфицировать клетки-хозяева в пределах приблизительно 30 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно 2 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов или приблизительно 24 часов друг от друга. В другом варианте осуществления с помощью двух или более

экспрессирующих векторов трансфицируют клетки-хозяева, по существу, одновременно. В целях по настоящему изобретению термин "по существу, одновременно" относится к любому периоду времени, меньшему или равному 1 часу.

[0055] Трансформированные клетки подвергают селекции в соответствии с селективными маркерами, присутствующими в экспрессирующих векторах, для получения стабильных совокупностей трансформированных клеток, а затем совокупности, необязательно, клонируют для получения стабильных клонов. Стабильные клоны продуцируют от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 400 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 350 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 250 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 200 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 175 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 150 Ед./мл, от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 125 Ед./мл или от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 100 Ед./мл фурина в супернатанте культуры через от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов, от приблизительно 36 до приблизительно 72 часов, от приблизительно 40 часов до приблизительно 78 часов, от приблизительно 42 часов до приблизительно 68 часов или от приблизительно 48 часов до приблизительно 72 часов после начала культивирования или после культивирования в течение указанного периода времени. Кроме того, с помощью стабильных клонов получают более 80% полностью процессированного и активного рекомбинантного белка млекопитающего, такого как FX, от всего рекомбинантного белка, такого как FX, продуцируемого трансформированными клетками.

[0056] Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии рекомбинантного фурина и рекомбинантного FX, секретирующей фурин в супернатант культуры в накопленной концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0057] Настоящее изобретение также относится к способу получения зрелого, полностью процессированного FX, включающему применение системы экспрессии, секретирующей фурин в супернатант культуры в накопленной концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

[0058] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным белкам млекопитающего, получаемым способами по настоящему изобретению, и любому полностью процессированному рекомбинантному FX млекопитающего.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение полностью процессированного и полностью активного рекомбинантного фактора X посредством определенных уровней фурина

[0059] Для экспрессии FX использовали экспрессирующую плазмиду млекопитающего pSLX, содержащую кодон-оптимизированный FX человека или и кодон-оптимизированный FX человека, и кодон-оптимизированную витамин К-эпоксидредуктазу человека (FX/VKOR), разделенные внутренним участком связывания рибосомы (IRES). Конструкции для систем экспрессии на основе клеток яичника китайского хомяка (CHO)-S и CHO-DG44 включали средства для селекции генетицином и селекцию дигидрофолатредуктазой (dhfr), соответственно. Для экспрессии фурина использовали экспрессирующую плазмиду млекопитающего pcDNA3.1, содержащую полноразмерный фурин человека в комбинации с гигромицином в качестве селективного маркера (фиг. 1A).

[0060] Сначала полученные из CHO линии клеток (CHO-S и CHO DG44) трансфицировали с использованием конструкций FX или FX/VKOR для получения стабильных совокупностей, а затем совокупности подвергали субклонированию для получения стабильных клонов. Во втором раунде трансфекции и субклонирования выбранное количество FX- или FX/VKOR-экспрессирующих клонов сверхтрансфицировали с использованием фурина, получая стабильные совокупности и стабильные клоны, экспрессирующие FX/фурин или FX/VKOR/фурин.

[0061] Стабильные продуцирующие рекомбинантный FX линии

клеток CHO-S и CHO-DG44 выращивали в средах без компонентов животного происхождения во встряхиваемых колбах в течение от приблизительно 42 до приблизительно 72 часов и с исходными количествами клеток $0,3 \times 10^6$ или $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки CHO-S поддерживали в средах PowerCHO[®]-CD (Lonza BioWhittaker), дополненных 4 мМ глутамином, 500 мкг/мл генетицина, 500 мкг/мл гигромицина и 5 мкг/мл витамина K1. Клетки CHO-DG44 поддерживали в средах OptiCHO[™]-CD (Life Technologies), дополненных 6 мМ глутамином, 500 нМ метотрексатом (MTX) и 5 мкг/мл витамина K1.

[0062] Собранный супернатант культуры клеток анализировали посредством вестерн-блоттинга в восстановительных условиях для определения качества рекомбинантного FX человека с использованием поликлональных антител козы против FX человека или поликлональных антител овцы против FX человека (Affinity Biologicals). Денситометрический анализ вестерн-блоттингов делает возможным количественный анализ различных видов правильно процессированного FX, обозначенных как тяжелая цепь FX (HC) и легкая цепь FX (LC), и неправильно расщепленных видов FX, обозначенных как одноцепочечный FX (SC) и пропептид-содержащая легкая цепь FX (PP-LC).

[0063] В случае количественного анализа FX супернатант культуры клеток анализировали посредством ELISA для определения концентрации FX и посредством хромогенного анализа FXa с использованием яда гадюки Рассела (RVV) в качестве активатора для определения концентрации активного FX. Эти анализы калибровали с использованием полученного из плазмы FX (Nyphen Biomed). Специфическую активность приводят в %, разделяя концентрацию активного FX на концентрацию общего FX, умножая на 100. В случае количественного анализа фурина активный фурин определяли посредством флуорогенного анализа фурина, калибруемого относительно референсного материала фурина (New England Biolabs).

[0064] Для статистического анализа полностью процессированный FX/общий FX (%) моделировали как функцию концентрации фурина с использованием модели E_{\max} на

трансфицированных совокупностях CHO-DG44 (A), трансфицированных совокупностях CHO-S (B) и отдельных полученных из клеток клонов CHO-S (C). Эту модель используют для статистической оценки в исследованиях дозозависимого эффекта. В модели E_{\max} используют четыре параметра (E_0 , E_{\max} , ED_{50} и n) для модели FX как функции фурина следующим образом:

$$y = E_0 + (x^n \cdot E_{\max}) / (ED_{50}^n + x^n)$$

где y относится к полностью процессированному FX/общему FX, и x относится к концентрации фурина. Параметр E_0 относится к основному эффекту, соответствующему ответу, когда концентрация фурина равна нулю, E_{\max} - максимальному эффекту, приписываемому концентрации фурина, ED_{50} - концентрации фурина, приводящей к половине E_{\max} , и параметр n представляет собой угол наклона (фактор Хилла), определяющий крутизну кривой.

[0065] Для учета того, что полностью процессированный FX/общий FX приближается к 100%, если фурина приближается к бесконечно большой концентрации, модель E_{\max} модифицировали в функцию с тремя параметрами, оцениваемыми следующим образом:

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

[0066] Эту модель аппроксимировали для данных, учитывая вариабельность среди трех разных линий клеток с использованием нелинейной модели смешанных эффектов, позволяя параметрам E_0 и n варьироваться между разными линиями клеток, также моделируя эти два параметра в качестве случайных эффектов.

[0067] Для валидации используемой модели осуществляли диагностику модели. Сравнение аппроксимированной модели E_{\max} с нулевой моделью с использованием теста отношения правдоподобия осуществляли для определения статистических данных для модели E_{\max} , с помощью которой оценивают процентную долю полностью процессированного FX от общего FX в зависимости от концентрации фурина.

[0068] Результаты

[0069] Гетерологичную систему экспрессии на основе CHO для FX человека, содержащую трансфицированные совокупности CHO-DG44 (A), трансфицированные совокупности CHO-S (B) и отдельные полученные из клеток клоны CHO-S (C), использовали в качестве

основы для исследования эффекта экспрессии фурина в отношении процессинга FX человека после использования разных стратегий трансфекции. Трансфицированные совокупности, а также клоны, дополнительно экспрессирующие VKOR, не оказывали влияния на исследование.

[0070] После периода инкубации в течение от двух до трех дней культивирования супернатант культуры клеток подвергали серии анализов, включая анализ вестерн-блоттинга в восстановительных условиях, анализ активности фурина, анализ ELISA и RVV (таблица 1). В среднем, FX-продуцирующие совокупности и клоны СНО демонстрировали специфическую активность FX более 50%, частично достигая 100% (таблица 1). При анализах вестерн-блоттинга наблюдали, что рекомбинантный FX неправильно процессировался до различных степеней, о чем свидетельствуют две не полностью процессированные формы FX (т.е. пропептид-содержащая легкая цепь FX и одноцепочечный FX) помимо полностью процессированной, не содержащей пропептид легкой цепи FX и тяжелой цепи FX (фиг. 4). При денситометрическом анализе этих четырех видов FX процентная доля полностью процессированного FX, т.е. легкой цепи FX и тяжелой цепи FX относительно общего FX, находилась в диапазоне от 30% до почти 100% в супернатантах культур клеток (таблица 1, ФИГ. 4). Кроме того, не наблюдали предварительную активацию, которая была бы визуализирована в виде полосы, соответствующей тяжелой цепи, укороченной на размер отсутствующего активационного пептида. Также оценивали то, оказывает ли концентрация секретируемого фурина влияние на степень процессированного FX, строя график этих двух параметров (фиг. 5). Как показано на фиг. 5, при низких концентрациях секретируемого фурина (<20 Ед./мл) осуществим лишь частичный процессинг FX, в то время как более высокие уровни секретируемого фурина коррелируют с лучше процессированным FX.

Таблица 1: Совокупность данных о линиях клеток, коэкспрессирующих FХ и фурин: представлены эффективность продукции FХ, эффективность продукции фурина и титры, и процентные доли полностью процессированного FХ/общего FХ, измеряемые для каждой линии клеток.

ID клона/ совокупно сти	Экспрессируемые рекомбинантные белки	Линия клеток (совокупность или клон)	Концентрация фурина (Ед./мл)	Конечная плотность клеток [10⁶ клеток/мл]	Фурин- специфическая эффективность продукции [Ед./10⁶ клеток/день]	FХ- специфическая активность [%]	Полностью процессиров анный FХ/общий FХ (%)
1	FХ	Совокупность CHO-DG44	8,03	2,015	2,22	5,64	30,34
2	FХ/фурин	Совокупность CHO-DG44	8,05	1,155	3,45	7,58	45,69
3	FХ/VKOR	Совокупность CHO-DG44	7,88	1,436	2,86	6,44	31,05
4	FХ/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	7,88	1,029	3,68	11,16	40,08
5	FХ	Совокупность CHO-DG44	2,74	1,518	0,95	9,04	41,42
6	FХ/фурин	Совокупность CHO-DG44	11,59	0,952	5,71	14,12	71,78
7	FХ/VKOR	Совокупность CHO-DG44	2,38	1,152	1,02	15,14	36,92
8	FХ/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	2,82	0,795	1,58	29,37	57,17
9	FХ	Совокупность CHO-DG44	5,36	2,438	1,26	9,23	34,46

10	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	9,94	1,503	3,48	12,23	59,30
11	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	4,88	2,162	1,27	14,57	33,12
12	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	4,78	1,372	1,80	20,48	46,98
13	FX	Совокупность CHO-DG44	8,07	2,005	2,24	47,68	40,93
14	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	8,83	1,851	2,62	64,80	60,54
15	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	8,42	1,843	2,50	45,48	33,98
16	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	6,72	2,220	1,71	58,04	47,46
17	FX	Совокупность CHO-DG44	2,59	1,246	1,05	78,72	46,40
18	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	55,91	1,396	20,75	98,49	73,47
19	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	2,59	1,207	1,07	70,43	47,61
20	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	3,48	1,431	1,27	93,42	60,04
21	FX	Совокупность CHO-DG44	5,96	2,035	1,63	71,19	37,77
22	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	27,57	2,226	7,00	104,40	71,85
23	FX/VKOR	Совокупность	4,40	1,827	1,32	69,50	42,84

		CHO-DG44					
24	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	5,20	2,283	1,29	75,60	49,19
25	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,224	0,00	90,59	63,96
26	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	51,34	1,828	25,20	99,57	88,97
27	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,851	0,00	49,99	57,75
28	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	62,84	2,248	26,13	48,73	87,78
29	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	3,584	0,00	81,39	68,02
30	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	66,98	2,362	26,75	66,57	89,64
31	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,870	0,00	69,04	67,02
32	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	55,08	2,295	22,52	52,91	89,99
33	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,645	0,00	59,62	71,13
34	FX/фурин	Совокупность CHO-S	116,89	2,083	50,52	51,40	86,56
35	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,230	0,00	67,49	62,65
36	FX/фурин	Совокупность CHO-S	46,62	1,846	22,18	19,29	82,99

37	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,049	0,00	11,47	51,69
38	FX/фурин	Совокупность CHO-S	48,41	1,457	27,61	<25,33	77,46
39	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,265	0,00	95,04	45,87
40	FX/фурин	Совокупность CHO-S	60,72	1,566	32,80	27,69	84,27
41	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,018	0,00	35,63	49,28
42	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	113,45	3,704	26,99	90,30	95,91
43	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	63,41	3,133	17,45	92,26	96,23
44	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	92,86	2,893	27,37	98,55	98,12
45	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	173,37	3,430	44,11	79,46	98,42
46	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	23,54	2,816	7,10	86,31	91,69
47	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	105,42	2,918	30,84	78,63	95,14
48	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	33,77	3,542	8,35	80,02	92,21
49	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	135,62	2,777	41,39	94,46	95,18
50	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	82,03	2,193	30,46	48,80	93,75
51	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	8,06	2,280	2,90	67,11	52,38
52	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	81,02	2,889	23,91	85,37	95,61

[0071] Для понимания влияния фурина на процессинг FX и для получения статистического подтверждения данных, процентную долю полностью процессированного FX от общего FX (%) моделировали как функцию концентрации фурина с использованием модели E_{\max} на линиях клеток А, В и С (фиг. 6). Четыре графика диагностики модели, свидетельствующие о хорошем соответствии модели данным, представлены на фиг. 7А-Д. При сравнении аппроксимированной модели E_{\max} с нулевой моделью с использованием теста отношения правдоподобия получали значение $p < 0,0001$, получая статистические данные для более высокой процентной доли полностью процессированного FX от общего FX, зависящей от более высокой концентрации фурина (фиг. 8), еще раз подтверждая достоверность данных. С учетом статистического анализа, рассчитанные концентрации фурина для продукции продуцирующей линией клеток, определяемые в среде для культивирования клеток вместе с FX, приводящие к 90% или более и 95% или более полностью процессированного FX от общего FX, составляли по меньшей мере 57 Ед./мл и по меньшей мере 96 Ед./мл, соответственно (фиг. 9).

[0072] В совокупности, с помощью данных получали определенный минимальный уровень секретлируемого фурина (по меньшей мере 57 Ед./мл и по меньшей мере 96 Ед./мл) в супернатанте культуры клеток, необходимый для достаточного процессинга FX (90% или более и 95% или более).

[0073] В биотехнологических способах с экспрессией высоких уровней рекомбинантного белка гиперэкспрессию фурина можно использовать для получения полностью процессированных зимогенов. Используя настоящее изобретение, авторы настоящего изобретения впервые получали определенный минимум секретлируемого фурина, обеспечивающий высокий процессинг FX (≥ 57 Ед./мл для достижения по меньшей мере 90% полностью процессированного FX и ≥ 96 Ед./мл фурина для по меньшей мере 95% полностью процессированного FX). Эти данные особенно полезны для способов ферментации с экспрессией рекомбинантных FX, FXа и вариантов человека и видов животных, где уровень фурина можно использовать в качестве индикатора правильного процессинга белка-предшественника FX и в

качестве цели для линии клеток и разработки способа.

[0074] Если не указано иначе, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойств, таких как молекулярная масса, условия реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения следует понимать как модифицированные во всех случаях посредством термина "приблизительно." Как применяют в настоящем описании, термин "приблизительно" означает в пределах от 10 до 15%, предпочтительно - в пределах от 5 до 10%. Таким образом, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которых стремятся достигать посредством настоящего изобретения. Как минимум, и не в качестве ограничения применения доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует, по меньшей мере, истолковывать, учитывая количество приведенных значимых цифр и используя общепринятые способы округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, описывающие широкий объем изобретения, являются приближениями, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, указаны настолько точно, насколько это возможно. Однако, любое числовое значение, по существу, содержит конкретные ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения, обнаруживаемого в их соответствующих измерениях при тестировании.

[0075] Термины в единственном числе и схожие ссылки, используемые в отношении описания изобретения (особенно в отношении следующей формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающие и единственное, и множественное число, если в настоящем описании не указано иначе или это четко не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании предназначено исключительно для условного обозначения отдельного упоминания каждого отдельного значения, попадающего в диапазон. Если в настоящем описании не указано иначе, каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было конкретно упомянуто в настоящем описании. Все способы, представленные в настоящем описании, можно осуществлять

в любом подходящем порядке, если в настоящем описании не указано иначе или это не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или иллюстративного языка (например, "такой как"), представленное в настоящем описании, предназначено исключительно для лучшего объяснения изобретения, но не для ограничения объема изобретения, заявленного иначе. Никакие выражения в описании не следует истолковывать как указание на любой незаявленный элемент, важный для практического осуществления изобретения.

[0076] Группировки альтернативных элементов или вариантов осуществления представленного в настоящем описании изобретения не следует истолковывать в качестве ограничений. На каждого члена группы можно сослаться и заявлять его по отдельности или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, обнаруживаемыми в настоящем описании. Предполагают, что одного или нескольких членов группы можно включать или удалять из группы по причинам удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или исключение, описание считают содержащим группу как модифицированную, таким образом, выполняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

[0077] В настоящем описании представлены конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, включая лучший способ осуществления изобретения, известный авторам настоящего изобретения. Разумеется, варианты этих описываемых вариантов осуществления будут очевидны специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения подразумевают, что изобретение будут осуществлять на практике иным образом, чем конкретно представлено в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутые в прилагаемой формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описываемых выше элементов во всех возможных вариантах включена в изобретение, если в настоящем описании не

указано иначе или это не противоречит контексту.

[0078] Конкретные варианты осуществления, представленные в настоящем описании, могут быть дополнительно ограничены в формуле изобретения с использованием выражений "состоящий из" или "по существу, состоящий из". При использовании в формуле изобретения, при подаче или при дополнении, переходный термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в формуле изобретения. Переходный термин "по существу, состоящий из" ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или этапами и тем, что материально не влияет на основные и новые характеристики. Заявленные таким образом варианты осуществления изобретения по существу или конкретно описаны и разрешены в настоящем описании.

[0079] Кроме того, на всем протяжении настоящего описания сделано множество ссылок на патенты и печатные публикации. Каждая из процитированных выше ссылок и печатных публикаций в отдельности включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0080] В заключение, следует понимать, что варианты осуществления представленного в настоящем описании изобретения предназначены для иллюстрирования принципов настоящего изобретения. Другие модификации, которые можно использовать, входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, можно использовать альтернативные конфигурации настоящего изобретения в соответствии с руководством в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение не ограничено тем, что конкретно представлено и описано.

CGBCJR GJCKTLJDFNTKMYJCNTQ

<110> Baxalta GmbH
Baxalta Incorporated

<120> ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОСТЬЮ ПРОЦЕССИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФАКТОРА X В
ФУРИН-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО

<130> 3724526.00092WO

<150> US62/036,438

<151> 2014-08-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7981

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Экспрессирующий вектор RCL.012-74.pD3H-фурин

<400> 1

```
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata      300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc      360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt      540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg      780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca      840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc      900
gtttaaactt aagcttggtta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc      960
agatatccag cacagtggcg gccgcatgga gctgaggccc tggttgctat gggtggtagc     1020
agcaacagga accttgggcc tgctagcagc tgatgctcag ggccagaagg tcttcaccaa     1080
cacgtgggct gtgcgcatcc ctggaggccc agcgggtggcc aacagtgtgg cacggaagca     1140
```

tgggttctc	aacctgggcc	agatcttcg	ggactattac	cacttctggc	atcgaggagt	1200
gacgaagcgg	tccctgtcgc	ctcaccgccc	gcggcacagc	cggtgcaga	gggagcctca	1260
agtacagtgg	ctggaacagc	aggtggcaaa	gcgacggact	aaacgggacg	tgtaccagga	1320
gccacagac	ccaagtttc	ctcagcagtg	gtacctgtct	ggtgtcactc	agcgggacct	1380
gaatgtgaag	gcggcctggg	cgcagggcta	cacagggcac	ggcattgtgg	tctccattct	1440
ggacgatggc	atcgagaaga	accacccgga	cttggcaggc	aattatgate	ctggggccag	1500
ttttgatgtc	aatgaccagg	accctgaccc	ccagcctcgg	tacacacaga	tgaatgacaa	1560
caggcacggc	acacggtgtg	cgggggaagt	ggctgcgggtg	gccaacaacg	gtgtctgtgg	1620
tgtaggtgtg	gcctacaacg	cccgcattgg	aggggtgctc	atgctggatg	gcgaggtgac	1680
agatgcagtg	gaggcacgct	cgctgggcct	gaaccccaac	cacatccaca	tctacagtgc	1740
cagctggggc	cccaggatg	acggcaagac	agtggatggg	ccagcccgcc	tcgccgagga	1800
ggccttcttc	cgtgggggta	gccagggccg	aggggggctg	ggctccatct	ttgtctgggc	1860
ctcggggaac	gggggcccgg	aacatgacag	ctgcaactgc	gacggctaca	ccaacagtat	1920
ctacacgctg	tccatcagca	gcgccacgca	gtttggcaac	gtgccgtggt	acagcgaggc	1980
ctgctcgtcc	acactggcca	cgacctacag	cagtggcaac	cagaatgaga	agcagatcgt	2040
gacgactgac	ttgcggcaga	agtgcacgga	gtctcacacg	ggcacctcag	cctctgcccc	2100
cttagcagcc	ggcatcattg	ctctcacctc	ggaggccaat	aagaacctca	catggcggga	2160
catgcaacac	ctggtggtac	agacctcgaa	gccagcccac	ctcaatgcca	acgactgggc	2220
caccaatggt	gtgggcccga	aagtgagcca	ctcatatggc	tacgggcttt	tggacgcagg	2280
cgccatggtg	gccctggccc	agaattggac	cacagtggcc	ccccagcggg	agtgcacatc	2340
cgacatcctc	accgagccca	aagacatcgg	gaaacggctc	gaggtgcgga	agaccgtgac	2400
cgcgtgcctg	ggcgagccca	accacatcac	tcggctggag	cacgctcagg	cgcggtcac	2460
cctgtcctat	aatcgccgtg	gcgacctggc	catccacctg	gtcagcccca	tgggcacccg	2520
ctccaccctg	ctggcagcca	ggccacatga	ctactccgca	gatgggttta	atgactgggc	2580
cttcatgaca	actcattcct	gggatgagga	tcctctggc	gagtgggtcc	tagagattga	2640
aaacaccagc	gaagccaaca	actatgggac	gctgaccaag	ttcacctcgc	tactctatgg	2700
caccgcccct	gaggggctgc	ccgtacctcc	agaaagcagt	ggctgcaaga	ccctcacgctc	2760
cagtcaggcc	tgtgtggtgt	gcgaggaagg	cttctccctg	caccagaaga	gctgtgtcca	2820
gcactgcctc	ccaggcttcg	cccccaagt	cctcgatacg	cactatagca	ccgagaatga	2880
cgtggagacc	atccgggcca	gcgtctgcgc	cccctgccac	gcctcatgtg	ccacatgcca	2940
ggggcccggc	ctgacagact	gcctcagctg	ccccagccac	gcctccttgg	accctgtgga	3000
gcagacttgc	tcccggcaaa	gccagagcag	ccgagagtcc	ccgccacagc	agcagccacc	3060

tcggctgccc	ccggaggtgg	aggcggggca	acggctgcgg	gcagggctgc	tgccctcaca	3120
cctgectgag	gtggtggccg	gcctcagctg	cgccttcate	gtgctggtct	tcgtcaactgt	3180
cttcctggtc	ctgcagctgc	gctctggctt	tagttttcgg	ggggtgaagg	tgtacaccat	3240
ggaccgtggc	ctcatctcct	acaaggggct	gccccctgaa	gcctggcagg	aggagtgccc	3300
gtctgactca	gaagaggacg	agggccgggg	cgagaggacc	gcctttatca	aagaccagag	3360
cgccctctga	tctagagggc	ccgtttaaac	ccgctgatca	gcctcgactg	tgccctctag	3420
ttgccagcca	tctgttgttt	gccccctccc	cgtgccttcc	ttgaccctgg	aaggtgcccac	3480
tcccactgtc	ctttccta	aaaatgagga	aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	3540
ttctattctg	gggggtgggg	tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	3600
caggcatgct	ggggatgcgg	tgggctctat	ggcttctgag	gcggaaagaa	ccagctgggg	3660
ctctaggggg	tatccccacg	cgccctgtag	cggcgcatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	3720
tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgtcctt	tcgctttctt	3780
cccttccttt	ctcgccacgt	tcgccggctt	tccccgtcaa	gctctaaatc	ggggcatccc	3840
tttagggttc	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	3900
tggttcacgt	agtgggcca	cgccctgata	gacggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	3960
cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggt	4020
ctattctttt	gatttataag	ggattttggg	gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	4080
gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattaatt	ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtgga	4140
aagtccccag	gctccccagg	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	4200
aaccaggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	4260
caattagtca	gcaaccatag	tcccgccctt	aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	4320
cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	4380
ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	4440
cttttgcaaa	aagctcccgg	gagcttgat	atccattttc	ggatctgatc	agcacgtgat	4500
gaaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	4560
cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	4620
aggagggcgt	ggatatgtcc	tgccggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	4680
ttatgtttat	cggcactttg	catcggccgc	gctcccgatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	4740
ggaattcagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgccgt	gcacagggtg	tcacgttgca	4800
agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgtctgt	tctgcagccg	gtcgcggagg	ccatggatgc	4860
gatcgtgcg	gccgatctta	gccagacgag	cggttcggc	ccattcggac	cgcaaggaat	4920
cgggtcaatac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	4980

ctggcaaact	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgcaggctc	tcgatgagct	5040
gatgctttgg	gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atttcggctc	5100
caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	5160
gttcggggat	tccaatacgc	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	ggttggcttg	5220
tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgacg	gatcgccgcg	5280
gctccggggc	tatatgctcc	gcattggtct	tgaccaactc	tatcagagct	tggttgacgg	5340
caatttcgat	gatgcagctt	gggcgccagg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	5400
cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccg	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	5460
tgtagaagta	ctcgccgata	gtggaaaccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaagga	5520
atagcacgtg	ctacgagatt	tcgattccac	cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	5580
aatcgttttc	cgggacgccg	gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	5640
cttcgccac	cccaacttgt	ttattgcagc	ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	5700
cacaaatttc	acaataaag	catttttttc	actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	5760
catcaatgta	tcttatcatg	tctgtatacc	gtcgacctct	agctagagct	tggcgtaatc	5820
atggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	acaacatacg	5880
agccggaagc	ataaagtgta	aagcctgggg	tgccctaatga	gtgagctaac	tcacattaat	5940
tcggttgccg	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	6000
aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttcctcgct	6060
caactgactg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	6120
ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaaagg	6180
ccagcaaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	6240
ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtaggcgaa	accgcacagg	6300
actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aaagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	6360
cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	6420
atgctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggt	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	6480
gcacgaacc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	6540
caaccggta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	6600
agcgaggat	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	6660
tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	6720
tggtagctct	tgatccggca	aacaaccac	cgctggtagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	6780
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	6840
gtctgacgct	cagtggaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggatcatg	gattatcaaa	6900

aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	6960
atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	7020
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	7080
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc	7140
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc	7200
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	7260
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acagggcatcg tgggtgtcacg	7320
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg	7380
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag	7440
taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	7500
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga	7560
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc	7620
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	7680
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc	7740
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc	7800
cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca	7860
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	7920
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt	7980
c	7981

<210> 2
 <211> 2385
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 2	
atggagctga ggccctgggt gctatgggtg gtagcagcaa caggaacctt ggtcctgcta	60
gcagctgatg ctcagggcca gaaggtcttc accaacacgt gggctgtgcg catccctgga	120
ggcccagcgg tggccaacag tgtggcacgg aagcatgggt tcctcaacct gggccagatc	180
ttcggggact attaccactt ctggcatcga ggagtgacga agcggtcctt gtcgcctcac	240
cgcccgcggc acagccggct gcagagggag cctcaagtac agtggctgga acagcaggtg	300
gcaaagcgac ggactaaacg ggacgtgtac caggagccca cagaccccaa gtttcctcag	360
cagtggtagc tgtctggtgt cactcagcgg gacctgaatg tgaaggcggc ctgggcgcag	420
ggctacacag ggcacggcat tgtggtctcc attctggacg atggcatcga gaagaaccac	480
ccggacttgg caggcaatta tgatcctggg gccagttttg atgtcaatga ccaggacct	540
gacccccagc ctcggtacac acagatgaat gacaacaggc acggcacacg gtgtgcgggg	600

gaagtggctg	cggtggccaa	caacggtgtc	tgtggtgtag	gtgtggccta	caacgcccgc	660
attggagggg	tgcgcatgct	ggatggcgag	gtgacagatg	cagtggagggc	acgctcgctg	720
ggcctgaacc	ccaaccacat	ccacatctac	agtgccagct	ggggccccga	ggatgacggc	780
aagacagtgg	atgggcccagc	ccgcctcgcc	gaggaggcct	tcttccgtgg	ggtagaccag	840
ggccgagggg	ggctgggctc	catctttgtc	tgggcctcgg	ggaacggggg	ccgggaacat	900
gacagctgca	actgcgacgg	ctacaccaac	agtatctaca	cgctgtccat	cagcagcgcc	960
acgcagtttg	gcaacgtgcc	gtggtacagc	gaggcctgct	cgtccacact	ggccacgacc	1020
tacagcagtg	gcaaccagaa	tgagaagcag	atcgtgacga	ctgacttgcg	gcagaagtgc	1080
acggagtctc	acacggggcac	ctcagcctct	gcccccttag	cagccggcat	cattgctctc	1140
accctggagg	ccaataagaa	cctcacatgg	cgggacatgc	aacacctggt	ggtacagacc	1200
tcgaagccag	cccacctcaa	tgccaacgac	tggggccacca	atggtgtggg	ccggaaagtg	1260
agccactcat	atggctacgg	gcttttgac	gcaggcgcca	tgggtggcct	ggcccagaat	1320
tggaccacag	tggccccca	gcggaagtgc	atcatcgaca	tcctcaccga	gccccaaagac	1380
atcgggaaac	ggctcgaggt	gcggaagacc	gtgaccgcgt	gcctggggcga	gccccaacac	1440
atcactcggc	tggagcacgc	tcaggcgcg	ctcaccctgt	cctataatcg	ccgtggcgac	1500
ctggccatcc	acctggtcag	ccccatgggc	acccgctcca	ccctgctggc	agccaggcca	1560
catgactact	ccgcagatgg	gtttaatgac	tgggccttca	tgacaactca	ttcctgggat	1620
gaggatccct	ctggcgagtg	ggtcctagag	attgaaaaca	ccagcgaagc	caacaactat	1680
gggacgctga	ccaagtccac	cctcgtactc	tatggcaccg	cccctgaggg	gctgcccgta	1740
cctccagaaa	gcagtggctg	caagaccctc	acgtccagtc	aggcctgtgt	ggtgtgcgag	1800
gaaggcttct	ccctgcacca	gaagagctgt	gtccagcact	gccctccagg	cttcgcccc	1860
caagtccctg	atacgcacta	tagcaccgag	aatgacgtgg	agaccatccg	ggccagcgtc	1920
tgcgccccct	gccacgcctc	atgtgccaca	tgccaggggc	cggccctgac	agaactgcctc	1980
agctgccccca	gccacgcctc	cttgaccct	gtggagcaga	cttgctcccg	gcaaagccag	2040
agcagccgag	agtccccgcc	acagcagcag	ccacctcggc	tgcccccgga	ggtggagggc	2100
gggcaacggc	tgcgggcagg	gctgctgcc	tcacacctgc	ctgaggtggt	ggccggcctc	2160
agctgcgcct	tcacgtgct	ggtcttcgtc	actgtcttcc	tggctctgca	gctgcgctct	2220
ggctttagtt	ttcggggggg	gaaggtgtac	accatggacc	gtggcctcat	ctcctacaag	2280
gggctgcccc	ctgaagcctg	gcaggaggag	tgcccgtctg	actcagaaga	ggacgagggc	2340
cggggcgaga	ggaccgcctt	tatcaaagac	cagagcgccc	tctga		2385

<210> 3
 <211> 794

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусный участок распознавания фурина

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (2)..(2)

<223> X является любой аминокислотой или отсутствием аминокислоты

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (3)..(3)

<223> X является лизином или аргинином

<400> 4

Arg Xaa Xaa Arg

1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Трансформированная клетка, содержащая:
нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин в супернатант культуры, где фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.
2. Трансформированная клетка по п. 1, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg.
3. Трансформированная клетка по п. 2, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах.
4. Трансформированная клетка по п. 2, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.
5. Трансформированная клетка по п. 2, где белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протеином C, протеином S или протеином Z.
6. Трансформированная клетка по п. 5, где белок является фактором X.
7. Трансформированная клетка по п. 6, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл.
8. Трансформированная клетка по п. 7, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой, является полностью процессированным.
9. Трансформированная клетка по п. 6, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл.
10. Трансформированная клетка по п. 9, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой,

является полностью процессированным.

11. Трансформированная клетка, содержащая:

первую нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X человека, таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин и фактор X в супернатант культуры, где фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов, и по меньшей мере 85% фактора X является полностью процессированным.

12. Трансформированная клетка по п. 11, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах.

13. Трансформированная клетка по п. 11, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

14. Трансформированная клетка по п. 11, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

15. Трансформированная клетка по п. 14, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой, является полностью процессированным.

16. Трансформированная клетка по п. 11, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

17. Трансформированная клетка по п. 16, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой, является полностью процессированным.

18. Трансформированная клетка по любому из пп. 1 или 11,

где концентрация фурина в супернатанте культуры достигает от приблизительно 50 до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 42 до приблизительно 72 часов.

19. Эукариотическая система экспрессии белка, содержащая:

линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

первый экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и

второй экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg,

где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

20. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 19, где белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протеином С, протеином S или протеином Z.

21. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 20, где белок является фактором X.

22. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 21, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

23. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 22, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

24. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 21, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в

супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

25. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 24, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

26. Эукариотическая система экспрессии белка, содержащая:
линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

первый экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и

второй экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии фактора X линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X,

где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

27. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 26, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

28. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 27, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

29. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 26, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно

78 часов.

30. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 29, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

31. Эукариотическая система экспрессии белка, содержащая: линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

первый экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии фурина человека и белка, расщепляемого фурином и содержащего мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg, линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

32. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 31, где белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протеином C, протеином S или протеином Z.

33. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 32, где белок является фактором X.

34. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 33, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

35. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 34, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

36. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 33, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно

78 часов.

37. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 36, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

38. Эукариотическая система экспрессии белка, содержащая:
линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

первый экспрессирующий вектор, адаптированный для экспрессии фурина человека и фактора X, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

39. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 38, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

40. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 39, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии является полностью процессированным.

41. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 38, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

42. Эукариотическая система экспрессии белка по п. 41, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии является полностью процессированным.

43. Эукариотическая система экспрессии белка по любому из пп. 19, 26, 31 или 38, где концентрация фурина в супернатанте

культуры достигает от приблизительно 50 до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 42 до приблизительно 72 часов.

44. Способ получения рекомбинантного белка, включающий:

трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и

трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg;

где линия клеток, трансфицированная с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретирует функциональный фурин человека в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл в супернатанте культуры после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

45. Способ по п. 44, где белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протеином С, протеином S или протеином Z.

46. Способ по п. 45, где белок является фактором X.

47. Способ по п. 45, где функциональный фурин секретируется линией клеток в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

48. Способ по п. 47, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого линией клеток, является полностью процессированным.

49. Способ по п. 45, где функциональный фурин секретируется линией клеток в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно

78 часов.

50. Способ по п. 49, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого линией клеток, является полностью процессированным.

51. Способ по п. 44, где линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно.

52. Способ по п. 44, где линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора.

53. Способ по п. 44, где линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

54. Способ получения рекомбинантного белка, включающий:

трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и

трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фактора X линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора X;

где линия клеток, трансфицированных с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретирует функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

55. Способ по п. 54, где функциональный фурин секретируется линией клеток в супернатанте культуры в концентрации по меньшей

мере от приблизительно 50 до приблизительно 60 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

56. Способ по п. 55, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого линией клеток, является полностью процессированным.

57. Способ по п. 54, где функциональный фурин секретруется линией клеток в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 100 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

58. Способ по п. 57, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого линией клеток, является полностью процессированным.

59. Способ по п. 55, где линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно.

60. Способ по п. 55, где линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора.

61. Способ по п. 55, где линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

62. Способ по любому из пп. 44 или 54, где концентрация фурина в супернатанте культуры достигает от приблизительно 50 до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 42 до приблизительно 72 часов.

60. Полностью процессированный рекомбинантный фактор X, продуцируемый трансформированной клеткой по любому из пп. 1-18.

61. Полностью процессированный рекомбинантный фактор X, продуцируемый системой экспрессии по любому из пп. 19-43.

62. Полностью процессированный рекомбинантный фактор X,

получаемый способом по любому из пп. 44-62.

63. Система экспрессии для рекомбинантного FX, адаптированная для секреции фурина в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

64. Способ получения зрелого, полностью процессированного FX, включающий систему экспрессии, секретирующую фурин в супернатант культуры в концентрации от приблизительно 50 Ед./мл до приблизительно 300 Ед./мл после культивирования в течение от приблизительно 36 до приблизительно 78 часов.

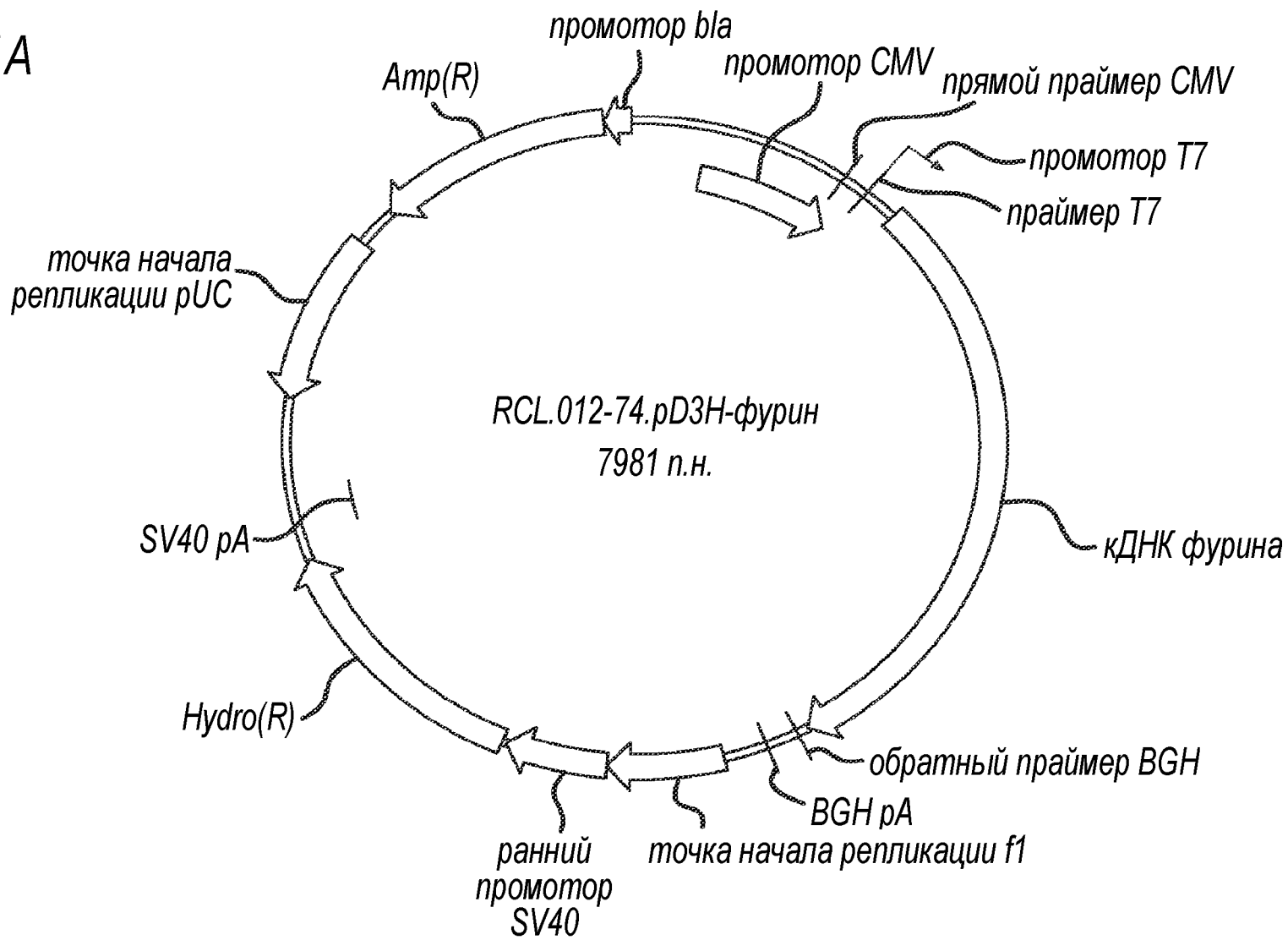
65. Способ лечения нарушения свертывания, включающий:

введение нуждающемуся в этом индивидууму полностью процессированного рекомбинантного фактора X по любому из пп. 60-62, где в результате введения нарушение свертывания подвергают лечению.

66. Способ по п. 65, где нарушение свертывания является гемофилией или болезнью Виллебранда.

По доверенности

ФИГ.1А



GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCT
GCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCT
GCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTT
ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
TTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGCGTGGGAGG
TCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA
GCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGC
GGCCGCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAA
GGTCTTCACCAACACGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTTCCTCAACCTGG
GCCAGATCTTCGGGGACTATTACCCTTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTGCGCTCACCGCCCGCGGCACAGCCGGCTG
CAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGACTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAA
GTTTCTCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCCTGGGCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCA
TTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGACTTGGCAGGCAATATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAAT
GACCAGACCCCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGGCACACGGTGTGCGGGGAAGTGGCTGCGGTGGC
CAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCCTACAACGCCCGCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGG
AGGCACGCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGG
CCAGCCCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGGGAA
CGGGGGCCGGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACACGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTGGCA
ACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACT
GACTTGGCGGCAGAAGTGACCGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCATTGCTCTCACCCCTGGAGGC
CAATAAGAACCTCACATGGCGGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCCACCA
ATGGTGTGGGCCGGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACA
GTGGCCCCCAGCGGAAGTGCATCATCGACATCCTCACCGAGCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTGACCGC
GTGCCCTGGGCGAGCCCAACACATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCCCTGTCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGCCA
TCCACCTGGTCAAGCCCATGGGCACCCGCTCCACCCCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAATGACTGGGCC
TTCATGACAACCTCATTCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGTCTTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAGCCAACAACCTATGGGAC
GCTGACCAAGTTCACCCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCCTCACGT

CCAGTCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCAA
GTCCTCGATACGCACTATAGCACCCGAGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCATGTGCCACATG
CCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACGCCTCCTTGGACCCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGCAAAGCCAGA
GCAGCCGAGAGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGGCGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCC
TCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCCTCAGCTGCGCCTTCATCGTGCTGGTCTTCGTCACTGTCTTCCTGGTCTGACAGCTGCGCTC
TGGCTTTAGTTTTTCGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGG
AGTGCCCGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGATCTAGAGGGCCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCCTTCTTGACCTGGA
AGGTGCCACTCCCACCTGTCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGA
ACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGGAACAACACT
CAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCCGGCCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACCGGAATTAATTTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC
AACCATAGTCCCGCCCTAAC'TCCGCCCATCCCGCCCTAAC'TCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTT
TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATAFCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAAGTT
TCTGATCGAAAAGTTCCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTGAGCTTCGATGTAGGAGGGC
GTGGATATGTCTTGCGGGTAATAAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCTCCCC
ATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCT
GCCTGAAACCGAAGTCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTCCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCCGGT
TCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGG
CAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCCGTCCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCCG

ФИГ.1В (продолжение)

GCACCTCGTGACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGT
TCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGG
AGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGG
CAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCC
GCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAG
GAATAGCACGTGCTACGAGATTTTCGATTCACCCGCGCCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAPCGTTTTCCGGGACGCGGGCTGGAT
GATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTATTATGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATA
GCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTFTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGT
ATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAA
CATAAGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCCAGTCGGGAAACCTGTTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA
ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCG
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTT
AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
GTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
TGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
TTCGTTTCAATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTCAACTTT
ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCAATG
CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC

ФИГ. 1В (продолжение)

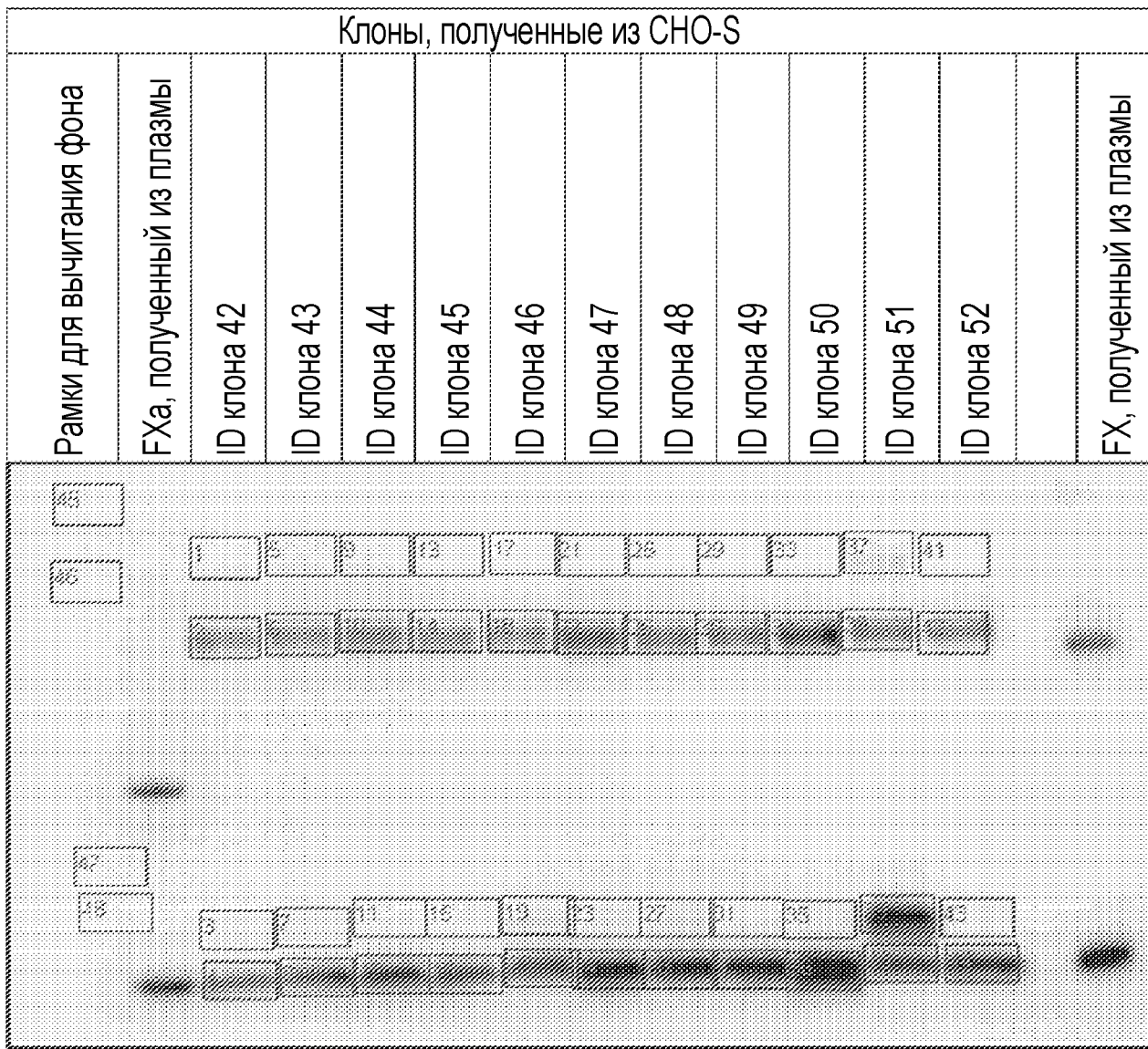
ATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC
AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGA
AAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

ФИГ.1В (продолжение)

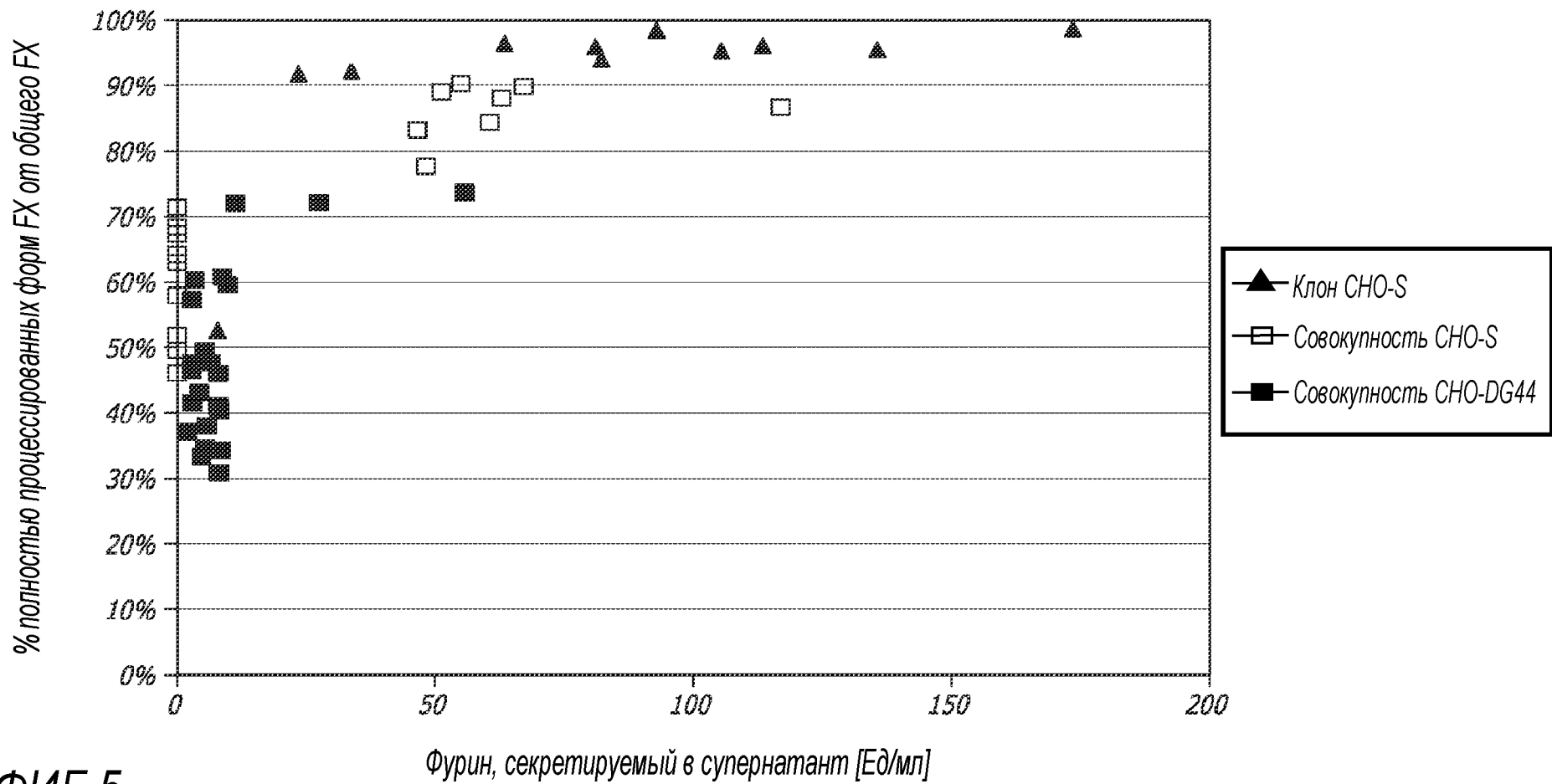
ATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTT
CACCAACACGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTTCCTCAACCTGGGCCAGA
TCTTCGGGGACTATTACCACTTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTGCGCTCACCGCCCGGGCACAGCCGGCTGCAGAGG
GAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGAATAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCCACAGACCCCAAGTTTCC
TCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCTGGGGCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCATTTGTGG
TCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGACCAG
GACCCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGGCACACCGGTGTGCGGGGAAGTGGCTGCGGTGGCCAACAA
CGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCCTACAACGCCCGCATTTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGGAGGCAC
GCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTACAGTGCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGCC
CGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGGGAACGGGGG
CCGGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACACGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTTGGCAACGTGC
CGTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTG
CGGCAGAAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCAFTGCTCTCACCTGGAGGCCAATAA
GAACCTCACATGGCAGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCCACCAATGGTG
TGGGCCGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGTGGCC
CCCCAGCGGAAGTGCATCATCGACATCCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTGACCGCGTGCCT
GGGCGAGCCCAACCACATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCTGTCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGCCATCCACC
TGGTCAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTTAATGACTGGGCCTTCATG
ACAACTCATTCCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGTCTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAGCCAACAACCTATGGGACGCTGAC
CAAGTTCACCCTCGTACTCTATGGCACCCGCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCCTCACGTCCAGTC
AGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCAAGTCTC
GATACGCACTATAGCACCGAGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCCTCATGTGCCACATGCCAGGG
GCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACGCCTCCTTGGACCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGGCAAAGCCAGAGCAGCC
GAGAGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACAC
CTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCCTCAGCTGCGCCTTCATCGTGTGGTCTTCGTCACTGTCTTCTGGTCTGCGCTGCGCTCTGGCTT
TAGTTTTCGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGCC
CGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGA

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQR
EPQVQWLEQQVAKRRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSIILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQ
DPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPA
RLAEEAFFRGVSQGRGGLGSI FVWASGNNGREHDS CNCDGYTNSIYTLSISSATQFGNVPWYSEACSSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDL
RQKCTESHTGTSASAPLAAGI IALTLEANKNLTWRDMQHLLVVTQSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVA
PQRKCIIDIILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFM
TTHSWDEDPSEWVLEIENTSEANNYCTLTKFTLVLYGTAPGLFVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVL
DTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSH
LPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQEECPDSEEDGRGER.TAFIKDQSAL

Фиг.3



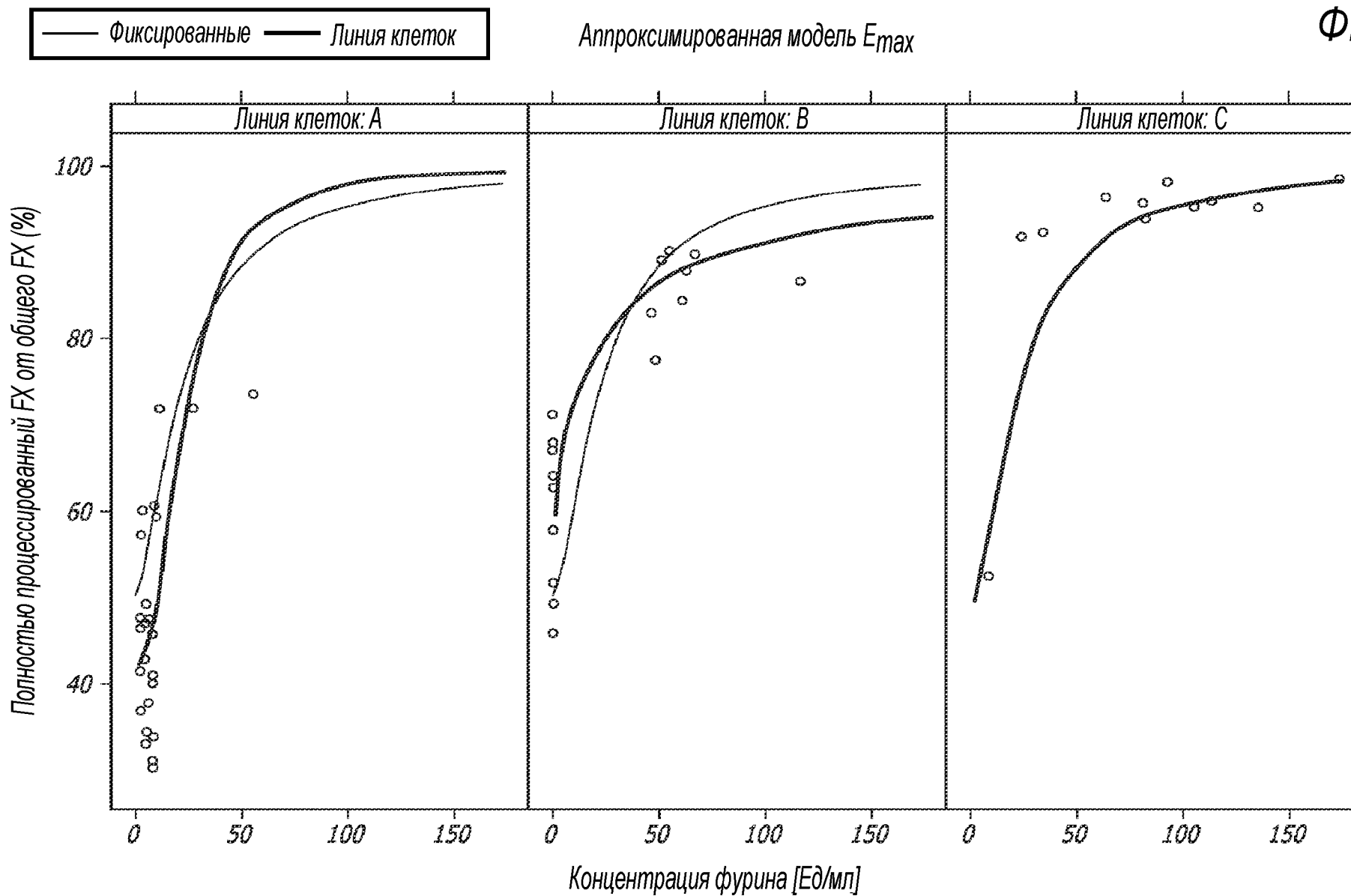
ФИГ.4



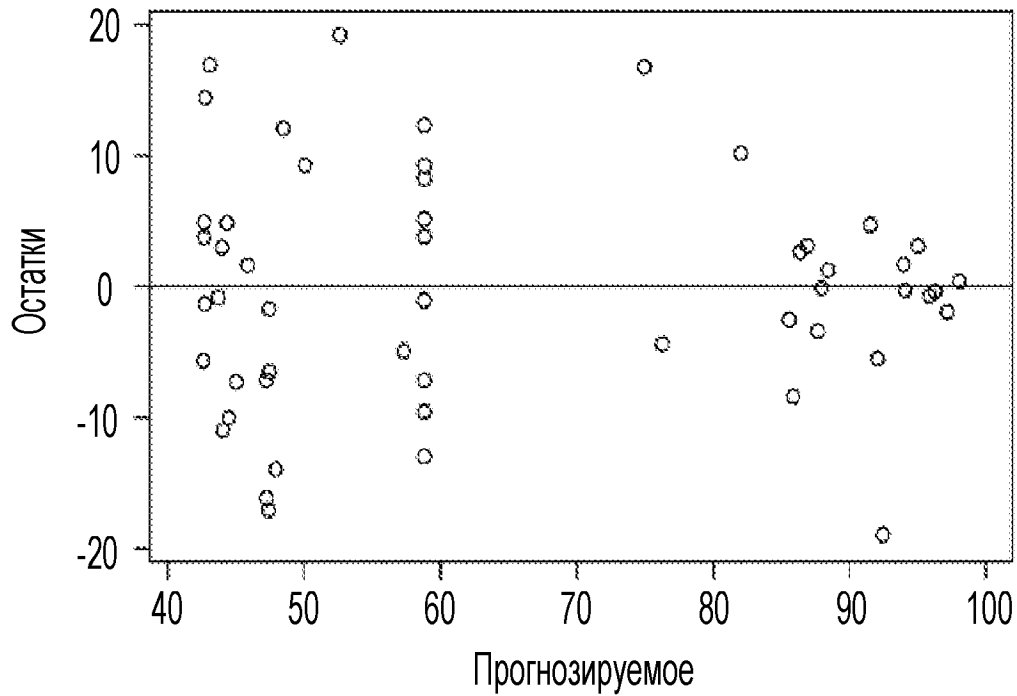
ФИГ.5

ФИГ.6

Аппроксимированная модель E_{max}

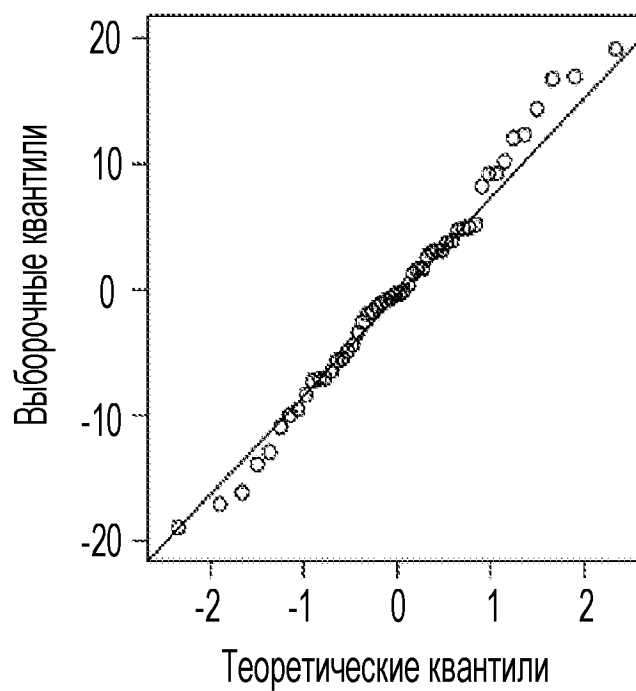


Остаток по сравнению с прогнозируемым



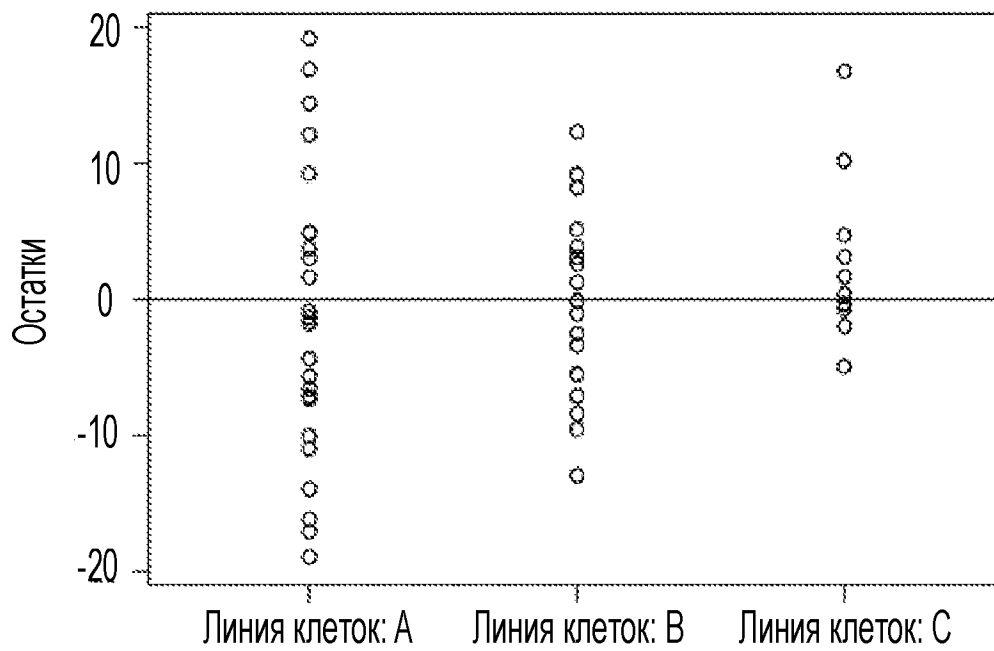
ФИГ.7А

Нормальный график Q-Q для остатков



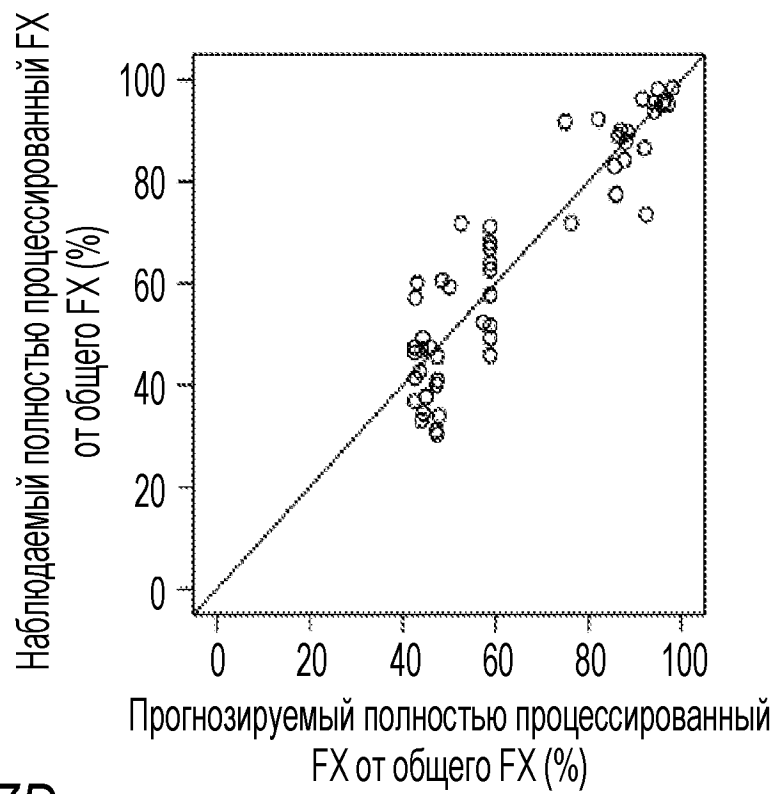
ФИГ.7В

Остаток по сравнению с линией клеток



ФИГ.7С

Наблюдаемое по сравнению с прогнозируемым

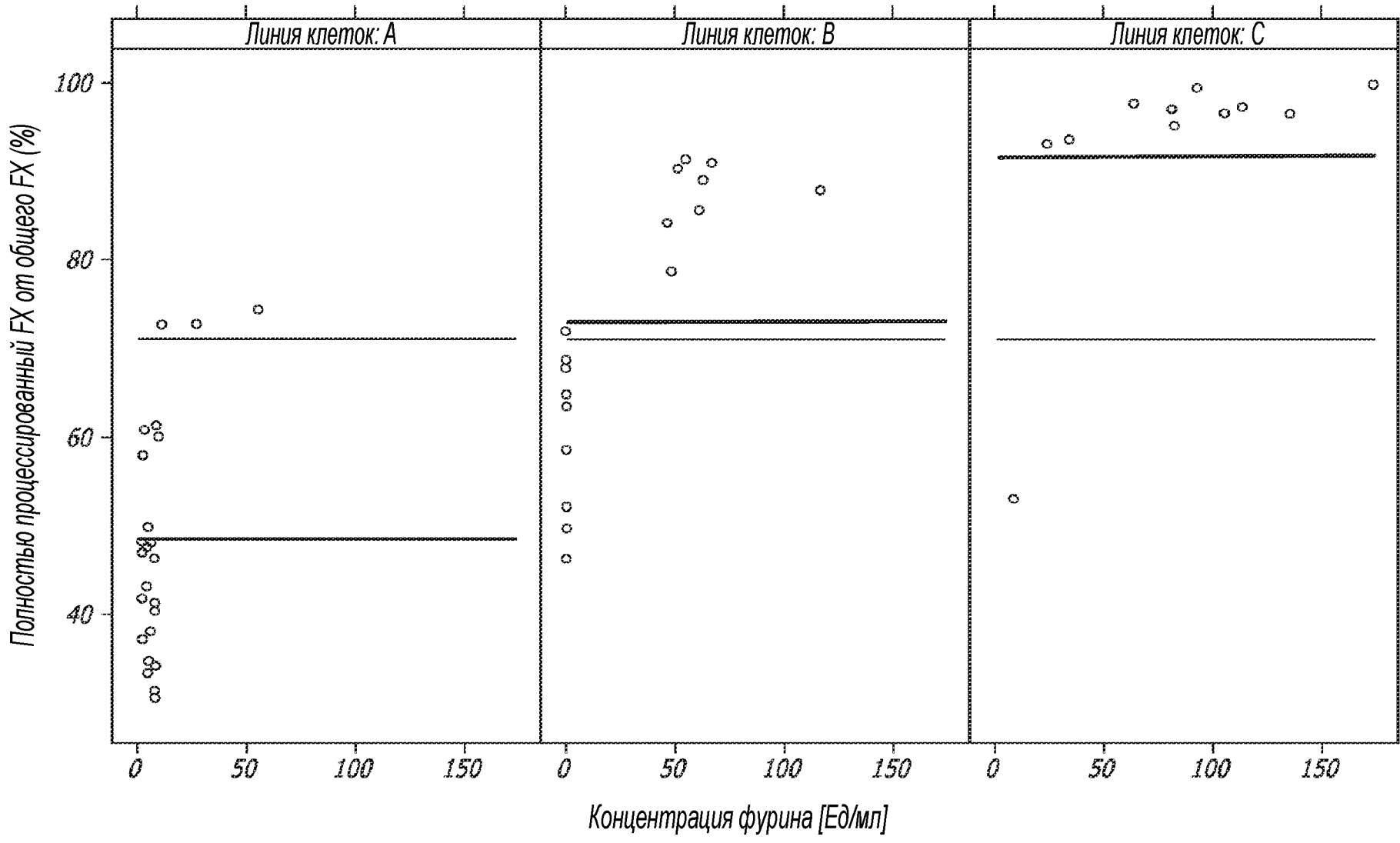


ФИГ.7D

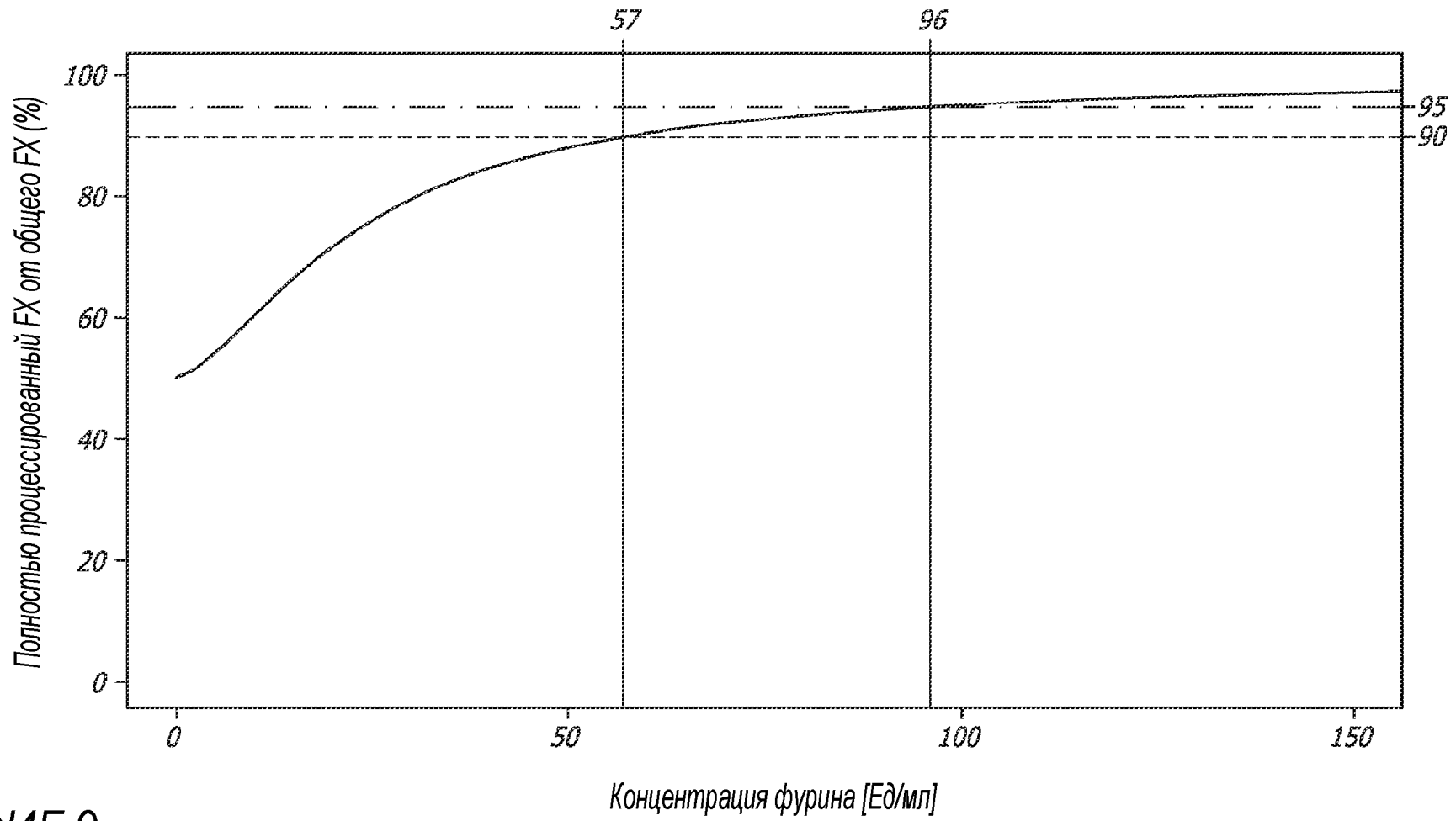
ФИГ.8

— Фиксированные — Линия клеток

Аппроксимированная нулевая модель



Модель совокупности E_{max}



ФИГ.9