



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 049**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03757654 .3**
96 Fecha de presentación : **22.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1564285**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Procedimiento para obtener líneas celulares recombinantes de mieloma de mamífero adaptadas al crecimiento en medios sin suero ni proteínas.**

30 Prioridad: **23.10.2002 CU 2392002**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2011

73 Titular/es:
CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR
Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa
12100 Ciudad Habana, CU

72 Inventor/es: **Pérez Rodríguez, Rolando;**
Castillo Vitloch, Adolfo;
Vitores Sarazola, Svieta;
Boggiano Ayo, Tammy y
Rojas del Calvo, Luis

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener líneas celulares recombinantes de mieloma de mamífero adaptadas al crecimiento en medios sin suero ni proteínas

Campo de la invención.

[0001] La presente invención se refiere a la biotecnología, específicamente a un procedimiento de obtención de clones celulares estables adaptados a un medio sin suero ni proteínas en un proceso de adaptación en dos etapas.

Antecedentes de la invención.

[0002] Desde el desarrollo del cultivo *in vitro* de células de mamíferos, la demanda de la producción de estas células a gran escala ha aumentado debido al potencial de diagnóstico y terapéutico de muchos de los productos obtenidos. Estos agentes útiles incluyen anticuerpos monoclonales, la hormona del crecimiento humana, linfocinas, eritropoyetina, factores de coagulación sanguínea y activadores del plasminógeno tisular.

[0003] En muchos casos, el uso de anticuerpos monoclonales recombinantes (rMab) para el tratamiento y el diagnóstico *in vivo* de distintas enfermedades implica el uso de altas dosis. Este hecho hace necesaria la producción de una gran cantidad del rMab de interés con una gran pureza.

[0004] Varios anticuerpos monoclonales de uso potencial en el tratamiento y diagnóstico del cáncer y de enfermedades autoinmunitarias se han expresado en células de mieloma NSO en el Centro de Inmunología Molecular. El documento US 5.891.996 describe la obtención de los anticuerpos quiméricos y humanizados dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) útiles para el diagnóstico y el tratamiento de tumores que expresan dicho receptor. El documento WO 97/19111 describe anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD6 útiles para el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con psoriasis. Gavilondo y col., describieron en Hybridoma 9, n° 5, 1999, un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD3, denominado IOR-T3a.

[0005] Se han desarrollado diversas técnicas para condiciones de cultivo en ausencia de proteínas. De este modo, definido específicamente, se han desarrollado medios completos sin proteínas que permiten el crecimiento celular en condiciones de ausencia de proteínas. El documento WO 97/05240 describe la expresión de proteínas recombinantes en condiciones de ausencia de proteínas.

[0006] El documento JP 2696001 describe el uso de un medio sin proteínas para la producción del factor VIII en células CHO mediante la adición de un agente tensioactivo no iónico o ciclodextrina para aumentar la productividad de las células huésped. Para aumentar la efectividad de estos aditivos se recomienda la adición de butirato y litio, por ejemplo.

[0007] El documento WO 96/26266 describe el cultivo de células en un medio que contiene un hidrolizado de proteínas con glutamina, cuyo contenido de aminoácidos libres es inferior al 15% del peso total de la proteína y cuyos péptidos tienen un peso molecular inferior a 44 kDa. Como medio de cultivo para los cultivos celulares se usa un medio mínimo sintético como medio base al que se añaden, entre otros, suero bovino fetal, gentamicina y mercaptoetanol, además del hidrolizado de proteínas. No se ha mencionado el uso de este medio que contiene suero para la producción recombinante de factores sanguíneos.

[0008] La patente de los EE. UU. n° 5.393.668 A describe superficies sintéticas especiales que permiten el crecimiento de células adherentes en condiciones de ausencia de proteínas.

[0009] Para estimular la proliferación celular se han multiplicado células CHO que sobreexpresan la insulina humana en un sustrato artificial al que la insulina se une covalentemente (Ito y col. 1996, PNAS U.S.A. 93: 3598-3601).

[0010] Reiter y col. (1992, Cytotechnology 9: 247-253) describen la inmovilización de células r-CHO crecidas primeramente a alta densidad sobre vehículos en un medio con suero y la subsiguiente perfusión de las células inmovilizadas en un medio sin proteínas durante la fase de producción, en lo que se encontró una liberación continua de proteína en el sobrenadante del cultivo celular. En ese caso las células se mantuvieron durante menos de 10 generaciones en el medio sin proteínas.

[0011] Los procedimientos anteriores para la preparación satisfactoria de un cultivo celular a gran escala en condiciones de ausencia de proteínas han sido descritos para líneas celulares continuas; en particular, las células VERO (documento WO 96/15231). En este caso, las células se cultivan en condiciones de ausencia de suero y proteínas a partir de la ampolla original hasta una gran escala técnica de 1.200 litros.

[0012] La adaptación de las células crecidas inicialmente en condiciones de presencia de suero a un medio sin proteínas es un proceso bastante problemático que normalmente requiere largo tiempo; además, se ha encontrado repetidamente que el rendimiento de la proteína expresada y la productividad de las células CHO recombinantes disminuye en gran medida después de la adaptación en un medio sin proteínas, en comparación con las condiciones de presencia de suero (Paterson y col., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 691-658). Esto es consecuencia de una inestabilidad o de un crecimiento reducido de los clones recombinantes debido al cambio en las condiciones de cultivo. A pesar del uso de un clon original estable, a causa de la alteración de las condiciones de fermentación, repetidamente una gran parte de las células pasan a ser células con expresión reducida o también no productoras, que superan en crecimiento a las productoras de producto durante el proceso de producción, con lo que finalmente el cultivo del fermentador consta fundamentalmente de células no productoras o de células con una expresión baja.

[0013] En la presente invención hemos establecido una estrategia para desarrollar líneas celulares estables adaptadas a medios sin suero ni proteínas. Siguiendo esta estrategia se han aislado varios clones en un medio sin proteínas.

Descripción detallada de la invención:

Adaptación de las líneas celulares a un medio sin proteínas en dos etapas.

[0014] Este procedimiento comprende líneas celulares recombinantes de mieloma de mamífero, para las que no es posible llevar a cabo un procedimiento de adaptación directo desde un medio suplementado con suero o sin suero a un medio sin proteínas.

[0015] El procedimiento de la presente invención consta de un proceso en dos etapas durante la adaptación de líneas celulares a un medio sin proteínas (PFM).

[0016] La primera etapa, que se considera una etapa no crítica: la reducción del contenido de proteína tiene lugar sin pérdidas de la viabilidad celular y no se produce una disminución importante del tiempo de duplicación de la población en cada paso de concentración de proteína. La etapa no crítica se observa habitualmente para una concentración de proteína total en el medio de cultivo entre 5 y 0,5 mg/ml y el cultivo muestra prácticamente la misma velocidad de crecimiento que en el medio de cultivo inicial.

[0017] Esta primera etapa comienza con una viabilidad de la línea celular entre el 80 y el 100% y las células se crecen en medios de cultivo con una reducción consecutiva de la concentración de proteína hasta una concentración de proteína crítica a la que la viabilidad celular decae hasta el 0%. Esta concentración de proteína es el punto inicial de la etapa siguiente.

[0018] La segunda etapa, que se considera la etapa crítica: en esta etapa se produce una disminución de la viabilidad celular y del tiempo de duplicación de la población de las células y se necesitará más tiempo para la adaptación desde un paso de concentración de proteína a otro. Existen concentraciones de proteína críticas en el medio de cultivo que no es posible evitar durante el proceso de adaptación. Estas concentraciones de proteína críticas son específicas para cada línea celular recombinante, pero habitualmente están por debajo de 0,6 mg/ml. Una vez que las células han recuperado la viabilidad y la velocidad de crecimiento iniciales a estas concentraciones de proteína críticas es posible llevar a cabo el subcultivo a la condición siguiente con menor concentración de proteína.

[0019] Después que se ha fijado la concentración de proteína crítica, la concentración superior más próxima que permite el crecimiento celular se considera como la concentración de proteína precrítica. A partir de la concentración precrítica, la concentración de proteína se reduce lentamente hasta que las células recuperan la viabilidad y la velocidad de crecimiento iniciales.

[0020] La combinación seleccionada de pasos para reducir la concentración de proteína en la etapa crítica

determinará el tiempo de adaptación total en esta etapa y la velocidad de adaptación ($V_{\text{adapt.}}$), calculada como la relación:

$$V_{\text{adapt.}} = \frac{\Delta \text{Concentración de proteína}}{\Delta T_{\text{adapt.}}}$$

5

[0021] Sin embargo, esta combinación de pasos no tendrá influencia sobre el tiempo necesario para la adaptación a cada concentración de proteína, incluyendo las concentraciones críticas.

10 **[0022]** Para determinar el final de la etapa no crítica y las concentraciones de proteína críticas es necesario llevar a cabo una adaptación por pasos, mediante diluciones seriadas del cultivo celular en el medio sin proteínas deseado, reduciendo la concentración de proteína cada vez a la mitad (tabla 1). Esta reducción puede realizarse mediante la disminución de la concentración de suero o suplementando el medio base con concentraciones diferentes de algún sustitutivo de suero rico en proteínas.

15 Tabla 1: Reducción por pasos de la concentración de proteína para determinar las concentraciones críticas a partir de un medio de cultivo suplementado con 5 mg/ml de proteína (equivalente a suero bovino fetal al 10%).

Número de paso	Concentración de proteína total mg/ml	Equivalente de concentración de FBS*, % v/v
1	5,000	10,00
2	2,500	5,00
3	1,250	2,50
4	0,625	1,25
5	0,312	0,60
6	0,156	0,30
7	0,000	0,00
Leyenda: FBS – suero bovino fetal PFM – medio sin proteínas SCM – medio con suero * Se considera que el contenido total de proteínas del suero bovino fetal es aproximadamente de 50 mg/ml.		

[0023] Antes de comenzar el procedimiento de adaptación, las células deberán mantenerse con una viabilidad superior al 80% en frascos T en el medio estándar empleado habitualmente para cultivar las células.

20

[0024] El proceso de adaptación se lleva a cabo paso a paso siguiendo las etapas descritas a continuación.

i. Siembra de tres pocillos en la placa de cultivo de seis pocillos con la línea celular recombinante de mieloma de mamífero en el medio de cultivo celular estándar (con la concentración de proteína inicial). La densidad celular deberá estar en el intervalo de 1 a 5×10^5 células/ml. Después de 48 horas se sustituye la mitad del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 50% de la condición de partida.

25

ii. Cada 48 horas se sustituye completamente el sobrenadante por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 50% de la condición de partida.

30 iii. Las células se dejan crecer hasta confluencia en el medio con el 50% de la concentración inicial de proteína.

iv. Las células del paso iii se siembran en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de 1 a 5×10^5 células/ml en un medio de cultivo con una concentración de proteína que es el 50% de la condición de partida. Después de 48 horas se sustituye la mitad del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 50% de la condición anterior.

35

v. Cada 48 horas se sustituye completamente el sobrenadante por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 50% de la condición anterior.

vi. Las células se dejan crecer hasta confluencia en el medio con el 50% de la concentración de proteína anterior.

40 vii. Se repiten los pasos (iv) a (vi) y durante cada ciclo la concentración de proteína se reduce al 50% de la concentración del ciclo anterior. Este procedimiento se repite hasta alcanzar una concentración de proteína que causa la muerte celular.

viii. Se siembran células de un cultivo celular con una viabilidad del 80% o superior que crece en la concentración de proteína precrítica en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de 2 a 6×10^5

células/ml. Las células se crecen en la concentración de proteína precrítica y después de 48 horas se sustituye el 25% del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 75% de la concentración de proteína precrítica.

ix. Cada 48 horas se sustituye completamente el sobrenadante por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 75% de la concentración de proteína precrítica.

x. Las células se dejan crecer hasta confluencia en el medio con el 75% de la concentración de proteína precrítica.

xi. Una línea celular derivada del paso anterior se siembra en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de 2×10^5 a 6×10^5 en un medio que contiene el 75% de la concentración de proteína precrítica y después de 48 horas se sustituye el 25% del sobrenadante del cultivo por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 75% de la concentración anterior.

xii. Cada 48 horas se sustituye completamente el sobrenadante por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 75% de la concentración anterior.

xiii. Las células se dejan crecer hasta confluencia en el medio con el 75% de la concentración de proteína anterior.

xiv. Se repiten los pasos (xi) a (xiii), reduciendo la concentración de proteína en cada ciclo hasta el 75% de la concentración usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína tal que cuando las células se transfieren a una concentración inferior, crecen con una viabilidad y tiempo de duplicación similares a los originales, de modo que una disminución posterior de la concentración de proteína no afecta a la viabilidad ni al tiempo de duplicación.

[0025] En el procedimiento de la presente invención el medio de cultivo inicial contiene suero bovino fetal en el intervalo del 5 al 10%.

[0026] La línea celular recombinante de mamífero adaptada al crecimiento en un medio sin proteínas es un mieloma, en particular células NSO.

[0027] La presente invención podría ser útil también al usar una línea celular NSO transfectada con un polipéptido o una proteína recombinante, en particular cuando las células se transfectan con una secuencia que codifica un anticuerpo recombinante o fragmentos de este. Las líneas celulares recombinantes de mieloma de mamífero modificadas por el procedimiento de la presente invención que crecen en un medio sin proteínas también se dan a conocer.

[0028] En esta descripción se incluye, pero sin formar parte de la invención, cualquier línea celular recombinante de mieloma de mamífero que exprese un anticuerpo humanizado o quimérico seleccionado del grupo que consta de los anticuerpos hR3, dirigido contra el receptor de EGF, T1hT, dirigido contra CD6, T3Q, dirigido contra CD3, o fragmentos de estos y crezca en un medio sin proteínas y, por lo tanto, los anticuerpos segregados por estas líneas celulares.

[0029] Las líneas celulares obtenidas por el procedimiento de la presente invención crecen de manera estable en un medio sin proteínas durante al menos 40 generaciones.

Ejemplos:

Ejemplo 1: adaptación de la línea celular recombinante hR3 a un medio sin proteínas.

[0030] La línea recombinante hR3 se obtuvo por transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de vectores para expresar las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado hR3 dirigido contra el receptor de EGF.

[0031] La adaptación de esta línea celular al medio sin proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, mediante la reducción del contenido de proteína del medio en dos etapas.

[0032] Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%. El FBS se sustituyó por la adición del suplemento rico en proteína Nutridoma NS (Boehringer Mannheim) al medio RPMI-1640 sin proteínas cuando la concentración de proteínas alcanzó 0,15 mg/ml. La reducción del contenido de proteína en el medio inicial se realizó por diluciones sucesivas con el medio PFHM-II sin proteínas (Gibco).

[0033] Las figuras 1 y 2, respectivamente, muestran los resultados del cálculo de las concentraciones críticas

y las velocidades de adaptación V_{adapt} .

Ejemplo 2: adaptación de la línea recombinante T1hT a un medio sin proteínas.

5 [0034] La línea celular recombinante T1hT se obtuvo por transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de vectores que expresan las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD6 humano, humanizado por el procedimiento de supresión de epítomos T.

10 [0035] La adaptación de esta línea celular al medio sin proteínas se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2, por reducción del contenido de proteína del medio en dos etapas.

[0036] Estas células se cultivaron inicialmente en el medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%. La reducción del contenido de proteína se realizó por dilución sucesiva del medio inicial con el medio PFHM-II sin proteínas de Gibco. Los resultados del cálculo de las concentraciones críticas y las velocidades de adaptación V_{adapt} se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente.

Ejemplo 3: adaptación de la línea celular recombinante T3Q a un medio sin proteínas.

20 [0037] La línea celular recombinante T3Q se obtuvo por transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de vectores que expresan las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado T3Q que reconoce el receptor CD3 en linfocitos humanos.

[0038] La adaptación de esta línea celular al medio sin proteínas se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2, por reducción del contenido de proteína del medio en dos etapas.

25 [0039] Estas células se cultivaron inicialmente en el medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%. La reducción del contenido de proteína se realizó por dilución sucesiva en el medio PFHM-II sin proteínas de Gibco.

30 [0040] Los resultados del cálculo de las concentraciones críticas y de las velocidades de adaptación V_{adapt} se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente.

Breve descripción de las figuras:

35 [0041] **Figura 1:** correlación entre el tiempo necesario para adaptar las células hR3 a cada concentración de proteína (hasta recuperar la viabilidad y el tiempo de duplicación) y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína. Valores de las concentraciones críticas para la línea celular hR3: -0,32 y 0,11 mg/ml de concentración de proteína total.

40 **Figura 2:** correlación entre el tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína para la línea celular hR3. Valor de la velocidad de adaptación para la línea celular hR3 durante la etapa crítica -0,0053 mg/d.

45 **Figura 3:** correlación entre el tiempo necesario para adaptar las células T1hT a cada concentración de proteína (hasta recuperar la viabilidad y el tiempo de duplicación) y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína. Valores de las concentraciones críticas para la línea celular T1hT: -0,12 y 0,01 mg/ml de concentración de proteína total.

Figura 4: correlación entre el tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína para la línea celular T1hT. Valor de la velocidad de adaptación para la línea celular T1hT -0,0014 mg/d.

50 **Figura 5:** correlación entre el tiempo necesario para adaptar las células T3Q a cada concentración de proteína (hasta recuperar la viabilidad y el tiempo de duplicación) y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína. Valor de la concentración crítica para la línea celular T3Q: -0,63 mg/ml de concentración de proteína total.

Figura 6: correlación entre el tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación y el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteína para la línea celular T3Q. Valor de la velocidad de adaptación para la línea celular T3Q -0,0172 mg/d.

55

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener una línea celular recombinante de mieloma de mamífero adaptada al crecimiento en medios sin suero ni proteínas que comprende dos etapas:
 - I. Una primera etapa en la que la viabilidad de la línea celular está entre el 80 y el 100% y las células se crecen en medios de cultivo con una reducción consecutiva de la concentración de proteína hasta alcanzar una concentración de proteína crítica a la que la viabilidad celular decae hasta el 0%; y
 - II. Una segunda etapa en la que, una vez que se ha predeterminado la concentración crítica, la concentración precrítica se fija como una concentración de proteína tal a la que es posible el crecimiento celular y es el punto de partida para reducir lentamente la concentración de proteína hasta que el cultivo celular alcanza la viabilidad celular y el tiempo de duplicación de la población iniciales.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la primera etapa consta de los pasos siguientes:
 - i. La siembra de tres pocillos en la placa de cultivo de seis pocillos con la línea celular recombinante de mieloma de mamífero en el medio de cultivo celular estándar con la concentración de proteína inicial, en que la densidad celular está en el intervalo de $1 \text{ a } 5 \times 10^5$ células/ml y la sustitución, después de 48 horas, de la mitad del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 50% de la condición de partida.
 - ii. La sustitución completa del sobrenadante cada 48 horas por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 50% de la condición de partida.
 - iii. El crecimiento de las células hasta confluencia en el medio con el 50% de la concentración inicial de proteína.
 - iv. La siembra de las células del paso iii en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de $1 \text{ a } 5 \times 10^5$ células/ml en un medio de cultivo con una concentración de proteína que es el 50% de la condición de partida, en que después de 48 horas se sustituye la mitad del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 50% de la condición anterior.
 - v. La sustitución completa del sobrenadante cada 48 horas por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 50% de la condición anterior.
 - vi. El crecimiento de las células hasta confluencia en el medio con el 50% de la concentración de proteína anterior.
 - vii. La repetición de los pasos (iv) a (vi), en que durante cada ciclo la concentración de proteína se reduce al 50% de la concentración del ciclo anterior, hasta que se alcanza una concentración de proteína que causa la muerte celular.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la segunda etapa consta de los pasos siguientes:
 - viii. La siembra de células de mieloma de mamífero de un cultivo celular con una viabilidad del 80% o superior que crece en la concentración de proteína precrítica en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de $2 \text{ a } 6 \times 10^5$ células/ml, el crecimiento de las células en la concentración de proteína precrítica y, después de 48 horas, la sustitución del 25% del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 75% de la concentración de proteína precrítica.
 - ix. La sustitución completa del sobrenadante cada 48 horas por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 75% de la concentración de proteína precrítica.
 - x. El crecimiento de las células hasta confluencia en el medio con el 75% de la concentración de proteína precrítica.
 - xi. La siembra de una línea celular derivada del paso anterior en al menos tres pocillos a una densidad en el intervalo de $2 \text{ a } 6 \times 10^5$ en un medio que contiene el 75% de la concentración de proteína precrítica y después de 48 horas la sustitución del 25% del sobrenadante por medio fresco sin proteínas, lo que resulta en una concentración final de proteína que es el 75% de la concentración anterior.
 - xii. La sustitución completa del sobrenadante cada 48 horas por medio de cultivo fresco con una concentración de proteína que es el 75% de la concentración anterior.
 - xiii. El crecimiento de las células hasta confluencia en el medio con el 75% de la concentración de proteína anterior.
 - xiv. La repetición de los pasos (xi) a (xiii), reduciendo la concentración de proteína en cada ciclo al 75% de la concentración usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína tal que cuando las células se transfieren a una concentración inferior, crecen con una viabilidad y tiempo de duplicación similares a los originales, de modo que una disminución posterior de la concentración de proteína no afecta a la viabilidad ni al tiempo de duplicación.
4. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en que el medio que contiene suero y proteínas en

el que las células se siembran inicialmente comprende entre el 5 y el 10% de suero bovino fetal.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en que la línea celular recombinante de mieloma de mamífero es la línea celular NSO.

5

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en que dicha línea celular NSO contiene una secuencia que codifica un polipéptido recombinante o una proteína recombinante que codifica un anticuerpo recombinante o un fragmento de este.

10 7. El procedimiento según la reivindicación 6, en que dicha línea celular NSO contiene una secuencia que codifica el anticuerpo hR3 dirigido contra el receptor de EGF.

8. Uso del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 para obtener una línea celular de mieloma de mamífero adaptada al crecimiento en medios sin suero ni proteínas.

15

Figura 1: Correlación del tiempo necesario para adaptar las células hR3 a cada concentración de proteína

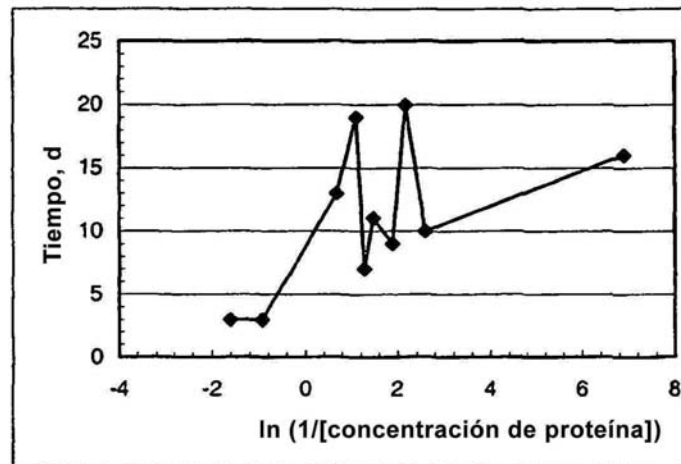


Figura 2: Correlación del tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación para la línea celular hR3

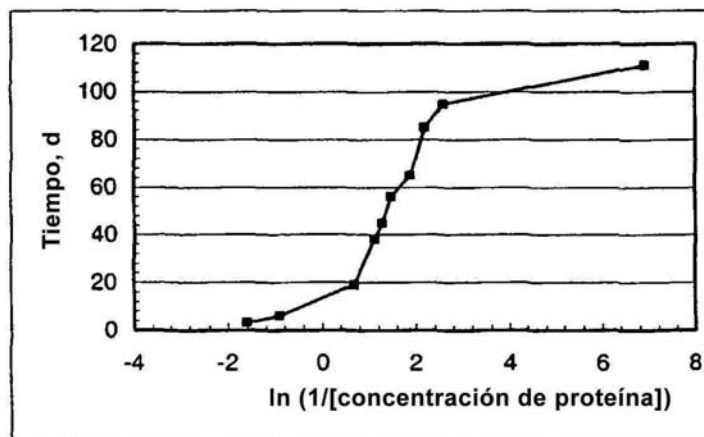


Figura 3: Correlación del tiempo necesario para adaptar las células T1hT a cada concentración de proteína

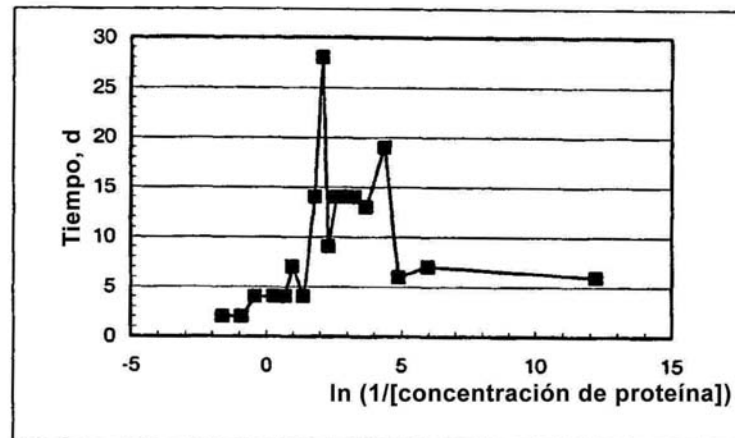


Figura 4: Correlación del tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación para la línea celular T1hT.

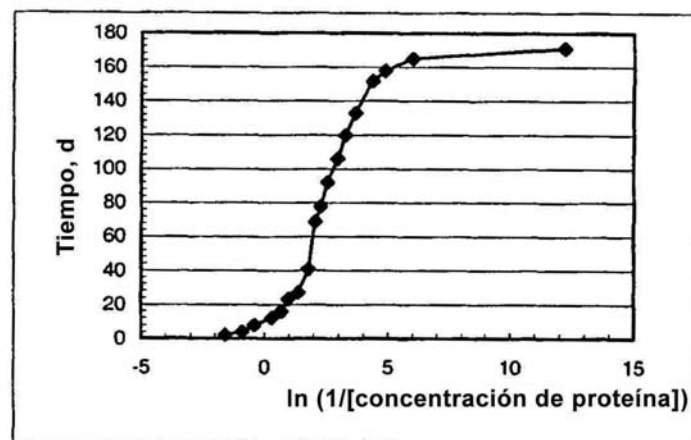


Figura 5: Correlación del tiempo necesario para adaptar las células T3Q a cada concentración de proteína

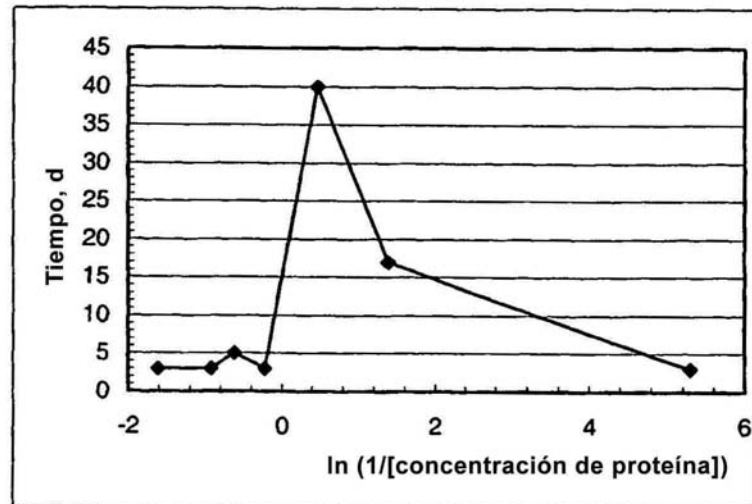


Figura 6: Correlación del tiempo total desde el comienzo del procedimiento de adaptación para la línea celular T3Q

