

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 265 991**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2000 PCT/EP2000/09453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2001 WO0123527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2000 E 00969319 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **31.08.2016 EP 1220893**

54 Título: **Medio para el cultivo de células libre de proteínas y de suero**

30 Prioridad:

28.09.1999 AT 165999

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

03.05.2017

73 Titular/es:

**BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
INDUSTRIESTRASSE 67
1221 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED;
MUNDT, WOLFGANG;
DORNER, FRIEDRICH;
GRILLBERGER, LEOPOLD y
MITTERER, ARTUR**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

DESCRIPCIÓN

Medio para el cultivo de células libre de proteínas y de suero

La invención se refiere a un proceso tal como se reivindica para el cultivo de células
5 libre de proteínas y de suero.

Los cultivos celulares, en especial de células eucarióticas o de mamíferos, necesitan constantemente de medios especiales de cultivo que permitan que las células dispongan de los nutrientes y las sustancias de crecimiento necesarias para un crecimiento eficaz y para la producción de proteínas deseadas. A este respecto,
10 generalmente el suero o los compuestos derivados de suero (por ejemplo, suero bovino) es utilizado como componente del medio.

Sin embargo, cuando se utiliza suero o aditivos proteicos derivados de fuentes humanas o animales para el cultivo de células, aparecen numerosos problemas, en especial cuando la materia prima para la preparación de un agente medicinal que se va a administrar a seres humanos se consigue mediante el cultivo celular.
15

En el caso de estas preparaciones de suero, por tanto, la composición y calidad ya varían de un lote a otro debido a la disimilitud de los organismos donantes para estas preparaciones. Esto representa un importante problema, especialmente para la estandarización de la producción celular y para establecer condiciones estándar de crecimiento para estas células. En cada caso es necesario un control de calidad
20 intensivo y constante del suero que se utilice. Sin embargo, esto lleva mucho tiempo y es muy costoso, especialmente en caso de estas composiciones complejas tales como sueros.

Además, las preparaciones complejas de este tipo contienen múltiples proteínas que pueden afectar de forma perjudicial, especialmente en el contexto de un
25 proceso de purificación de proteína recombinante que se deba recuperar del cultivo celular. Esto es particularmente aplicable a aquellas proteínas que son homólogas o similares a la proteína que se deba recuperar. Naturalmente, estos problemas son especialmente críticos debido a que el producto biogénico suspendido en el
30 medio que se utiliza (por ejemplo, proteína bovina) sólo puede eliminarse fiablemente dentro del contexto de la purificación mediante una purificación diferencial bastante específica (por ejemplo, con anticuerpos dirigidos particularmente sólo contra la proteína recombinante pero no contra la proteína

bovina (Björck, L., J. Immunol., 1988, Vol. 140, pp. 1194-1197; Nilson y col., J. Immunol. Meth., 1993, 164, pp. 33-40)).

Sin embargo, un gran problema de la utilización de suero o de compuestos derivados de suero en el medio de cultivo es también el riesgo de contaminación por micoplasma, virus o agentes BSE. Con respecto a las preparaciones que derivan de sangre humana, se debe hacer hincapié en el riesgo de contaminación por virus tales como la hepatitis o el VIH. En caso de suero o de componentes de suero que deriven de material bovino, en particular, existe el peligro de contaminación por BSE. Además de lo anterior, todos los materiales derivados de suero pueden también ser contaminados por agentes inductores de enfermedades que hasta ahora nos son desconocidos.

La adición de componentes de suero para garantizar la adhesión adecuada de las células a sus superficies y para asegurar una producción adecuada de las sustancias deseadas a partir de las células se considera, salvo algunas excepciones, indispensable precisamente para el cultivo celular en superficies sólidas. Así, con el método que se describe en la WO 91/09935, por ejemplo, ha sido posible lograr un proceso de cultivo libre de suero y de proteína de antígeno de virus/virus FSEM gracias a un cultivo libre de suero y de proteína de células permanentes dependientes de superficie, preferentemente de células Vero (véase WO 96/15231). Sin embargo, éstas no son células recombinantes sino más bien células huésped que se utilizan para la producción de antígenos de virus en procesos líticos.

Por el contrario, las células que se utilizan principalmente para una preparación recombinante, por ejemplo células CHO, pueden adherirse solamente hasta cierto punto. Así, las células CHO se pueden reproducir por métodos convencionales, unidas a microsoportes lisos y porosos, solamente bajo condiciones que contienen suero (véase la US 4.973.616; Cytotechnology 9 (1992), 247-253). Sin embargo, cuando las células de este tipo se reproducen bajo condiciones libres de suero, pierden esta propiedad y no se adhieren a los soportes lisos, o se sueltan fácilmente de los mismos si no se han proporcionado al medio otras adiciones promotoras de adhesión, por ejemplo fibronectina, insulina o transferrina. Sin embargo, éstas son también proteínas derivadas de suero.

Como alternativa, las células pueden reproducirse utilizando técnicas de cultivo en suspensión y, por ejemplo, mediante procesos en lotes o por técnicas de cultivo continuo. Preferentemente, el cultivo se produce utilizando el proceso por

quimioestático (Ozturk S.S. y col., 1996, Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., BIOT 164, Payne G.F. y col., Large Scale Cell Culture Technology, 1987, ed. Ly dersen B.K., Hauser publishers; pp. 206-212).

5 Kattinger H. y col., (Advances Mol. Cell. Biology, 1996, 15A, 193-207) describen un cultivo celular a largo plazo en un medio libre de proteína, pero estas células deben cultivarse sobre soportes y no permiten alternativas tales como técnicas de cultivo continuo. Se establece que estas células muestran solamente estabilidad a largo plazo cuando están adheridas a la superficie de los soportes a causa de un crecimiento reducido y, como consecuencia, a una necesidad reducida de factores
10 de crecimiento.

Además, en la técnica anterior en varias ocasiones se ha intentado adaptar las células a un medio libre de proteína a partir de condiciones que contienen suero. Sin embargo, en el caso de una adaptación de este tipo, se ha encontrado reiteradas veces, que la producción de la proteína expresada y la productividad de
15 las células recombinantes se ven notablemente reducidas en el medio libre de proteína después de la adaptación en comparación con aquellas condiciones que contienen suero (Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 (1994), 691-658).

También se ha descubierto que, en el caso de una alta densidad celular, a veces la producción de proteínas recombinantes se ve considerablemente restringida.
20 Durante los intentos de adaptación de las células a los medios libres de proteína o de suero, también ha aparecido reiteradas veces una inestabilidad con un crecimiento reducido de las células que se utilizan de modo que se producen células con expresión reducida o incluso se producen células improductivas, por lo que éstas tienen una ventaja en el crecimiento, en comparación con las células
25 productivas, en medios libres de proteína y suero, lo que conduce al hecho de que éstas sobrepasan a las células productivas y con ello, finalmente, el cultivo entero rinde muy bajas producciones del producto.

Sumario de la invención

Por tanto, la presente invención tiene el objetivo de mejorar las posibilidades de los
30 cultivos libres de proteína y suero de células recombinantes y de agentes y los procesos de elaboración disponibles con los que se puedan cultivar eficazmente células recombinantes de forma libre de suero o de proteína. Además, en ese caso sería posible no sólo cultivar células dependientes de superficies, sino también

utilizar técnicas de cultivo por suspensión, para lo cual se requiere eliminar lo más posible la inestabilidad en la productividad de las células.

Además, otro objetivo de la presente invención consiste en incrementar eficazmente la producción de células recombinantes.

- 5 Finalmente, de acuerdo con la invención, es necesaria la adaptación de células recombinantes a los medios libres de suero y proteína para mejorar y configurar de forma más eficiente.

De acuerdo con la invención, estas tareas se llevan a cabo mediante el objeto de la reivindicación.

- 10 Sorprendentemente, se ha demostrado que los objetivos definidos anteriormente pueden conseguirse según la reivindicación 1, mediante el cultivo de células en un medio que contiene hidrolizado de soja ultrafiltrado, sin que se produzcan los inconvenientes del cultivo libre de suero del estado de la técnica anterior. En este caso, los términos hidrolizado de soja o peptona de soja pueden emplearse
15 indistintamente.

El medio aquí descrito contiene preferentemente hidrolizado de soja ultrafiltrado en una cantidad de más de un 10% en peso con respecto al peso seco total del medio. Generalmente, al medio se le proporciona una cantidad de hidrolizado de soja del 4-40%.

- 20 Según la invención, la elección de un hidrolizado de soja ultrafiltrado específico no es crítica. Se pueden utilizar, según la invención, múltiples preparaciones de soja que se encuentran en el mercado, por ejemplo peptonas procedentes de harina de soja digeridas enzimáticamente (por ejemplo, por papaína) y con un pH entre 6,5 y 7,5 y un contenido total en nitrógeno de entre el 9% y el 9,7%, así como un
25 contenido en cenizas de entre el 8 y el 15%. Se trata de peptonas procedentes de la soja en la forma en la cual los expertos en este campo utilizan habitualmente para el cultivo celular.

Según una forma de realización preferente, en el medio se emplea una preparación purificada de un hidrolizado de soja ultrafiltrado o de una fracción cruda del mismo.

- 30 Preferentemente, durante dicha purificación se eliminan las impurezas que podrían dificultar un cultivo eficiente o se mejora la precisión del hidrolizado, por ejemplo en cuanto a su peso molecular.

De acuerdo con la invención, la provisión de un paso de ultrafiltración durante esta purificación ha demostrado ser especialmente valiosa en la práctica; debido a ello, es necesaria la utilización de un hidrolizado de soja ultrafiltrado.

5 La ultrafiltración puede realizarse aplicando los procesos descritos ampliamente en el estado de la técnica anterior, por ejemplo utilizando filtros de membrana con un límite de separación definido.

La purificación de peptona de soja ultrafiltrada puede realizarse mediante cromatografía en gel, por ejemplo cromatografía Sephadex con, por ejemplo, Sephadex G25 o Sephadex G10 o materiales equivalentes, mediante cromatografía
10 de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía por exclusión de tamaño o cromatografía en fase inversa. Éstos procesos que provienen de la técnica anterior son muy familiares a los expertos en este campo. Con estos métodos se pueden seleccionar aquellas fracciones que contienen hidrolizado de soja de un peso molecular definido, es decir ≤ 1.000 dalton, preferentemente ≤ 500
15 dalton, en especial ≤ 350 dalton.

Por tanto, la descripción también comprende un proceso para producir un medio de cultivo libre de suero y proteína que incluye la obtención de un hidrolizado de soja, la ultrafiltración de dicho hidrolizado de soja mediante utilizando un proceso de ultrafiltración, la purificación de dicha fracción del hidrolizado de soja mediante
20 cromatografía por exclusión de tamaño y la selección de las fracciones de hidrolizado de soja que consisten en hidrolizados de soja con un peso molecular ≤ 1.000 dalton, preferentemente ≤ 500 dalton, en especial ≤ 350 dalton.

Un hidrolizado de soja especialmente ventajoso se caracteriza porque tiene un contenido en aminoácidos libres de entre el 10, 3 y el 15, 6% o, preferentemente,
25 de entre el 12 y el 13, 5%; un contenido total en nitrógeno de entre el 7, 6 y el 11, 4% o, preferentemente, de entre el 8, 7 y el 9, 5%; así como un contenido en endotoxina < 500 U/g; y así al menos el 40% o preferentemente al menos el 50% o en especial al menos el 55% de éste tiene un peso molecular de 200-500 dalton y al menos el 10% o preferentemente el 15% tiene un peso molecular de 500-1.000
30 dalton. En particular, al menos el 90% del hidrolizado de soja posee un peso molecular ≤ 500 dalton.

Un hidrolizado de soja de este tipo se adapta especialmente bien a la producción industrial de proteínas recombinantes ya que, debido a sus características

especiales, se puede estandarizar de forma particularmente fácil y se puede utilizar en procesos rutinarios.

Además del hidrolizado de soja, el medio según la invención puede contener también otros medios sintéticos conocidos como tales, por ejemplo F12 de
5 DMEM/HAM, Medium 199 o RPMI, que son lo suficientemente conocidos por los profesionales.

Además, el medio empleado según la invención también contiene preferentemente aminoácidos, en especial aquellos seleccionados de entre el grupo formado por L-asparagina, L-cisteína, L-cistina, L-prolina, L-triptófano, L-glutamina o mezclas de
10 los mismos.

Además, según la invención al medio empleado se añaden preferentemente los siguientes aminoácidos: L-asparagina (en una cantidad de 0, 001-1 g/l de medio, preferentemente de 0, 1-0, 05 g/l, en especial de 0, 015-0, 03 g/l) ; L-cisteína (0, 001-1 g/l, preferentemente 0, 005-0, 05 g/l, en especial 0, 01-0, 03 g/l) ; L-cistina (0,
15 001-1 g/l, preferentemente 0, 01-0, 05 g/l, en especial 0, 015-0, 03 g/l) ; L-prolina (0, 001-1, 5 g/l, preferentemente 0, 01-0, 07 g/l, en especial 0, 02-0, 05 g/l) ; L-triptófano (0, 001-1 g/l, preferentemente 0, 01-0, 05 g/l, en especial 0, 015-0, 03 g/l) ; y L-glutamina (0, 05-1 g/l, preferentemente 0, 1-1 g/l) .

Los aminoácidos arriba citados pueden añadirse al medio empleado según la
20 invención bien de forma individual o en combinación. Es especialmente preferente la adición combinada de una mezcla de aminoácidos que contenga todos los aminoácidos anteriormente mencionados.

En una forma especial de realización se utiliza un medio libre de suero y proteína, por lo que este medio contiene además una combinación de la mezcla de
25 aminoácidos anteriormente mencionada y peptona de soja purificada y ultrafiltrada.

Sorprendentemente se ha descubierto que para inactivar virus u otros patógenos por ejemplo, se puede calentar el medio sin que se produzcan efectos negativos durante aproximadamente 5-20 minutos, preferentemente 15 minutos a 70-95°C, en especial a 85-95°C.

30 De acuerdo con la invención, se pueden utilizar los medios sintéticos conocidos en combinación con el hidrolizado de soja no filtrado. Los medios sintéticos convencionales pueden contener sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, una fuente de carbohidratos y agua. Por ejemplo, se puede hacer uso del medio F12 de

DMEM/HAM. La concentración de extracto de soja no filtrado en el medio oscila preferentemente entre 0,1 y 100 g/l, en especial entre 1 y 5 g/l. Según una forma de realización especialmente preferente, se puede utilizar peptona de soja no filtrada que haya sido estandarizada con respecto a su peso molecular. El peso molecular de la peptona de soja no filtrada es preferentemente inferior a 50 kD, en especial inferior a 10 kD, en particular inferior a 1 kD.

La adición de peptona de soja ultrafiltrada ha demostrado ser especialmente ventajosa para la productividad de las líneas celulares recombinantes, así, el peso molecular medio de la peptona desoja es de 350 dalton (Quest Company). Se trata de un aislado de soja con un contenido total en nitrógeno de aproximadamente el 9, 5% y un contenido en aminoácidos libres de aproximadamente el 13%.

Es preferente el empleo de peptona de soja purificada ultrafiltrada con un peso molecular \leq 500 dalton, en especial \leq 350 dalton.

Preferentemente, el medio según la invención también contiene sustancias auxiliares, por ejemplo sustancias tampón, estabilizadores de oxidación, estabilizadores para neutralizar el esfuerzo mecánico o inhibidores de proteasa.

En especial, se emplea un medio con la siguiente composición: medio sintético mínimo (1-25 g/l), peptona de soja (0,5-50 g/l), L-glutamina (0,05-1 g/l); NaHCO₃ (0,1-10 g/l), ácido ascórbico (0,0005-0,05 g/l), etanolamina (0,0005-0,05 g/l) y selenito sódico (1-15 μ g/l).

Si es necesario, según la invención como agente antiespumante se puede añadir al medio un agente tensioactivo no iónico, por ejemplo polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108).

Este agente se utiliza generalmente para proteger las células contra los efectos negativos de la aireación ya que, sin la adición de un agente tensioactivo, las burbujas ascendentes que estallan pueden provocar daños en aquellas células situadas en la superficie de estas burbujas de aire (burbujeo) (Murhammer y Goochee, 1990, Biotechnol. Prog. 6:142-148).

En este caso, la cantidad de agente tensioactivo no iónico puede oscilar entre 0,05 y 10 g/l aunque, preferentemente, la cantidad más pequeña posible se encuentra entre 0,1 y 5 g/l.

Además, según la invención el medio puede contener también ciclodextrina o un derivado de la misma.

El medio libre de suero y proteína contiene preferentemente un inhibidor de proteasa, por ejemplo inhibidores de serina proteasa, que son adecuados para el cultivo de tejidos y son de origen sintético o vegetal.

Preferentemente, como células para cultivo en el medio empleado según la invención se utilizan células que ya hayan sido adaptadas; es decir, células que ya se han adaptado al crecimiento en medios libres de proteína y suero. Se ha descubierto que no sólo se pueden lograr aumentos de productividad con estas células preadaptadas, sino que también se mejora claramente su estabilidad en los cultivos libres de suero y proteína utilizando el medio de acuerdo con la invención.

Sin embargo, según la invención los clones de las células recombinantes demuestran ser especialmente valiosos, ya que éstos son estables desde el principio durante al menos 40 generaciones y, preferentemente, durante al menos 50 generaciones, en los medios libres de suero y proteína, y expresan productos recombinantes.

Estos clones celulares pueden obtenerse a partir de un cultivo celular obtenido después de cultivar un clon celular recombinante original sobre un medio que contiene suero y posterior readaptación de las células a un medio libre de suero y proteína.

Con el término clon celular original se entiende un transfectante del clon celular recombinante que, después de la transfección de las células huésped con una secuencia de nucleótido recombinante, expresa un producto recombinante de una manera estable bajo las condiciones de laboratorio. El clon original crece en un medio que contiene suero para optimizar su crecimiento. Para incrementar su productividad, se reproduce el clon original, opcionalmente en presencia de un agente de selección, seleccionándose con un marcador de selección y/o de amplificación. Para la producción industrial a gran escala, el clon celular original se reproduce en condiciones de cultivo que contienen suero hasta alta una densidad celular y luego se readapta a un medio libre de suero o libre de proteína justo antes de la fase de producción. En este caso, el cultivo tiene lugar preferentemente sin presión de selección.

El cultivo del clon celular recombinante original puede tener lugar desde el principio en un medio libre de suero y libre de proteína; como consecuencia, ya no es

necesaria la readaptación. Si es necesario, en este caso se puede hacer uso también de un agente de selección y la selección puede producirse en el marcador de selección y/o de amplificación. Se describe un proceso tal, por ejemplo, en la EP 0 711 835.

5 El cultivo celular que se obtiene después de la readaptación a un medio libre de suero y proteína se somete a prueba en busca de aquellos clones celulares de la población celular que generan productos de forma estable en condiciones libres de suero y proteína, opcionalmente en ausencia de presión de selección. Esto puede tener lugar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos
10 específicos marcados que se dirigen contra el polipéptido o la proteína recombinante. Las células que son identificadas como productoras del producto son aisladas del cultivo celular y se vuelven a reproducir en condiciones libres de suero y proteína, siendo preferentemente equivalentes a las condiciones de producción. El aislamiento de las células por este medio puede realizarse mediante aislando las
15 células y testándolas en busca de productores de productos.

El cultivo celular que contiene las células estables puede someterse a ensayo de nuevo en busca de clones recombinantes estables, y éstos se aíslan del cultivo celular y se subclonan. Entonces, los clones celulares recombinantes estables que se obtienen en condiciones libres de suero y proteína pueden reproducirse además
20 bajo condiciones libres de suero y proteína.

Los clones celulares recombinantes o las poblaciones celulares que se preparan de esta forma en el medio empleado según la invención destacan, en particular, por la característica de que son estables durante un mínimo de 40 generaciones, preferentemente durante un mínimo de 50 generaciones y, en particular, durante
25 más de 60 generaciones, y expresan un producto recombinante.

Un ejemplo de un clon celular recombinante estable o de una población celular de este tipo, siguiendo la convención de Budapest, se ha presentado con el número 98012206 en el ECACC (UK).

El cultivo celular que ha de cultivarse de acuerdo con la invención, deriva
30 preferentemente de una célula recombinante de mamífero. Las células recombinantes de mamíferos pueden ser aquí aquellas que contengan secuencias que codifican un polipéptido o una proteína recombinante. A este respecto, todas las células de crecimiento continuo que crecen de forma adherente o no adherente están incluidas. Son especialmente preferentes las células BHK o las células CHO

recombinantes. Los polipéptidos o proteínas recombinantes pueden ser factores sanguíneos, factores de crecimiento u otros productos biomédicamente relevantes.

Según la presente invención, los clones celulares empleados contienen la secuencia de codificación de un Factor VIII recombinante y son capaces de
5 expresar éstos de una manera estable sobre varias generaciones. A este respecto, son especialmente preferentes las células CHO recombinantes que expresan el Factor VIII, vWF y Factor VIII.

Se necesitan 30 generaciones para empezar un banco de células madre. Se necesitan aproximadamente 40 generaciones al menos para llevar a cabo un cultivo
10 por lotes medio a escala de 1000-L. A partir de un clon celular individual, con el medio según la invención es posible preparar un banco de células madre (MCB) y un banco de células de trabajo (WCB) con aproximadamente 8-10 generaciones y, por tanto, un cultivo celular con hasta 20-25 generaciones, bajo condiciones libres de proteína y suero a escala de producción (biomasa de producción) mientras, por
15 el contrario, algunas generaciones se vuelven inestables después del crecimiento en un medio libre de suero o proteína con los medios y clones celulares anteriores y, como consecuencia, a) no es posible un cultivo celular uniforme con productores de producto y b) no es posible una productividad estable de productos durante un período prolongado de tiempo.

20 Sin embargo, de acuerdo con la invención, incluso era posible, por el contrario, encontrar una mayor productividad de los productos incluso en comparación con el clon celular original que había sido cultivado en un medio que contenía suero.

La invención se aclarará con más detalles por medio de los siguientes ejemplos, así como mediante las figuras en los dibujos, pero no ha de limitarse a los mismos.

25 La Fig. 1 muestra los resultados del cultivo de un clon celular rFVIII-CHO en un biorreactor de perfusión de 10-L:

- a) actividad del Factor VIII (miliunidades/ml) y velocidad de perfusión (1-5/día) durante un período de 42 días;
- b) productividad volumétrica (unidades de Factor VIII/l/día) en el biorreactor de
30 perfusión;

La Fig. 2 muestra una comparación de la productividad del Factor VIII (mU/ml) en el caso de un cultivo mediante el proceso por lotes de células CHO que expresan

- el rFactor VIII, en varios medios. La Mezcla 1 consiste en un medio libre de suero y proteína sin hidrolizado de soja, pero que contiene una mezcla de aminoácidos tal como se menciona en la Tabla 4; la Mezcla 2 consiste en un medio libre de suero y proteína que contiene hidrolizado de soja; la Mezcla 3 consiste en un medio libre de suero y proteína que contiene hidrolizado de soja y una mezcla de aminoácidos tal como se menciona en la Tabla 4; y la Mezcla 4 consiste en un medio libre de suero y proteína que contiene 2, 5 g/l de hidrolizado de soja purificado y ultrafiltrado así como una mezcla de aminoácidos tal como se menciona en la Tabla 4. Para la purificación del hidrolizado de soja ultrafiltrado se utilizó una columna Sephadex®.
- 10 La Fig. 3 muestra la productividad de Factor VIII (U/l) en caso del crecimiento continuo de células CHO que expresan el rFactor VIII en un medio libre de suero y proteína después del inicio de la adición de peptona de soja purificada y ultrafiltrada, a saber, al 6º día de cultivo.

- 15 La Fig. 4 muestra células BHK que expresan el Factor II recombinante que se han reproducido en un medio libre de proteína y suero que contiene hidrolizado de soja.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estabilidad de células rvWF-CHO después de pasarlas de un medio que contiene suero a un medio libre de suero y proteína

- Las células CHO-dhfr consistían en plásmido phAct-rvWF y pSV-dhfr cotransfectado, y los clones que expresan vWF fueron subclonados tal como se describe en Fischer y col. (1994, FEBS Letters 351:345-348). Se inició un banco de células de trabajo (WCB) a partir de los subclones que expresaban rvWF de una manera estable, bajo condiciones que contenían suero, pero en ausencia de MTX, y se inmovilizaron las células en un microsoporte poroso (Cytopore®) bajo condiciones que contenían suero. El paso de las células a un medio libre de suero y proteína tuvo lugar después de haber alcanzado una densidad celular de 2×10^7 células /ml en la matriz. Posteriormente, las células fueron cultivadas durante varias generaciones bajo condiciones libres de suero y proteína. Se sometieron a prueba las células en un medio libre de suero y proteína en varios momentos en el tiempo mediante inmunofluorescencia con anticuerpos marcados anti-vWF. La evaluación de la estabilidad de las células se realizó utilizando el banco de células de trabajo antes de cambiar el medio, después de 10 generaciones y después de 60 generaciones en el medio libre de suero y proteína. Mientras el banco de células de trabajo seguía mostrando productores de rvWF al 100%, la proporción de

productores de rvWF disminuyó hasta aproximadamente el 50% después de 10 generaciones en el medio libre de suero y proteína. Después de 60 generaciones, se identificó más del 95% de las células como no productivas.

Ejemplo 2: Clonación de clones CHO recombinantes estables

5 Se preparó una serie de dilución a partir del cultivo celular que contenía células rvWF-CHO de acuerdo con el Ejemplo 1 (este clon celular estable que se designó r-vWF-CHO F7 se presentó, de acuerdo con la convención de Budapest, al ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbur y, Wiltshire SP4 OJG, UK, el 22 de
10 enero de 1998, y adquirió el número de depósito 98012206) que había sido cultivado durante 60 generaciones en un medio libre de suero y proteína y se sembraron 0, 1 células en cada pocillo de una placa microtitulada. Se cultivaron las células durante aproximadamente 3 semanas en F12 de DMEM/HAM sin adición de suero o proteína y sin presión de selección, y se sometieron a prueba las células por inmunofluorescencia con anticuerpos marcados anti-vWF. Como clon de inicio
15 para la preparación de un banco de células de semillas se empleó un clon celular que había sido identificado como positivo. Se inició un banco de células madre (MCB) a partir del banco de células de semillas en un medio libre de suero y de proteína y las ampollas individuales fueron apartadas y congeladas para la preparación posterior de un banco de células de trabajo. Se preparó un banco de
20 células de trabajo en un medio libre de suero y proteína a partir de una ampolla individual. Se inmovilizaron las células en microsoportes porosos y se cultivaron posteriormente durante varias generaciones bajo condiciones libres de suero y de proteína. Se sometió a prueba la productividad de las células en varios momentos en el tiempo en un medio libre de suero y proteína mediante inmunofluorescencia
25 con anticuerpos marcados anti-vWF. La evaluación de la estabilidad de las células tuvo lugar en la etapa del banco de células de trabajo y después de 10 y 60 generaciones en un medio libre de suero y proteína. Se identificó aproximadamente el 100% de las células como clones positivos estables que expresan el rvWF en la etapa del banco de células de trabajo, después de 10 generaciones y 60
30 generaciones.

Ejemplo 3: Productividad celular específica de los clones celulares recombinantes

Se retiró un número determinado de células en diversas etapas durante el cultivo de las células recombinantes, y éstas fueron incubadas durante 24 horas con un
35 medio fresco. Se determinó la rvWF: Actividad Risto-CoF en las aguas

sobrenadantes de los cultivos celulares. La Tabla 1 muestra que, en el caso de clones celulares recombinantes estables de acuerdo con la invención, la productividad celular específica era estable aun después de 60 generaciones en un medio libre de suero y proteína e incluso había aumentado en comparación con el clon original que había sido cultivado en un medio que contenía suero.

Tabla 1

Clon Celular	Productividad celular específica de las células de trabajo en mU de rvWF/10 ⁶ células/día	Productividad celular específica después de 10 generaciones en mU rvWF/10 ⁶ células/día	Productividad celular específica después de 60 generaciones en mU de rvWF/10 ⁶ células día
Clon celular original rvWF-CHO#808.68	55	30	<10
Clon estable r-vWF-CHO F7 ^{*)}	62	65	60

*) Presentado el 22 de enero de 1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 6OJG, UK); número de depósito 98012206).

Ejemplo 4: Composición de un medio sintético libre de suero y proteína

10

Tabla 2

Componente	g/l	Cantidad preferente (según nuestros conocimientos en el momento de la solicitud de patente) en g/l
Medio sintético mínimo (F12 de DMEM/HAM)	1-100	11,00-12,00
Peptona de soja	0,5-50	2,5
L-glutamina	0,05-1	0,36
Ácido ascórbico	0,0005-0,05	0,0035
NaHCO ₃	0,1-10	2,00
Etanolamina	0,0005-0,05	0,0015
Selenito sódico	1-15 µg/l	8,6 µg/l
Opcionalmente: Synperonic F68	0,01-10	0,25

Ejemplo 5: Cultivo de células rFVIII-CHO en un medio libre de proteína y suero

Se realizó un cultivo celular que contenía células rFVIII-CHO en un recipiente de 10 l con perfusión y bajo agitación. En este caso, se utilizó un medio según el Ejemplo 4. Así, las células fueron inmovilizadas en un microsoporte poroso (Cytopore®, Pharmacia) y luego se cultivaron durante al menos 6 semanas. La velocidad de perfusión fue de 4 volúmenes al día; el pH era de 6,9-7,2; la concentración de O₂ era aproximadamente del 20-50% y la temperatura de 37°C.

La Figura 1 muestra los resultados del cultivo de un clon celular rFVIII-CHO en un biorreactor de perfusión de 10 l.

- a) Actividad del Factor VIII (miliunidades/ml) y velocidad de perfusión (1-5/día) durante un período de 42 días.
- b) Productividad volumétrica (unidades de Factor VIII/l/día) en el biorreactor de perfusión.

Tabla 3

Días de cultivo	Productividad celular específica (mU/10 ⁶ células/día)	Inmunofluorescencia (% de células positivas de FVIII)
15	702	n.a.
21	1.125	n.a.
28	951	>95%
35	691	>95%
42	970	n.a.

La Tabla 3 muestra la estabilidad y productividad específica de las células de expresión de rFVIII. Para obtener estos resultados, se tomaron muestras a los 15, 21, 28, 35 y 42 días y luego se centrifugaron a 300 g y se volvieron a suspender en un medio fresco libre de suero y proteína. La concentración de Factor VIII en las aguas de sobrenadante de los cultivos celulares, así como el recuento celular fueron determinados después de otras 24 horas. Se calculó la productividad específica de FVIII a partir de estos datos.

Se consiguió una productividad media estable de 888 miliunidades/10⁶ células/día. Esta productividad estable también fue confirmada por inmunofluorescencia con anticuerpos marcados anti-FVIII a los 15, 21, 28, 35 y 42 días en un medio libre de suero y proteína.

Ejemplo 6: Comparación de la productividad de las células recombinantes FVIII-CHO en un medio libre de proteína y suero que contiene otros componentes en dicho medio

Se realizó un cultivo celular que contenía células rFVIII-CHO por lotes. En este caso, se hizo uso de un medio según el Ejemplo 4 al cual se habían añadido los siguientes aminoácidos:

Tabla 4

Aminoácido	mg/l	Cantidad preferente (según nuestros conocimientos en el momento de la solicitud de patente) en mg/l
L-Asparagina	1-100	20
L-Cisteína·HCl·H ₂ O	1-100	15
L-Cistina	1-100	20
L-Prolina	1-150	35
L-Glutamina	50-1.000	240

5

Se reprodujeron las células a 37°C y pH 6,9-7, 2. Se reprodujeron las células mediante un proceso por lotes durante períodos de 24-72 horas.

Se midió la productividad de las células recombinantes FVIII-CHO en las siguientes composiciones del medio:

10

Mezcla 1: comprende un medio libre de suero y proteína sin peptona de soja y contiene adicionalmente una mezcla de aminoácidos según la Tabla anterior.

15

Mezcla 2: comprende un medio libre de suero y proteína que contiene peptona de soja.

Mezcla 3: comprende un medio libre de suero y proteína que contiene peptona de soja y que contiene adicionalmente una mezcla de aminoácidos según la Tabla anterior.

20

Mezcla 4: comprende un medio libre de suero y proteína y contiene adicionalmente una mezcla de aminoácidos según la Tabla anterior, así como 2, 5 g/l de peptona de soja purificada y ultrafiltrada. La purificación de la peptona de soja ultrafiltrada tuvo lugar por cromatografía en columna Sephadex®.

25 **Ejemplo 7: Cultivo de células recombinantes FVIII-CHO en un medio libre de proteína y suero utilizando el método de cultivo quimiostático**

Se procedió a un cultivo celular que contenía células rFVIII-CHO en un recipiente biorreactor de 10 l bajo agitación. En este caso, se hizo uso de un medio según el

Ejemplo 4 sin peptona de soja, que contenía una mezcla de aminoácidos según el Ejemplo 6. Se reprodujeron las células a 37°C y pH 6,9-7,2; la concentración de oxígeno en saturación de aire era del 20-50%. Se tomaron las muestras cada 24 horas para determinar la valoración del Factor VIII y la concentración celular en el agua sobrenadante del cultivo. La concentración celular total era constante desde el 2º día hasta el 14º día. Se añadió al medio la peptona de soja ultrafiltrada a partir del 6º día. Se ilustra en 3 la productividad del Factor VIII; las mediciones se realizaron mediante un sistema CHROMOGENIX CoA FVIII:C/4. Se llevó a cabo una inmunofluorescencia con anticuerpos marcados anti-FVIII. A partir de los datos se puede observar que tuvo lugar un incremento distinto en la productividad del Factor VIII, y por tanto un incremento en la productividad volumétrica del sistema de biorreactor, como consecuencia de la adición de peptona de soja, con la cual no se obtuvo un incremento distinto en el crecimiento celular. La ausencia de peptona de soja en el cultivo continuo conduce a una disminución distinta en la productividad del Factor VIII después de unos días, mientras que la adición de peptona de soja conduce, como consecuencia, a un incremento de casi 10 veces en la productividad. Sin embargo, como esta adición no incrementa el recuento celular, se demuestra así claramente que la peptona de soja ultrafiltrada conduce, como consecuencia, a un incremento distinto en la productividad que es independiente del crecimiento celular.

Ejemplo 8: Comparación de la velocidad de crecimiento y la productividad de las células recombinantes FVIII-CHO en un medio libre de proteína y suero que contiene distintos hidrolizados

Se procedió a cultivar células rFVIII-CHO en procedimiento por lotes. En este caso, se hizo uso de un medio libre de suero y proteína tal como se describe en el Ejemplo 4 al cual se habían añadido distintos hidrolizados (procedentes de soja, levadura, arroz y trigo). Como control se utilizó un medio libre de suero y proteína al cual no se había añadido el hidrolizado.

La densidad celular inicial fue de $0,6 \times 10^5$ y $0,4 \times 10^6$, respectivamente. Se cultivaron las células a 37°C utilizando el proceso por lotes a pH 6,9-7,2.

La Tabla 5 muestra los resultados de los experimentos de cultivo con células rFVIII-CHO en un medio libre de suero y proteína al cual se había añadido hidrolizado de soja (ultrafiltrado) e hidrolizado de levadura. La densidad celular inicial fue de $0,6 \times 10^5$ células. Se utilizó como control un medio libre de suero y proteína sin hidrolizado.

Tabla 5

Hidrolizado	Densidad celular final ($\times 10^6$ /ml)	Titulación FVIII (mU/ml)	Actividad coagulante de FVIII (mU/ml)
Soja	3,6	485	508
Levadura	3,3	226	230

La Tabla 6 muestra los resultados de los experimentos de cultivo con células rFVIII-CHO en un medio libre de suero y proteína al cual se habían añadido hidrolizado de soja (ultrafiltrado), hidrolizado de arroz e hidrolizado de trigo. La densidad celular inicial fue de $0,6 \times 10^5$ células. Se utilizó como control un medio libre de suero y exento de proteína sin hidrolizados.

Tabla 6

Hidrolizado	Densidad celular final ($\times 10^6$ /ml)	Titulación FVIII (mU/ml)	vWF-Antígeno (μ g/ml)
Soja	3,7	1.142	6,7
Arroz	3,0	479	3,2
Trigo	3,4	522	3,9
Control	3,0	406	3,1

La Tabla 7 muestra los resultados de los experimentos de cultivo con células rFVIII-CHO en un medio libre de suero y proteína al cual se habían añadido hidrolizado de soja (ultrafiltrado) e hidrolizado de trigo. La densidad celular inicial ascendía a $0,4 \times 10^6$ células.

Tabla 7

Hidrolizado	Densidad celular final ($\times 10^6$ /ml)	Titulación FVIII mU/ml)	Antígeno FVIII (μ g/ml)	Antígeno VWF (μ g/ml)
Soja	1,6	1.427	1	17,2
Trigo	1,0	1.120	9	7,9

15 **Ejemplo 9 (ejemplo de referencia): Cultivo de células BHK en un medio libre de proteína y suero que contiene hidrolizado de soja**

Se cotransfectaron tres veces células BHK-21 (ATCC CCL 10) con los siguientes plásmidos por medio de un procedimiento CaPO₄: 25 μ g del plásmido pSV-FII (Fischer, B. y col., J. Biol. Chem., 1996, Vol. 271, pp. 23737-23742) que contiene el cADN Factor II (protrombina) humano bajo el control de un promotor SV40

(promotor genético temprano SV40); 4 µg del plásmido pSV-DHFR para la resistencia al metotrexato y 1 µg del plásmido pUCSV-neo (Schlokot, U. y col., Biotech. Appl. Biochem., 1996, Vol. 24, pp. 257-267) que media la resistencia a G418/neomicina. Se seleccionaron los clones celulares estables por medio del
5 cultivo en un medio que contenía 500 µg/ml de G418 incrementando la concentración de metotrexato de forma progresiva hasta 3 µM.

Los clones obtenidos de esta forma fueron subclonados y adaptados a un medio libre de proteína y suero. El cultivo tuvo lugar utilizando la técnica de cultivo en suspensión.

10 Se pueden ver los resultados en la Tabla 6; las células BHK que se reprodujeron en el medio libre de proteína y suero que contenía hidrolizado de soja mostraban una velocidad alta y estable de producción de Factor II recombinante.

Reivindicaciones

1. Proceso para la producción de factor VIII recombinante a partir de un cultivo celular, que comprende:

5 introducir células de mamífero que contienen secuencias que codifican para factor VIII recombinante en un medio libre de proteína y de suero que contiene hidrolizado de soja ultrafiltrado, donde al menos el 40% de dicho hidrolizado de soja tiene un peso molecular \leq 500 dalton; expresando dichas células el citado factor VIII recombinante;

10 hacer crecer dichas células en dicho medio y expresar dicho factor VIII recombinante, produciendo así una mezcla de tales células y dicho factor recombinante VIII en el medio;

purificar dicho factor VIII recombinante de la citada mezcla.

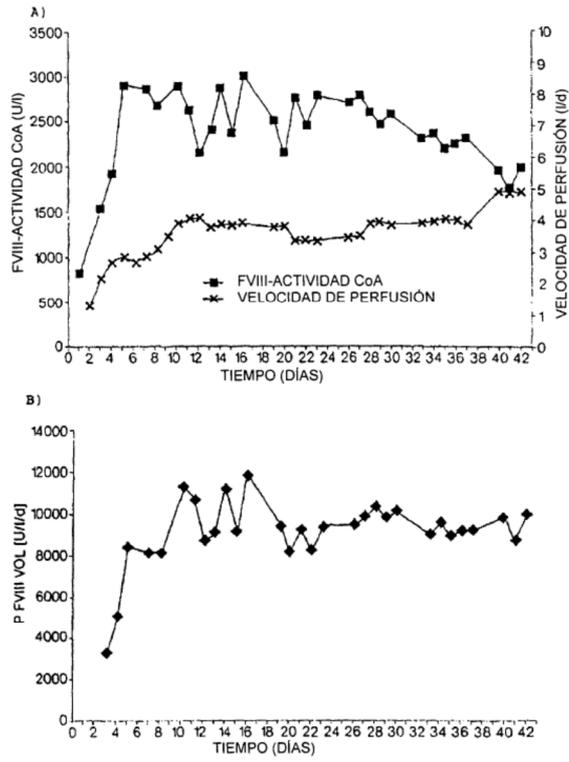


FIGURA 1

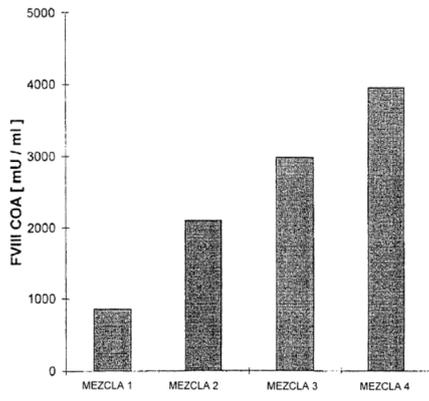


FIGURA 2

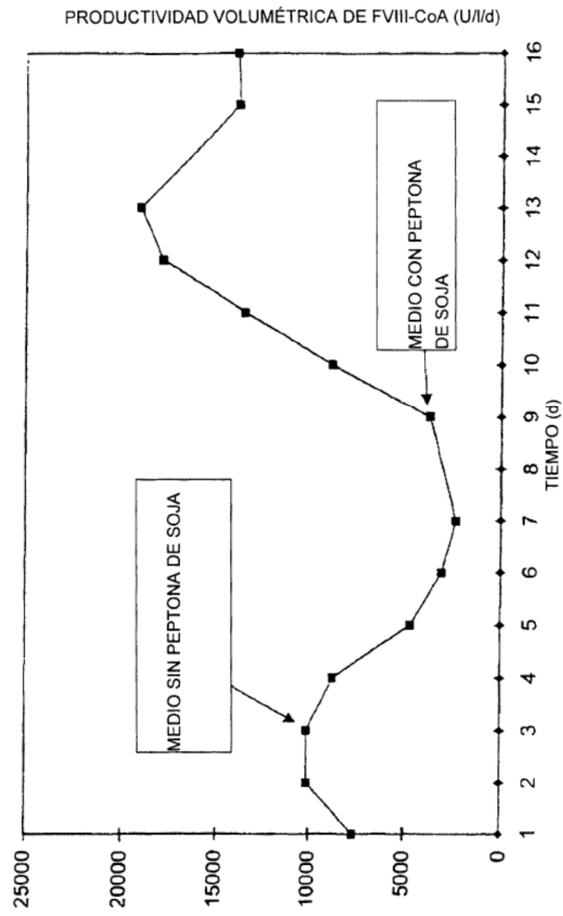


FIGURA 3

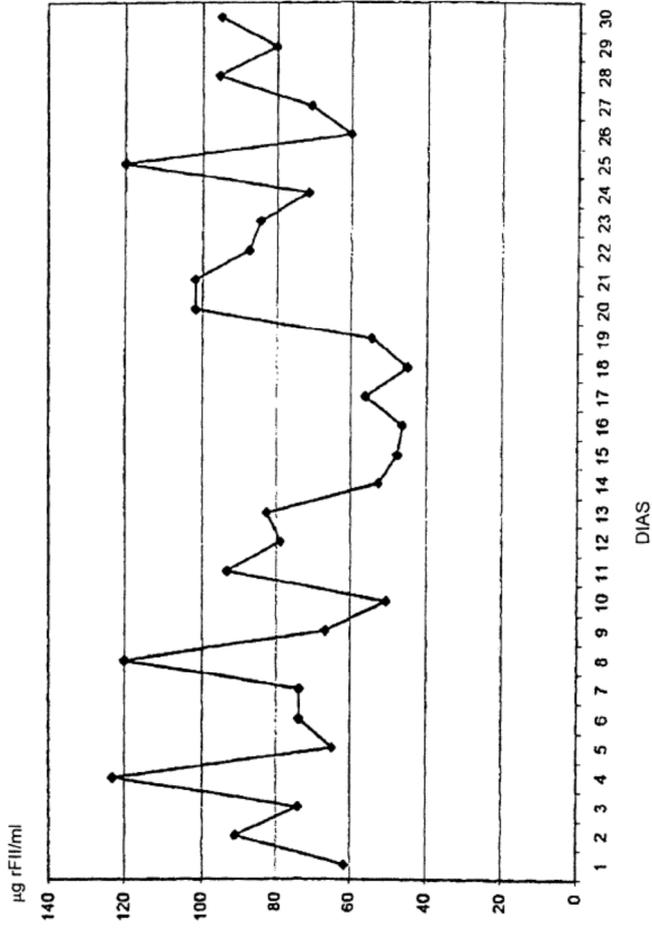


FIGURA 4