

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 846**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08749930 .7**  
96 Fecha de presentación: **30.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2144929**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Mejora de títulos de polipéptido de factor VIII en cultivos celulares**

30 Prioridad:  
**04.05.2007 EP 07107477**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2012**

73 Titular/es:  
**NOVO NORDISK A/S  
NOVO ALLÉ  
2880 BAGSVÅRD, DK**

72 Inventor/es:  
**JOHNSEN, Laust, Bruun;  
HILDEN, Ida;  
BOLT, Gert y  
STEENSTRUP, Thomas, Dock**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

**ES 2 379 846 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Mejora de títulos de polipéptido de factor VIII en cultivos celulares.

[0001] La presente invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de factor VIII el cual implica el uso del enlace del dominio C2, O-fosfo-L-serina (OPLS).

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno de sangrado hereditario. Es resultado de una deficiencia del factor VIII de coagulación sanguínea ligada al cromosoma X y afecta a los hombres casi de forma exclusiva, con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10,000. El defecto del cromosoma X es transmitido por portadores hembra, los cuales mismos no son hemofílicos. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia al sangrado aumentada. Antes de que se introdujera el tratamiento con concentrados de factor VIII, la esperanza de vida media de una persona con una hemofilia severa se estimaba inferior a 20 años. El uso de concentrados de factor VIII de plasma ha mejorado considerablemente la situación de los pacientes con hemofilia, prolongando con ello su esperanza de vida, dando a la mayoría de ellos la posibilidad de vivir una vida más o menos normal. No obstante, han habido ciertos problemas con los concentrados derivados de plasma y su uso, el más serio de los cuales ha sido la transmisión de virus. Hasta el momento, virus que causan SIDA, hepatitis B, y hepatitis no-A no-B han asestado un serio golpe a la población. Dado que se han ido desarrollando diferentes métodos de desactivación de virus y nuevos concentrados altamente purificados de factor VIII, lo cual establece un estándar de seguridad muy alto también para el factor VIII derivado de plasma.

[0003] El factor VIII (FVIII) se sabe que se expresa a niveles muy bajos en las células de mamífero. También se sabe que el factor VIII es una proteína inestable en medios libres de suero o libres de proteína. Se ha usado la adición de varias sustancias para mejorar la estabilidad y títulos del factor VIII.

[0004] El documento WO 9743436 divulga la adición de inhibidores de inhibidores dependientes de metal y/o quimiotripsinas.

[0005] El documento WO 88/08035 y el documento WO 87/04187 divulga la adición de fosfolípidos al medio de cultivo de factor VIII. También se describe la coexpresión del factor de von Willebrand (vWF).

[0006] El documento US 2005 0227913 A1 divulga OPLS como un inhibidor de agregación de factor VIII por unión al dominio C2 (2303-2332). El factor VIII menos agregado se reivindica como menos inmunogénico.

[0007] K. Hansen, M. Kjalke, P.B. Rasmussen, L. Kongerslev, y M. Ezban, Cytotechnol. 24 (3), 227-234, 1997, divulgan el uso de bacitracina A y de fosfatidilserina para prevenir la degradación del factor VIII en medio.

[0008] El documento WO 90/02175 A1 divulga procesos de producción de polipéptido(s) recombinantes mediante el cultivo de células eucariotas en presencia de inhibidores de proteasa para prevenir la degradación de los polipéptido(s).

[0009] El documento EP 1707634 A1 divulga que grandes cantidades de factor VIII se asocian con la superficie celular y pueden ser eliminados por el lavado con tampones de alta fuerza iónica.

[0010] Siendo esto así, todavía hay una necesidad de métodos de producción mejorados para mejorar el rendimiento general de los polipéptidos de factor VIII y/o reducir los costes de producción.

**RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

[0011] Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases de a) cultivo de una de célula expresando un polipéptido de factor VIII en condiciones para la expresión de dicho polipéptido de factor VIII, implicando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular comprendiendo O-fosfo-L-serina (OPLS), y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado a partir de la célula de mamífero mediante un medio adecuado.

[0012] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases a) cultivo de una célula de mamífero que expresa un polipéptido de factor VIII en condiciones para la expresión de dicho polipéptido de factor VIII, implicando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular, y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado de la célula de mamífero con medios adecuados, implicando dichos medios la adición de O-fosfo-L-serina (OPLS) a dichas células.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[0013]

Figura 1. Secuencia de gen del factor VIII (ADNc) (SEC ID n.º 1).

50 Figura 2A-B: efecto de la O-fosfo-L-serina en la productividad de FVIII y en la actividad específica de la

proteína FVIII.

Figura 3A-C. Efecto de la O-fosfo-L-serina y/o de un hidrolizado proteico de planta sobre en el factor VIII en el medio de células de producción de factor VIII. La tabla 4 muestra la identidad de las condiciones A-D.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 [0014] Como se ha mencionado anteriormente, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases a) cultivo de una célula de mamífero que expresa un polipéptido de factor VIII en condiciones de expresión para dicho polipéptido de factor VIII, implicando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular comprendiendo O-fosfo-L-serina (OPLS), y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado de la célula de mamífero mediante medios adecuados.
- 10 [0015] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases a) cultivo de una célula de mamífero que expresa un polipéptido de factor VIII en condiciones de expresión para dicho polipéptido de factor VIII, implicando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular, y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado de la célula de mamífero mediante medios adecuados, implicando dichos medios adecuados la adición de O-fosfo-L-serina (OPLS) a dichas células.
- 15 [0016] En ambos ejemplos, la OPLS desempeña un papel importante facilitando un aumento de los niveles de titulación del polipéptido de factor VIII en el medio de cultivo celular.
- [0017] Sin atenerse a ninguna teoría en particular, se cree que el aumento de los niveles de titulación de los polipéptidos de factor VIII en el medio de cultivo celular es ocasionado por el enlace de dominio C2 (en particular O-fosfo-L-serina (OPLS)) que, bien sola o en combinación con un inhibidor de tripsina de semilla de soja (SBTI) y/o un hidrolizado proteico de planta, bien (i) aumenta la cantidad de polipéptido de factor VIII secretada por las células, y/o (ii) compite polipéptido de factor VIII unido a la célula fuera de las células, y/o (iii) disminuye la degradación del polipéptido de factor VIII, aumentando con ello la cantidad de polipéptido funcional de factor VIII presente en el sobrenadante.
- 20 [0018] A continuación se describe la invención con más detalle.
- [0019] El enlace de dominio C2 es un enlace capaz de unirse a o ser unido al dominio C2 (ver abajo) del polipéptido de factor VIII. Preferiblemente, el enlace de dominio C2 debería ser capaz de desplazar (sin competir) al polipéptido de factor VIII de la membrana celular.
- 25 [0020] En la forma de realización actualmente más preferida, el enlace de dominio C2 es O-fosfo-L-serina (OPLS), es decir, una molécula de la fórmula  $(HO)_2 P(O)OCH_2CH(NH_2)CO_2H$ .
- [0021] Se cree que una alternativa adecuada para los enlaces de dominio C2 sería cualquiera con la fórmula  $(XO)(HO)P(O)OCH_2CH(NH_2)CO_2H$ , en la que se selecciona X se selecciona a partir de alquilo- $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido, de alqueno  $C_{2-6}$  opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicilo opcionalmente sustituido, y bencilo opcionalmente sustituido. En una forma de realización de la misma, X se selecciona de un alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido, de bencilo opcionalmente sustituido, y de alqueno  $C_{2-6}$  opcionalmente sustituido.
- 30 [0022] En el presente contexto, el término "alquilo  $C_{1-6}$ " denomina un grupo de hidrocarburos lineal, cíclico o ramificado con de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo.
- [0023] De forma similar, el término "alqueno  $C_{2-6}$ " se refiere a aquellos grupos de hidrocarburo lineales, cíclicos o ramificados con de 2 a 6 átomos de carbono y comprendiendo al menos un enlace insaturado. Ejemplos de grupos de alqueno son vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, y hexenilo. Ejemplos preferidos de alqueno son vinilo, alilo, butenilo, especialmente alilo.
- 40 [0024] En el presente contexto, es decir, en relación con los términos "alquilo" y "alqueno", el término "opcionalmente sustituido" significa que el grupo en cuestión puede ser sustituido una o varias veces, preferiblemente 1-3 veces, con grupo(s) seleccionados de hidroxilo (que cuando unidos a un átomo de carbono insaturado pueden estar presentes en la forma tautomérica), alcoxi  $C_{1-6}$  (es decir, alquil-oxi- $C_{1-6}$ ), alquenoiloxi  $C_{2-6}$ , carboxi, oxo (formando una funcionalidad de ceto o aldehído), alquilo carbonilo  $C_{1-6}$ , formil, arilo, ariloxi, arilamino, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi, heteroarilamino, heteroarilcarbonilo, heterocicilo, heterociciloxi, heterocicilamino, heterocicilcarbonilo, amino, mono- y di( $C_{1-6}$  alquilo)amino; carbamoilo, mono- y di( $C_{1-6}$  alquil)aminocarbonilo, amino- $C_{1-6}$  aminocarbonilo de alquilo, mono- y di( $C_{1-6}$ -alquil)amino- $C_{1-6}$  aminocarbonilo-alquilo,  $C_{1-6}$  alquilcarbonilamino, guanidino, carbamido,  $C_{1-6}$  sulfonil alquilo amino,  $C_{1-6}$  sulfonil-alquilo,  $C_{1-6}$  sulfonil alquilo,  $C_{1-6}$  alquiltio, halógeno, en el que cualquier arilo, heteroarilo y heterocicilo puede ser sustituido como se describe de forma específica a continuación por arilo, heteroarilo y heterocicilo.
- 50 [0025] El término "halógeno" incluye fluoro, cloro, bromo, y yodo.
- [0026] En el presente contexto, el término "arilo" denomina un anillo o sistema anular carbocíclico completa o parcialmente aromático, tal como el fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antracilo, fenantracilo, pirenilo, benzopirenilo, fluorenilo y xantenilo, entre los cuales el fenilo es un ejemplo preferido.

[0027] El término "heteroarilo" designa un anillo o un sistema anular carbocíclico completa o parcialmente aromático en el que uno o más de los átomos de carbono han sido sustituidos por heteroátomos, por ejemplo, nitrógeno (=N- o -NH-), azufre, y/o átomos de oxígeno. Ejemplos de tales grupos de heteroarilo son benzimidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, furilo, tienilo, quinolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoquinolilo, indolilo, en particular benzimidazolilo, pirrolilo, imidazolilo, piridinilo, pirimidinilo, furilo, tienilo, quinolilo, tetrazolilo, e isoquinolilo.

[0028] El término "heterociclilo" hace referencia a un anillo o sistema anular carbocíclico no-aromático en el que uno o más de los átomos de carbono han sido sustituidos por heteroátomos, por ejemplo, nitrógeno (=N- o -NH-), azufre, y/o átomos de oxígeno. Ejemplos de tales grupos heterociclicos (denominados según los anillos) son tetrahidrofurano, imidazolidina, piperazina, hexahidropiridazina, hexahidropirimidina, diazepano, pirrolidina, piperidina, azepano, oxazinano (morfolina), y tiazinano.

[0029] En el presente contexto, es decir, en relación con los términos, "arilo", "benzilo", "heteroarilo", "heterociclilo" y como (p. ej. "ariloxi" " heteroarilocarbonilo", etc.), el término "opcionalmente sustituido" se refiere a que el grupo en cuestión puede sustituirse una o varias veces, preferiblemente 1-5 veces, en particular 1-3 veces, con grupo(s) seleccionados de hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, oxo (que puede ser representado en la forma tautomérica enol), carboxi, carbonilalquilo C<sub>1-6</sub>, formil, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino; carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)aminocarbonil, aminoalquilaminocarbonilo C<sub>1-6</sub>, alquilcarbonilamino C<sub>1-6</sub>, guanidino, carbamido, aminosulfonilalquilo C<sub>1-6</sub>, arilo-sulfonilo-amino, heteroarilo-sulfonilo-amino, alquilo-sulfonilo C<sub>1-6</sub>, C<sub>1-6</sub> alquilo-sulfonilo, C<sub>1-6</sub> alquilo-sulfonilo, sulfanil, amino, amino sulfonil, mono- y di(C<sub>1-6</sub> alquilo)amino-sulfonil o halógeno, dónde cualquier alquilo, alcoxi y similares, sustituyentes representantes se pueden sustituir con hidroxilo, C<sub>1-6</sub> alcoxi, C<sub>2-6</sub> alquenoiloxi, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub> alquil)amino, carboxi, C<sub>1-6</sub>, alquil-carbonilamino halógeno, C<sub>1-6</sub> alquilitio, C<sub>1-6</sub> sulfonilo de alquilo-amino, o guanidino.

[0030] En las formas de realización más interesantes (pertenecientes tanto al primer como al segundo aspecto de la invención), el enlace de dominio C2 (p. ej. OPLS) está presente en el medio de cultivo celular en una concentración de 0.1-100 mM, tal como 5-30 mM, en particular 10-20 mM.

[0031] También son interesantes las formas de realización (pertenecientes tanto al primer como al segundo aspecto de la invención) en las que el enlace de dominio C2 se añade a las células en la fase b) en una concentración de 1-200 mM, tal como 50-150 mM, en particular 70-130 mM.

[0032] Los detalles de las fases de producción se tratarán con más detalle más adelante.

[0033] Dicho esto, se pone de manifiesto que una inhibición de tripsina de la semilla de soja (SBTI) puede combinarse ventajosamente con el enlace de dominio C2 en el medio de cultivo celular en la fase a). Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende además un inhibidor de tripsina de la semilla de soja.

[0034] El inhibidor de tripsina de soja se aísla de *Glicine max*. El inhibidor de tripsina de semilla de soja de semillas de soja es una proteína monomérica con 181 residuos de aminoácidos en una sola cadena polipeptídica reticulada por dos puentes disulfuros. El peso molecular determinado a partir de la secuencia de aminoácidos es 20.1 kDa. El inhibidor de tripsina de la semilla de soja inhibe su proteasa objetivo formando un complejo estequiométrico 1:1.

[0035] En las formas de realización más típicas, la concentración de inhibidor de tripsina de la semilla de soja en el medio de cultivo celular es de 0.01-100 mg/mL, tal como 0.1-10 mg/mL, en particular 0.3-3 mg/mL.

[0036] Se ha descubierto además, que un hidrolizado proteico vegetal (a veces denominado como "digerido de origen vegetal", o similar) puede combinarse ventajosamente con el enlace de dominio C2 (y posiblemente también el inhibidor de tripsina de semilla de soja) en el medio de cultivo celular en la fase a). Por lo tanto, en una forma de realización habitual igualmente preferida, el medio de cultivo celular comprende además hidrolizado proteico vegetal.

[0037] El hidrolizado proteico vegetal puede obtenerse a partir de varias fuentes, por ejemplo, de fuentes comerciales. Ejemplos típicos de hidrolizados son hidrolizado proteico de soja, hidrolizados de proteína de trigo, hidrolizado proteico de guisante, hidrolizado proteico de arroz, etc. El documento WO 01/23527 A1, que se incorpora aquí por referencia, divulga la preparación y uso general de un hidrolizado de proteína de soja.

[0038] En las formas de realización más típicas, la concentración de hidrolizado de proteína vegetal en el medio de cultivo celular es de 0.1- 100 mg/mL, tal como 1-10 mg/mL, en particular 2-7 mg/mL.

#### *Polipéptido de factor VIII*

[0039] La invención está adaptada para la producción de un polipéptido de factor VIII en una célula de mamífero.

[0040] La molécula de factor VIII consiste en 2332 aminoácidos que se pueden agrupar en tres dominios A homólogos, dos dominios C homólogos y un dominio B que están dispuestos en el orden: A1-A2-B-A3-C1-C2. Durante su secreción en plasma, el factor VIII se procesa intracelularmente en una serie de heterodímeros ligados por iones de metal ya que el factor VIII de cadena única está partido en el enlace B-A3 y en diferentes sitios del dominio B. Este tratamiento conduce a una cadena pesada formada por el dominio A1, el A2 y varias partes del B y cuyo tamaño molecular varía de

90 kDa a 200 kDa. Las cadenas pesadas están enlazadas a la cadena ligera mediante un ión metálico, que consiste en los dominios A3, C1 y C2 (Saenko et al. 2002). En el plasma está el factor VIII heterodimérico que se enlaza con alta afinidad al factor de von Willebrand, que lo protege de un catabolismo prematuro. La vida media de factor VIII no activado enlazado con vWF en plasma, es de aproximadamente 12 horas.

5 [0041] Durante el proceso de coagulación de la sangre, se activa el factor VIII vía escisión proteolítica por FXa y trombina en aminoácidos Arg372 y Arg740 en la cadena pesada y en Arg1689 en la cadena ligera, dando como resultado la liberación del factor de von Willebrand y generando el heterotrímero factor VIII activado que formará el complejo tenasa en las superficies de fosfolípidos con FIXa y FX siempre que esté presente  $Ca^{2+}$ . El heterotrímero  
10 consiste en el dominio A1, un fragmento de 50 kDa, el dominio A2 un fragmento de 43 kDa y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. Así, la forma activa de factor VIII (factor VIIIa) consiste en un subunidad A1 asociada a través del enlace de ión metálico divalente con una cadena ligera A3-C1-C2 escindida de trombina y una subunidad A2 asociada relativamente suelta con los dominios A1 y A3.

[0042] Una molécula de factor VIII que consiste en la cadena pesada (CP) y en la cadena ligera (CL) de factor VIII conectada con un enlazador pequeño derivado del dominio B (factor VIII eliminado del dominio B o BDD-FVIII) retiene la  
15 actividad biológica de la longitud total (nativa) del factor VIII.

[0043] En la práctica del método de la presente invención, puede ser relevante cualquier polipéptido de factor VIII que sea útil terapéuticamente, por ejemplo, eficaz en la prevención o el tratamiento del sangrado. Esto incluye, sin restricciones, factor VIII humano de tipo salvaje, factor VIII híbrido humano/porcino y factor VIII humano con dominio B eliminado.

20 [0044] Como se utiliza en este caso, "polipéptido de factor VIII" abarca, sin límites, factor VIII, al igual que polipéptidos relacionados con el factor VIII.

[0045] El término "factor VIII" pretende abarcar, sin límites, polipéptidos con la secuencia de aminoácidos descrita en Toole et al., Nature 1984, 312: 342-347 (*wild-type human factor VIII*), así como factor VIII de tipo salvaje derivado de  
25 otras especies, tal como, por ejemplo, bovino, porcino, canino, murino, y factor VIII de salmón. Engloba además variaciones alélicas naturales del factor VIII que pueden existir y producirse a partir de un individuo a otro. Además, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones de postraducción podrán variar dependiendo de las células huésped elegidas y de la naturaleza del entorno celular huésped. El término "factor VIII" también pretende englobar polipéptidos de factor VIII en su forma no dividida (zimógena), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente para producir sus respectivas formas bioactivas, lo cual puede denominarse Factor VIIIa.

30 [0046] "polipéptidos relacionados con factor VIII" incluyen, sin limitación, polipéptidos de factor VIII que o bien han sido modificados químicamente con respecto al factor humano VIII (es decir, derivados de factor VIII) y/o que contienen una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos con respecto al factor VIII humano (es decir, variantes de factor VIII), y/o contienen secuencias de aminoácidos truncadas con respecto al factor VIII humano (es decir, fragmentos de factor VIII). Tales polipéptidos relacionados con el factor VIII pueden mostrar diferentes propiedades con respecto al  
35 factor VIII humano, incluyendo estabilidad, unión de fosfolípidos, actividad específica alterada y similares. El término "polipéptidos relacionados con factor VIII" pretende abarcar aquellos polipéptidos en forma no dividida (zimógena), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente para producir sus respectivas formas bioactivas, las cuales pueden designarse como "polipéptidos relacionados con el factor VIIIa" o "polipéptidos activados relacionados con factor VIII".

40 [0047] Como se utiliza en este caso, "polipéptidos relacionados con el factor VIII" engloban además, sin limitación, polipéptidos que muestran sustancialmente una actividad biológica igual o mejorada con respecto al factor VIII humano de tipo salvaje, así como polipéptidos, en los que la actividad biológica del factor VIII ha sido modificada o reducida sustancialmente con respecto a la actividad del factor VIII humano de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, factor VIII o factor VIIIa que ha sido químicamente modificado y variantes de factor VIII en las que se han  
45 introducido alteraciones de secuencias de aminoácidos específicas que modifican o desestabilizan la bioactividad del polipéptido.

[0048] Comprende además polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, polipéptidos con un terminal-N modificado incluyendo supresiones o adiciones de terminal N de aminoácidos, y/o polipéptidos que han sido modificados químicamente con respecto al factor VIII humano.

50 [0049] Los polipéptidos relacionados con el factor VIII, incluyendo variantes de factor VIII, ya sea exhibiendo sustancialmente la misma o una bioactividad mejorada que el factor VIII de tipo salvaje, o, alternativamente, exhibiendo una bioactividad reducida o modificada con respecto al factor VIII de tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de factor VIII de tipo salvaje por inserción, supresión, o sustitución de uno o más aminoácidos.

55 [0050] Los polipéptidos relacionados con el factor VIII así como sus variantes, comprenden todos aquellos que presentan al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente

100%, al menos aproximadamente 110%, al menos aproximadamente 120%, y al menos aproximadamente 130%, de la actividad específica de factor VIII de tipo salvaje que se ha producido en el mismo tipo de célula, cuando se evalúa en el ensayo de actividad del factor VIII, como se describe en la presente especificación.

- 5 [0051] Los polipéptidos relacionados con el factor VIII, incluyendo variantes, sustancialmente con la misma o mejorada actividad biológica con respecto al factor VIII de tipo salvaje, comprenden aquellos que muestran al menos aproximadamente 25%, así como aproximadamente 50%, al menos 75%, o al menos 90% de la actividad biológica específica de factor VIII humano de tipo salvaje que ha sido producida en el mismo tipo de célula cuando se evalúa en uno o más ensayos de actividad específicos de factor VIII como se describe a continuación en la presente descripción ("Materiales y métodos").
- 10 [0052] Los polipéptidos relacionados con el factor VIII, incluyendo variantes, con actividad biológica sustancialmente reducida con respecto al factor VIII de tipo salvaje, son aquellos que presentan al menos aproximadamente 25%, así como menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% de la actividad específica de factor VIII de tipo salvaje, que ha sido producida en el mismo tipo de célula cuando se evalúa en uno o más ensayos específicos de actividad de factor VIII como se describe a continuación en la presente descripción ("Materiales y métodos").
- 15 [0053] Ejemplos no limitativos de polipéptidos de factor VIII incluyen factor VIII derivado de plasma humano como se ha descrito, por ejemplo, en Fulcher et al.; Proc. Acad. Nat. Sci. EEUU 1982, 79:1648-1652, y Rotblat et al.; Biochemistry 1985, 24:4294-4300, y FVIII porcino derivado de plasma como se ha descrito, por ejemplo, en Fass et al.; Blood 1982, 59: 594-600 y Knutson et al.; Blood 1982, 59: 615-624. Ejemplos no limitativos de variaciones de secuencia de factor VIII se describen en, por ejemplo, Lollar et al.; Blood 2000, 95(2): 564-568 (*hybrid porcine/human FVIII polipeptids*) y Lollar et al.; Blood 2001, 97(1): 169-174.

- 20 [0054] La clonación del ADNc para el factor VIII (Wood, W.I., et al. (1984) Nature 312, 330- 336; Vehar, G.A., et al. (1984) Nature 312, 337-342) hizo posible la expresión recombinante del factor VIII conduciendo al desarrollo de diferentes productos de factor VIII recombinante, los cuales fueron aprobados por las autoridades reguladoras entre 1992 y 2003. La secuencia codificadora del factor VIII (ADNc) se muestra en la figura 1. El hecho de que el dominio central B de la cadena de polipéptidos del factor VIII situada entre aminoácidos Arg-740 y Glu-1649 no parece ser necesaria dado que una actividad biológica completa condujo además al desarrollo de un factor VIII con el dominio B eliminado. Véase también Kjalke M, Heding A, Talbo G, Persson E, Thomsen J y Ezban M (1995), "*Amino acid residues 721-729 are required for full Factor VIII activity*". Eur. J. Biochem: 234: 773- 779.

#### Paso a) - Transfección y cultivo de células

##### 30 Células

- [0055] La célula mamífera que expresa el polipéptido de factor VIII se selecciona típicamente de un grupo consistente en células mamíferas que expresan endógenamente el polipéptido de factor VIII y células mamíferas que han sido transfeccionadas con un gen para el polipéptido de factor VIII. En una forma de realización actualmente interesante de estas últimas, la célula mamífera ha sido transfeccionada con un vector de expresión comprendiendo una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de factor VIII y zonas de control de expresión operativamente ligadas a ella.

- 35 [0056] La expresión de las proteínas en células es bien conocida por el experto en la técnica de la producción proteica. En la práctica de la presente invención, las células son células mamíferas, más preferiblemente una línea celular concreta de mamífero, incluyendo, sin limitación, líneas celulares CHO (*p. ej.*, ATCC CCL 61), COS-1 (*p. ej.*, ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK), y HEK293 (*p. ej.*, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977).  
 40 HEK293 (*p. ej.*, ATCC CRL 1573 Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular preferida BHK es la línea celular tk<sup>-</sup> ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79:1106-1110, 1982), en adelante denominadas como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo el número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular tk<sup>-</sup> ts13 BHK también está disponible bajo número de acceso ATCC CRL 1632. Líneas celulares CHO preferidas son las líneas celulares CHO K1 disponibles del ATCC, bajo número de acceso CCL61, al igual que las líneas celulares CHO-DXB11 y CHO-DG44.

- 45 [0057] Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); células DUKX (línea celular CHO) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77:4216-4220, 1980) (las células DUKX se conocen también como células DXB11), y DG44 (línea celular CHO) (*Cell*, 33: 405, 1983, y *Cell and Somatic Cell and Molecular Genetics* 12: 555, 1986). También son útiles las células 3T3, las células Namalwa, los mielomas y las fusiones de mielomas con otras células. En algunas formas de realización, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tales como por ejemplo, células que expresan un espectro cualitativamente o cuantitativamente diferente de enzimas que catalizan la modificación postranslacional de las proteínas (*p. ej.*, enzimas de glicosilación tales como glicosil transferasas y/o las glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como propeptidos) que el tipo de célula del que provienen. Las células DUKX (línea celular CHO) son especialmente preferidas.

- [0058] Las células actualmente preferidas son las células HEK293, COS, células de ovario de hámster chino (CHO),

rión de cría de hámster (BHK) y las células de mieloma, en particular las células de ovario de hámster chino (CHO).

#### Cultivo celular

[0059] En algunas formas de realización, las células utilizadas en la práctica de la invención son capaces de crecer en cultivos en suspensión. Como se utiliza en este caso, las células competentes en suspensión son aquellas que pueden crecer en la suspensión sin hacer agregados grandes y firmes, es decir, células que están monodispersas o que crecen en agregados sueltos con sólo unas pocas células por agregado. Las células competentes en suspensión incluyen, sin limitación, células que crecen en suspensión sin adaptación o manipulación (tales como, por ejemplo, células hematopoyéticas o células linfoides) y células que se han hecho competentes en suspensión mediante una adaptación gradual de células dependientes de adhesión (tal como, por ejemplo, células epiteliales o fibroblásticas) a crecimiento de suspensión.

[0060] Las células utilizadas en la práctica de la invención pueden ser células de adhesión (también conocidas como células dependientes de anclaje o dependientes de fijación). Como se usa en este caso, las células de adhesión son aquellas que necesitan adherirse o anclarse ellas mismas a una superficie adecuada para la propagación y el crecimiento. En una forma de realización de la invención, las células utilizadas son células de adhesión. En estas formas de realización, ambas, las fases de propagación y la fase de producción incluyen el uso de microportadores. Las células de adhesión utilizadas deben ser capaces de migrar a los portadores (y al interior de la estructura de los portadores en caso de que se utilice un portador macroporoso) durante la fase(s) de propagación, y de migrar a nuevos portadores cuando sean transferidas al biorreactor de producción. Si las células de adhesión no son suficientemente capaces de migrar por ellas mismas a portadores nuevos, podrán ser liberadas de los portadores al poner en contacto microportadores con células con enzimas proteolíticas o con EDTA. El medio usado (particularmente cuando esta libre de componentes de derivados de animal) debería contener además componentes adecuados para dar soporte a células de adhesión; medios adecuados para el cultivo de células de adhesión están disponibles por proveedores comerciales, tal como, por ejemplo, Sigma.

[0061] Las células pueden ser además células adaptadas a suspensión o células competentes en suspensión. En caso de utilizarse tales células, la propagación de las células podrá realizarse en suspensión, de modo que solo se usen los microportadores en la fase de propagación final en el recipiente de producción de cultivo mismo y en la fase de producción. En el caso de las células adaptadas a suspensión, los microportadores utilizados son típicamente portadores macroporosos en los que las células están adheridas mediante una unión física en el interior de la estructura interna de los portadores. No obstante, en el caso de tales células adaptadas a suspensión, ambos, la propagación de células y la producción podrán realizarse en suspensión.

[0062] En tales formas de realización, la célula mamífera se selecciona típicamente de CHO, BHK, HEK293, células de mieloma, etc.

#### Medio de cultivo celular

[0063] Además de los componentes mencionados anteriormente, es decir, la O-fosfo-L-serina, la inhibición opcional de tripsina de semilla de soja, y el opcional hidrolizado proteico vegetal, el medio de cultivo celular incluye una cantidad de otros componentes que - tal y como sabrá el experto en la técnica - son necesarios para la propagación de las células y para la producción del polipéptido de factor VIII.

[0064] El término "medio de cultivo celular" (o simplemente "medio") se refiere a una solución de nutrientes utilizada para el cultivo de células de mamíferos que proporciona típicamente al menos un componente de una o más de las siguientes categorías: (1) sales de por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, y calcio que contribuyen a la osmolalidad del medio; (2) una fuente de energía, normalmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa; (3) todos los aminoácidos esenciales, y normalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos; (4) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos necesarios en concentraciones bajas; y (5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos que son necesarios típicamente en concentraciones muy bajas, normalmente en el intervalo micromolar. La solución de nutrientes puede estar complementada opcionalmente con uno o más de los componentes de cualquiera de las siguientes categorías: (a) hormonas y otros factores de crecimiento tales como, por ejemplo, insulina, transferrina, y factor de crecimiento epidérmico; y (b) hidrolizados de proteína y tejidos. Preferiblemente, el medio de cultivo celular no contiene ningún elemento de origen animal.

[0065] La presente invención comprende el cultivo de células de mamífero en un medio libre de componentes derivados de animal. Como se utiliza en este caso, los componentes "derivados de animal" son cualquier componente que se producen en un animal intacto (tal como, por ejemplo, proteínas aisladas y purificadas a partir de suero), o producidas por el uso de componentes producidos en un animal intacto (tal como, por ejemplo, un aminoácido hecho a partir del uso de una enzima aislada y purificada a partir de un animal para hidrolizar un material de fuente vegetal). Por el contrario, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene un origen genómico en un animal) pero que ha producido *in vitro* en cultivo celular (tal como, por ejemplo, en una célula de levadura recombinante o bacteriana o en una línea celular establecida continua de mamífero, recombinante o no), en componentes carentes de medio que se han producido en, y aislado y purificado a partir de un animal intacto no es un componente "derivado de animal" (tal como, por ejemplo, insulina producida en una célula de levadura o bacteriana, o insulina producida en una

línea celular establecida de mamífero, tal como, por ejemplo, células CHO, BHK o HEK, o interferón producido en células de Namalwa). Por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene un origen genómico en un animal), pero que se ha producido en una célula recombinante en medio carente de componentes derivados de animal (tal como, por ejemplo, insulina producida en una célula de levadura o bacteriana) no es un "componente derivado de animal". Por consiguiente, un medio de cultivo celular carente de componentes derivados de animal, es uno que puede contener proteínas animales que se han producido de forma recombinante; un medio de este tipo, no obstante, no contiene, por ejemplo, suero o proteínas animales u otros productos purificadas a partir de suero animal. Un medio de este tipo puede contener por ejemplo uno o más componentes derivados de vegetales. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo celular, en particular uno carente de componentes derivados de animal, que de soporte al crecimiento celular y mantenimiento en las condiciones de la invención. Típicamente, el medio contiene agua, un regulador de osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o más factores de crecimiento recombinantes o sintéticos, vitaminas, y cofactores. En una forma de realización, el medio carece de componentes derivados de animal y carece de proteínas ("libre de proteínas"). Los medios que carecen de componentes derivados de animales y/o proteínas están disponibles por proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, JRH Biosciences, Gibco, Hyclone y Gemini.

[0066] En una forma de realización, el medio de cultivo celular está esencialmente libre de suero. En otra forma de realización, el medio es un medio carente de componentes derivados de animal. En otra forma de realización, el medio carece de proteínas ("libre de proteínas") así como de componentes derivados de animal.

[0067] En una forma de realización, el medio es un medio CHO libre de proteínas comercialmente disponible carente de componentes derivados de animal, tal como, por ejemplo, EXCELL™ (SAFC Biosciences), PF-CHO, PF-CHO-LS, SFM4CHO, o CDM4CHO (todos de Hyclone), y la línea celular es una célula CHO.

[0068] En algunas formas de realización, las células utilizadas en la práctica de la presente invención están adaptadas al crecimiento en suspensión en medios carentes de componentes derivados de animal, tal como, por ejemplo, medio carente de suero. Tales procedimientos de adaptación se describen, por ejemplo, en Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), *Kluwer Academic Publishers* págs. 619-623, 1995 (células BHK y CHO); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11:117-120, 1997 (células de insecto); Keen, *Cytotechnol.* 17:203-211, 1995 (células de mieloma); Berg et al., *Biotechniques* 14:972-978, 1993 (células de riñón humano 293). En una forma de realización particularmente preferida, las células huésped son células BHK 21 o CHO las cuales han sido creadas para expresar el factor VIII humano y que han sido adaptadas para crecer en ausencia de suero o componentes derivados de animal.

#### Procedimientos de cultivo celular

[0069] Los métodos de la invención se llevan a cabo típicamente en un recipiente de cultivo agitado y se usa típicamente un tipo de proceso de llenado-extracción. En este proceso las células se cultivan después de la inoculación, y cuando se alcanza una cierta densidad, aproximadamente un 70% del cultivo ha sido recogido, y al resto del cultivo se le suministra medio de cultivo celular fresco hasta alcanzar su volumen original. Esto se repite aproximadamente de 2-10 veces.

[0070] Alternativamente, puede emplearse un tipo de proceso de microportador. En el proceso basado en microportador, las células han migrado a la estructura interna de los portadores (portadores macroporosos) o se han unido ellas mismas a la superficie de los portadores (portadores sólidos), o ambos. En un proceso basado en microportador, las células de mamífero, los microportadores y el medio de cultivo celular se suministran inicialmente a un recipiente de cultivo. Durante los días posteriores, se puede añadir medio de cultivo celular si el volumen de cultivo no se llevó al volumen de trabajo final del recipiente desde un primer momento. Durante el periodo posterior, se lleva a cabo una recogida periódica del sobrenadante de cultivo con producto y sustitución con nuevo medio líquido, hasta que termina finalmente el cultivo. Cuando se recoge el sobrenadante con producto, la agitación, por ejemplo, el removido del cultivo se detiene y los portadores con células pueden sedimentar a lo que sigue la eliminación de parte del sobrenadante de cultivo celular con producto. Con el fin de mejorar los resultados generales del procedimiento, se realizará preferiblemente un proceso de enfriamiento antes de la recogida del sobrenadante con producto, ver, por ejemplo, el documento WO 03/029442. En algunas formas de realización el medio de cultivo celular se enfría a una temperatura entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 32 °C antes de permitir a los portadores que sedimenten, o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, o entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 28 °C.

[0071] Otras variantes aplicables del procedimiento de cultivo celular se describen en el documento WO 02/29084 (Novo Nordisk A/S).

[0072] Antes de llegar a la fase de producción en el que se realiza la recogida periódica del sobrenadante de cultivo con producto, para procesamiento en cadena adicional, se propagan las células según un esquema o rutina que sea adecuado para la célula en cuestión. La fase de propagación puede ser un procedimiento de un solo paso o de múltiples pasos. En un procedimiento de propagación de un solo paso las células se eliminan del almacenamiento y se inoculan directamente al vaso de cultivo (opcionalmente con microportadores) en el que tendrá lugar la producción. En un procedimiento de propagación de múltiples pasos, las células se eliminan del almacenamiento y se propagan a través de un número de recipientes de cultivo de tamaño que aumenta gradualmente hasta alcanzar el recipiente final de

- 5 cultivo (opcionalmente con microportadores) en el que tendrá lugar la producción. Durante los pasos de propagación, las células se cultivan en condiciones óptimas para su crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, la tensión de oxígeno disuelto, la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto, y similares, son aquellos conocidos como óptimos para la célula en particular y serán aparentes para el experto o técnico dentro de este campo (ver, por ejemplo, *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2nd Ed., Rickwood, D. y Hames, B.D., eds. Oxford University Press, New York (1992)).
- [0073] En un procedimiento, el proceso de cultivo celular se lleva a cabo en un recipiente de cultivo: las células se inoculan directamente en el recipiente de cultivo (opcionalmente con microportadores) en el que va a tener lugar la producción; las células se propagan hasta alcanzar una densidad celular adecuada y se inicia la fase de producción.
- 10 [0074] En otro procedimiento, el proceso de cultivo celular se realiza en al menos dos recipientes de cultivo diferentes: uno o más recipiente(s) de cultivo de semilla (primer paso(s) de propagación) seguido por el recipiente de producción del cultivo (último paso de propagación seguido por la fase de producción). En el primer paso de la propagación, se inoculan las células que expresan el polipéptido deseado en un recipiente de cultivo de semillas que contiene el medio de cultivo celular y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima de inoculación cruzada.
- 15 Posteriormente, el cultivo de inoculación propagado se transfiere al recipiente de producción de cultivo con el medio de cultivo celular y (opcionalmente) microportadores. En el caso de un proceso que utilice microportadores, las células se cultivarán en el recipiente de cultivo en condiciones en las que las células migren a la superficie de los portadores sólidos o a las superficies exteriores e interiores de los portadores macroporosos, y continuarán creciendo en este último paso de propagación hasta que los portadores estén completamente colonizados por las células. Durante este
- 20 último paso de propagación se realiza el intercambio de medio permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del recipiente de cultivo, después de lo cual se elimina un porcentaje predeterminado del volumen del tanque y se añade un porcentaje correspondiente de volumen de tanque de medio fresco al recipiente. Los microportadores se resuspenden entonces en el medio, y este proceso de eliminación y reemplazo de medio se repite en un intervalo predeterminado, por ejemplo cada 24 horas. La cantidad de medio reemplazado depende de la densidad celular, y puede ser típicamente de 10-95%, preferiblemente de 25% a 80%, del volumen del tanque.
- 25 [0075] En el caso de un proceso de suspensión, por ejemplo, una perfusión, proceso de lote o extracción-llenado, las células se cultivan suspendidas libremente sin ser inmovilizadas en portadores. En el proceso de suspensión de perfusión las células se inoculan en un recipiente de cultivo de semillas con medio de cultivo carente de componentes derivados de animal, y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima de inoculación cruzada.
- 30 Posteriormente, se transfiere el cultivo propagado inoculado a un recipiente de cultivo de gran escala con medio de cultivo carente de componentes derivados de animal y se propaga hasta que se ha alcanzado al menos una densidad celular predeterminada. En esta fase las células se cultivan en suspensión para permitir que el número de células del recipiente de cultivo aumente hasta un valor predeterminado o crítico. El intercambio de medio se realiza por perfusión continua del recipiente de cultivo con medio fresco.
- 35 [0076] La cantidad de medio perfundido depende de la densidad celular y es típicamente de 10-95%, preferiblemente de 25% a 80%, del volumen del tanque por día (24 horas). Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para la iniciación de la fase de producción, el 60- 95% del medio del tanque en el tanque se cambia cada 24 horas, tal como por ejemplo aproximadamente un 80%. En la fase de producción se utiliza preferiblemente un 80% de intercambio de medio.
- 40 [0077] En un proceso por lotes simple, las células se inoculan en un recipiente de cultivo de siembra con medio de cultivo carente de componentes derivados de animal y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima de inoculación cruzada. Posteriormente, el cultivo de siembra propagado se transfiere a un recipiente de cultivo de gran escala con medio de cultivo carente de componentes derivados de animal.
- 45 [0078] Un proceso por lotes como éste puede prolongarse suministrando al tanque una solución concentrada de nutrientes. Esto prolonga la duración del proceso y en última instancia conduce a un aumento de la producción de FVII en el recipiente de cultivo. La momento de recogida ha de determinarse como un equilibrio entre la operación del tanque más larga posible y el riesgo de la lisis celular.
- [0079] Un proceso de extracción-llenado simple se asemeja a una fermentación por lotes repetida. En la fermentación en lotes las células crecen en el recipiente de cultivo, y el medio se recoge al final del proceso. En un proceso de extracción-llenado el recipiente de cultivo se recoge antes de que se agote ninguno de los nutrientes. En lugar de eliminar todo el contenido del recipiente, se elimina sólo una proporción del volumen del tanque (normalmente un 80% del volumen de tanque). Después de la recogida, se añade al recipiente el mismo volumen de medio fresco. Las células pueden crecer entonces una vez más en el recipiente y se lleva a cabo otra recogida del 80% unos días más tarde. En procesos de lote repetidos, las células que se dejan en el recipiente después de una recogida pueden utilizarse como inóculo para el siguiente lote.
- 50 [0080] Un proceso de extracción-llenado se lleva a cabo en dos fases. La primera fase del proceso se lleva a cabo de forma idéntica al proceso simple por lotes. Tras la primera recogida, el recipiente de cultivo se trata de nuevo como proceso por lotes simple; no obstante, la longitud del lote es más corta que la del primer lote debido a la densidad celular inicial. Estas reiteradas fases de lotes se continúan de forma indefinida.
- 55

[0081] Una alimentación-lote extracción-llenado es una fermentación de extracción-llenado con una alimentación concentrada similar al tipo propuesto en el proceso de alimentación de lote. Una preocupación con el proceso simple de lotes es que el medio fresco añadido puede no ser suficiente para dar soporte a las células durante reiteradas fermentaciones de lote. La inclusión de una alimentación pondría fin a este problema. Una alimentación permitiría además que el recipiente de cultivo operara con mayores tiempos de lote en un proceso de extracción llenado.

[0082] El recipiente de cultivo puede funcionar durante un amplio intervalo de ciclos de tiempo y un amplio intervalo de volúmenes de extracción llenado. Intervalos y valores preferidos pueden observarse en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1

Punto de referencia	Intervalo	Intervalo preferido	Intervalo más preferido
<b>Fase de lote inicial</b>			
PH	6-8	6,6-7,6	7.0 para CHO y 6,6-7.4 para BHK
Temperatura	28-40 °C	30-37 °C	37 °C para CHO y 36 °C para BHK
Reducción de temperatura (OPCIONAL)			
• Reducción de temperatura a	26-39 °C	30-36 °C	32 °C
• Reducción de temperatura a	0.5 - 12.0x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	0.5 - 12.0x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	2.0-10x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>
TOD	10-100%	20-60%	30%
Cultivo			
• Volumen del tanque	10-99%	10-90%	80%
• Duración del cultivo	2-10 días.	5-10 días.	9 días tras el comienzo
Alimentación iniciada	6-0 gl <sup>-1</sup>	3-0 gl <sup>-1</sup>	Cuando glucosa < 2 gl <sup>-1</sup>
<b>Fases de lote repetidas</b>			
PH	6-8	6,6-7,6	7.0 para CHO y 6,6-7.4 para BHK
Temperatura	28-40 °C	30-37 °C	37 °C para CHO y 36 °C para BHK
Reducción de temperatura (OPCIONAL)			
- Reducción de temperatura a	26-39 °C	30-36 °C	32 °C
- Reducción de temperatura a	0.5 - 12.0x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	0.5 - 12.0x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	2.0-10x10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>
TOD	10-100%	20-60%	30%
Cultivo			
• Volumen del tanque	10-99%	10-90%	80%
• Duración del cultivo	1-7 días.	1-7 días.	5 días tras el cultivo
Alimentación iniciada	3-0 gl <sup>-1</sup>	3-0 gl <sup>-1</sup>	Cuando glucosa < 2 gl <sup>-1</sup>

[0083] Debe entenderse que en un proceso en el que la fase de propagación es un procedimiento de múltiples pasos, la propagación puede llevarse a cabo en recipientes de cultivo que aumentan progresivamente de tamaño hasta que se obtiene un número suficiente de células para introducir las en el recipiente final de cultivo. Por ejemplo, pueden utilizarse en secuencia uno o más recipientes de cultivo de siembra de 5 L, 50 L, 100 L o 500 L. Un recipiente de cultivo de siembra tiene típicamente una capacidad de entre 5 L y 1000 L. Típicamente, las células se inoculan en un recipiente de cultivo de siembra con una densidad inicial de aproximadamente 0.2 a 0.4 x 10<sup>6</sup> células/ml y se propagan hasta que el cultivo alcanza una densidad celular de aproximadamente 1.0 x 10<sup>6</sup> células/ml. Típicamente, una densidad mínima de inoculación cruzada suele estar entre 0.8 y 1.5 x 10<sup>6</sup> células/ml.

[0084] Algunos de los puntos de referencia que son adecuados para la producción de factor VIII no son necesariamente adecuados para el crecimiento inicial de las células, bien en el cultivo de siembra o en los microportadores. Por ejemplo, la temperatura, la tensión de oxígeno disuelto, y/o pH puede ser diferente para las dos fases. El cambio de medio durante la propagación se hace para mantener las células vivas y en crecimiento, no para cultivar el sobrenadante del cultivo para procesos de recuperación.

[0085] Opcionalmente, un descenso en el punto de referencia de la temperatura del cultivo puede utilizarse cuando se introduce, y durante la fase de producción. Además, al ajustar la temperatura de la fase de producción, el pH operativo y la frecuencia de intercambio de medio cambian a valores que son óptimos para la producción.

#### Microportadores

[0086] Como se utiliza en este caso, los microportadores son partículas que son lo suficientemente pequeñas para que se puedan utilizar en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no causa daños significativos a las

5 células). Son sólidos, porosos, o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento poroso en la superficie. Los microportadores pueden, por ejemplo, sin límite alguno, tener base de celulosa o de dextrano, y sus superficies (superficies exterior e interior en caso de portadores porosos) pueden estar cargadas positivamente. Otros detalles pueden encontrarse en el documento WO 02/29083 y en "Microcarrier cell culture, principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech. 18-1140-62. Edition AA".

[0087] Los microportadores sólidos útiles incluyen, sin limitación, Citodex 1™ y Citodex 2™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ). Los portadores sólidos son particularmente adecuados para células de adhesión (células dependientes de anclaje). Los portadores macroporosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1™ y Cytopore 2™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ).

10 [0088] Los portadores Cytopore 1™ son particularmente preferidos, que tienen un diámetro medio de partícula de 230 um, un tamaño de poro medio de 30 um, y una densidad de carga positiva de 1.1 meq/g.

#### Condiciones de cultivo a gran escala

15 [0089] La invención es particularmente relevante para la producción a gran escala. Con el término "producción a gran escala" se entiende una producción que implica un recipiente de cultivo de al menos 100 L. En formas de realización preferidas, no obstante, la escala es típicamente de al menos 250 L, tal como de al menos 500 L, por ejemplo de al menos 1000 L o incluso 5000 L o más. El término "gran escala" se puede utilizar de forma intercambiable con los términos "escala industrial" y "escala de producción".

[0090] El método para la producción a gran escala del polipéptido se lleva a cabo típicamente durante un periodo de al menos 120 horas, por ejemplo 1-26 semanas.

20 [0091] En el caso de que el proceso de cultivo celular se lleve a cabo en al menos dos recipientes de cultivo diferentes, tales como uno o más recipiente(s) de cultivo de siembra (primer paso (s) de propagación) seguido por el recipiente de cultivo de producción (último paso de propagación seguido por la fase de producción), entonces el proceso implicará típicamente una transferencia de aproximadamente 50 L del cultivo de siembra propagado (con aproximadamente  $1.0 \times 10^6$  células/ml) en un recipiente de cultivo de 500 L con 150 L de medio de cultivo celular. El cultivo a gran escala se  
25 mantiene en condiciones adecuadas de, por ejemplo, temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto (TOD) y velocidad de agitación, y el volumen aumentará gradualmente con la adición de medio al recipiente de cultivo. En el caso de un proceso de microportador, el recipiente de cultivo incluye además una cantidad de microportadores correspondiente a la concentración de microportador final en el intervalo de 1 a 10 g/L. Después de la transferencia, las células migran típicamente a la superficie de los portadores o al interior de los portadores durante las primeras 24 horas.

#### 30 Recipiente de cultivo

[0092] Los recipientes de cultivo aplicables en la presente invención pueden estar basados, por ejemplo, en reactores tipo tanque agitado (CSTR) convencionales el los que la agitación se obtiene por medio de tipos de propulsores convencionales o reactores acoplados en los que la agitación se obtiene introduciendo aire desde fondo del recipiente. Entre los demás parámetros que se controlan típicamente dentro de los límites especificados son el pH, la tensión de  
35 oxígeno disuelto (TOD), la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto y la temperatura. La tensión de oxígeno disuelto puede mantenerse, por ejemplo, mediante el burbujeo oxígeno puro. La concentración de CO<sub>2</sub> disuelto puede mantenerse por burbujeo con aire. El medio de control de la temperatura es típicamente agua, calentada o enfriada según las necesidades. El agua pasarse a través de una envoltura que rodea el recipiente o a través de una bobina de canalización sumergida en el cultivo.

40 [0093] El término "recipiente de cultivo" puede utilizarse de forma intercambiable con "depósito", "reactor", "fermentador" y "bioreactor".

#### *Paso b) - aislamiento del polipéptido expresado*

45 [0094] En este paso b), el polipéptido de factor VIII ha de ser aislado de las células de mamífero mediante medios adecuados. En una forma de realización típica, las células pueden eliminarse del medio y el medio puede ser purificado mediante filtración secuencial de cultivo a través de filtros de 1.0 µm y 0.2 µm.

[0095] El factor VIII en el medio (sobrenadante de cultivo celular) puede concentrarse ventajosamente mediante cromatografía de intercambio iónico, donde se unen fracciones ricas en factor VIII. El polipéptido de factor VIII puede purificarse mediante la unión con una columna de anticuerpo de anti factor VIII (p. ej. una columna de anticuerpos F25, véase por ejemplo el documento WO 95/13301 y/o Nordfang et al. 1995 (Thromb. Haemostas. 54:586-590)) seguido por  
50 elución en condiciones que preservan la actividad de polipéptido de factor VIII. Las demás impurezas podrán eliminarse por intercambio del tampón por filtración de gel.

[0096] Según la invención, la O-fosfo-L-serina se añade para facilitar el aislamiento del polipéptido de factor VIII de las células, es decir, para liberar el polipéptido de factor VIII ligado a la célula.

[0097] Una característica particular de la presente invención es que el polipéptido de factor VIII puede aislarse de las

células sin la desactivación o destrucción de las células de mamífero. Así, en una forma de realización particular, el polipéptido de factor VIII expresado se recoge sustancialmente del medio de cultivo celular sin reducir la viabilidad de las células. Por otra parte, es ventajoso si la producción se puede continuar utilizando el mismo lote de células.

5 [0098] Un vez el medio con polipéptido de factor VIII ha sido aislado de las células, puede someterse a uno o más pasos del proceso para purificar la proteína deseada, incluyendo, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de intercambio de iones; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción y similares. Ver, generalmente, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982 ; y Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989 .

10 [0099] La purificación de los polipéptidos de factor VIII puede implicar en particular cromatografía de inmutafinidad en una columna de anticuerpo de antifactor VIII y una activación por escisión proteolítica.

[0100] Los siguientes ejemplos son ilustraciones no limitativas de la presente invención.

#### EJEMPLOS

##### Materiales y métodos

15 [0101] Línea celular: la línea celular utilizada para la transfección, células CHO dhfr, células DUKX-B11 (Urlaub, G. & Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 ), se adaptó para crecer en cultivos en suspensión utilizando medios libres de suero y complementados con ribonucleosidos y deoxiribonucleosidos.

20 [0102] Vector de expresión: la transcripción del factor VIII se obtiene mediante el uso de un promotor del adenovirus-SV40 y una selección mediante un marcador de selección dihidrofolato reductasa. La molécula de factor VIII consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del factor VIII conectadas con un pequeño enlazador derivado del dominio B. El dominio B ha sido eliminado, ya que esto permite una mayor expresión del factor VIII y la actividad biológica del factor VIII se retiene.

25 [0103] Transfección: se eliminó el gen  $\beta$ -lactamasa mediante digestión con enzimas de restricción de plásmido #815 F8-500B-pT5V7 y el fragmento resultante con factor VIII se purificó en gel y se usó para la transfección de células de CHO DUKX-B11 usando FuGENE 6 (Roche). La transfección se efectuó en 6 placas de pocillos en medio  $\alpha$ -MEM (Gibco) complementado con ribonucleosidos y deoxiribonucleosidos y un 10% de FBS dializado. Dos días tras la transfección, las células se transfirieron a matraces TC80 en un medio  $\alpha$ -MEM (Gibco) sin ribonucleosidos y deoxiribonucleosidos pero con un 10% FBS dializado. Tras seleccionar los transfectantes supervivientes gradualmente durante 15 días se comenzó una amplificación con MTX. Las células se amplificaron hasta 1000 nM MTX formándose varios subclonajes durante el proceso.

30

[0104] Adaptación SF y cultivo celular: las células se adaptaron para crecer en medio libre de suero reduciendo gradualmente la concentración de FBS en el medio SF. Las células se adaptaron y mantuvieron en matraces de agitación de 125 mL.

35 [0105] Cultivo celular durante experimentos de complementación de medio exentos de suero: para experimentos de complementación de medio, las células se cultivaron en un modelo de perfusión de alta densidad celular en frascos de agitación con cubierta ventilable de 50 mL a 35 °C en medio libre de suero, tal y como se describe a continuación. Las células se cultivaron en grandes matraces de agitación a 37 °C. La viabilidad celular se midió en cultivo celular, y siempre fue > 95%. Las células cultivadas se resuspendieron en medio fresco. Se añadieron 2.5 mL de las células resuspendidas y cultivadas a 2.5 mL de medio fresco con suplemento para dar un volumen total de 5 mL, y una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. 50 mL. Los frascos de agitación se colocaron a continuación en el agitador a 35 °C y 250 r.p.m. Tras 24 horas, las muestras se evaluaron en cuanto a su densidad celular, viabilidad, CoA, ELISA y la integridad de la proteína del factor VIII mediante transferencia Western.

40

45 [0106] Viabilidad celular: la viabilidad del cultivo celular puede medirse por ejemplo, tal y como se describe en *Mammalian Cell Culture; essential techniques*, 1997 (Wiley) Editors: A. Doyle y J. Brian Griffiths (véanse por ejemplo los protocolos 13 y 14).

50 [0107] Ensayo CoA (ensayo de actividad del factor VIII): con la presencia de calcio y fosfolípidos, el factor X se activa a factor Xa mediante el factor IXa. Esta generación se estimula en gran parte por el factor VIII, que se puede considerar como un cofactor de esta reacción. Usando cantidades óptimas de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos y un exceso de factores IXa y X, el índice de activación del factor X dependerá únicamente de la cantidad de factor VIII. El factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico S-2765 liberando así el grupo cromofórico, pNA. Por lo tanto, el color se lee de forma fotométrica en 405 nm. El Factor Xa generado y de esta forma, la intensidad de color es proporcional a la actividad del factor VIII en la muestra. La hidrólisis de S-2765 formado con trombina puede evitarse añadiendo inhibidor de trombina sintética, I-2581, junto con el sustrato (Chromogenix Coatest Factor SP VIII, diaPharma)

55 [0108] Otras pruebas de actividad del factor VIII: pueden llevarse a cabo otros ensayos para la detección de la actividad del factor VIII de forma más sencilla en pruebas in vitro tal y como se describe, por ejemplo, en Kirkwood TBL, Rizza

CR, Snape TJ, Rhymes IL, Austen DEG. *Identification of sources of interlaboratory variation in factor VIII assay*. B J Haematol 1981, 37, 559-68.; o Kessels et al., British Journal of Haematology, Vol. 76 (Suppl.1) págs. 16 (1990)). La actividad biológica del factor VIII puede cuantificarse además realizando mediciones sobre la capacidad de una preparación al corregir el tiempo de coagulación del plasma deficitario del factor VIII, por ejemplo, tal y como se describe en Nilsson et al., 1959.(Nilsson IM, Blombaek M, Thilen A, von Francken I., *Carriers of haemophilia A - laboratory study*, Acta Med Scan 1959, 165:357). En este ensayo, la actividad biológica se expresa como unidades/ml plasma (1 unidad corresponden a la cantidad de FVIII presente en un plasma normal agrupado).

[0109] ELISA: los pocillos laterales están previamente cubiertos con anticuerpo policlonal de oveja a factor humano VIII. Las muestras se diluyen y se colocan en los pocillos. El antígeno de factor VIII presenta conexiones al anticuerpo revestido. Después del lavado de material no unido, se aplica el anticuerpo de detección de oveja marcado con peroxidasa, permitiendo así su enlace con el factor VIII. Los pocillos vuelven a lavarse y se aplica una solución de TMB (el sustrato de peroxidasa tetrametilbenzidina) permitiendo así que reaccione durante un periodo de tiempo determinado. Surge un color azulado que va volviéndose amarillo durante el enfriamiento de la reacción con ácido. El color resultante se mide espectrofotométricamente en un lector de microplacas a 450 nm. La absorbencia con 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de antígeno de factor VIII capturada en el pocillo (VisuLize, FVIII antigen kit,, Affinity biologicals). El ensayo se calibra usando dominio B purificado suprimido del factor VIII.

[0110] ELISA F25: ELISA: los pocillos laterales están previamente cubiertos con anticuerpo policlonal de oveja a factor humano VIII. Las muestras se diluyen y se colocaron en los pocillos. El antígeno del factor VIII presenta conexiones con el anticuerpo de revestimiento. Después del lavado de material no unido, se diluyen los anticuerpos monoclonales de ratón F25 antifactor VIII reconociendo la región C-terminal de la cadena pesada del factor VIII la cual se aplica y se une al factor VIII capturado. Los pocillos se lavan nuevamente y se aplica IgG cabra anti ratón diluido marcado con peroxidasa (DAKO), permitiendo así su enlace con el anticuerpo F25 capturado. Se lavan de nuevo los pocillos y se aplica una solución de TMB (sustrato de peroxidasa tetrametilbenzidina) permitiendo así que reaccione durante un periodo de tiempo determinado. Surge un color azulado que va volviéndose amarillo durante el enfriamiento de la reacción con ácido. El color resultante se mide espectrofotométricamente en un lector de microplacas a 450 nm. La absorbencia de 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de antígeno de factor VIII capturada en el pocillo. El ensayo se calibra utilizando una cadena pesada estándar de factor VIII purificada especialmente con el anticuerpo F25. (Anticuerpo F25: véase, por ejemplo, el documento WO 95/13301 y /o Nordfang et al. 1995 (Thromb. Haemostas. 54:586-590).

### 30 **Ejemplo 1: complementación de medio de cultivo celular libre de suero de células de producción de factor VIII con OPLS.**

[0111] Se complementó medio de cultivo celular libre de suero con OLPS con la concentración indicada según los detalles experimentales descritos en materiales y métodos. Los resultados pueden observarse en la tabla 3 y en las figuras 2A y 2B.

35 **Tabla 3** complementación de medio de cultivo celular libre de suero de células de producción de factor VIII con OPLS

Concentración OPLS (mM)	Productividad Factor VIII (pcd)	Actividad específica de la proteína del Factor VIII (U/microg)
0	0.061	11.0
0.03	0.068	11.8
0.1	0.062	12.8
0.3	0.052	12.2
1	0.058	12.6
3	0.066	15.8
10	0.10	15.4
30	0.18	15.0

#### Conclusión:

[0112] La adición de OPLS aumenta la productividad específica de las células de producción del factor VIII (véase figura 2A) y la adición de OPLS incrementa la actividad específica del factor VIII (véase figura 2B).

### 40 **Ejemplo 2: complementación de medio de cultivo celular libre de suplemento de suero de células de producción de factor VIII con O-fosfo-L-serina y/o un hidrolizado vegetal.**

[0113] Se cultivaron células de producción de Factor VIII BDD (línea celular 1C5-SF) en frascos de 50 mL con coberturas de filtro (frascos de filtro de biorreactor 50, TPP).  $2.5 \times 10^6$  células en 5 mL de medio CDM4CHO complementado con O-fosfo-L-serina con una concentración de 20 mM y/o un hidrolizado vegetal con una concentración de 5 mg/ml tal y como se muestra en la tabla 4. Se evaluaron cada una de las condiciones en cuatro cultivos de 5 mL. Se incubaron los cultivos en una incubadora de agitación (37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> y 250 r.p.m.). Cuatro días después del sembrado, se centrifugaron 1.2 mL de cada cultivo 2000 X g durante 5 min, y se eliminó el granulado celular. Se

estabilizó el sobrenadante al añadir imidazol pH 7.2 con una concentración final de 20 mM y Tween 80 con una concentración final de 0.02 % y fue congelado en partes alícuotas de 0.2 mL a -80 °C.

5 [0114] El contenido total de antígeno de factor VIII de cada cultivo se determinó mediante ELISA de fase doble. Se descongelaron las partes alícuotas del medio congelado y estabilizado y se evaluó tal y como se describe en materiales y métodos. Se determinó el contenido de factor VIII reconocido por el anticuerpo F25, el cual enlaza selectivamente el factor VIII con una cadena pesada C-terminal intacta. Se descongelaron partes alícuotas del medio congelado y estabilizado y se evaluó con ELISA F25 tal y como se describe en materiales y métodos.

[0115] Para comprobar la actividad, se descongelaron las partes alícuotas del medio congelado y estabilizado y se evaluaron mediante ensayo CoA, tal y como se describe en materiales y métodos.

10 [0116] Se evaluó la calidad del factor VIII en el medio de cada cultivo mediante un cálculo de actividad específica calculada a partir de su actividad y del contenido total de antígeno del factor VIII . Se evaluó la proporción de la cadena pesada intacta C-terminal del factor VIII mediante la relación entre la cantidad de antígeno de factor VIII detectado por ELISA F25 y la cantidad total de antígeno de factor VIII.

15 [0117] Los resultados obtenidos con los dos suplementos se muestran en la figura 3A-C. Estos datos demuestran los efectos beneficiosos al añadir bien O-fosfo-L-serina o bien un hidrolizado vegetal a los cultivos de células de producción de factor VIII. Ambos suplementos mejoraron el rendimiento y la calidad del factor VIII recombinante de los cultivos celulares, y ambos aditivos aumentaron la proporción de factor VIII con cadena pesada C-terminal intacta en el medio. Además, se observó un efecto complementario beneficioso en la proporción de factor VIII con cadena pesada C-terminal intacta cuando se utilizaron en combinación O-fosfo-L-serina e hidrolizado vegetal.

20 **Tabla 4.** Suplementos evaluados con células de producción de factor VIII

	Producto	Proveedor	Nº de catálogo.
A	No aditivo	-	-
B	Hidrolizado de gluten de trigo	Kerry Bioscience	HyPep 4605
C	O-fosfo-L-serina	Sigma	P0878
D	Hidrolizado de gluten de trigo y O-fosfo-L-serina	-	-

LISTA DE SECUENCIAS

[0118]

<110> Novo Nordisk A/S

<120> MEJORA DE TÍTULOS DE POLIPÉPTIDO DE FACTOR VIII EN CULTIVOS CELULARES

5 <130> 7605.000-EP

<160> 1

<170> Versión patentIn 3.3

<210> 1

<211> 4416

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADNc FVIII

<400> 1

```

atggaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc      60
accagaagat actacctggg tgcagtgga  ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc      120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac      180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc      240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat      300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt      360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg      420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg      480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat      540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa      600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta      660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat      720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc      780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtcctatt ggcatgtgat tggaatgggc      840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacat      900
cgccaggcgt ccttgaaaat ctgcgcaata actttcctta ctgctcaaac actccttgatg      960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactgaa tggcatggaa     1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa     1080
gaagcggag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat     1140
gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact     1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc     1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg     1320
aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac acagatgaaa ctttaagac tcgtgaagct     1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg     1440

```

15

ES 2 379 846 T3

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500  
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560  
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620  
 actaaatcag atcctcgggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680  
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740  
 agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800  
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg 1860  
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920  
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980  
 attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040  
 atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100  
 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160  
 atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220  
 agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280  
 ttctcccaga attcgcgaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccaccg 2340  
 gtcttgaaac gccatcaacg ggagatcact cgtactactc ttcagtctga tcaagaggaa 2400  
 attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat 2460  
 gaggatgaaa atcagagccc ccgagcttt caaaagaaaa cagcacta ttttattgct 2520  
 gcagtgagga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg 2580  
 gctcagagtg gcagtgccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc 2640  
 tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca 2700  
 tatataagag cagaagttga agataatata atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 2760  
 ccctattcct tctattctag cttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 2820  
 cctagaaaaa actttgtcaa gcctaatagaa accaaaactt acttttgaa agtgaacat 2880  
 catatggcac ccactaaaga tgagttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatggt 2940  
 gacctgaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggctg ccactaac 3000  
 aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gttttcacc 3060  
 atctttgatg agaccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggt 3120  
 ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 3180  
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctacaggatca aaggattcga 3240  
 tggatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 3300  
 gtgttactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 3360  
 gttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 3420  
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acacttttcc tgggtgacag caataagtgt 3480  
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 3540

ES 2 379 846 T3

caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc	3600
tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt	3660
cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt	3720
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga	3780
accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac	3840
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact	3900
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag	3960
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacctt actttaccaa tatgtttgcc	4020
acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaagga ggagtaatgc ctggagacct	4080
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca	4140
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc	4200
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag	4260
gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta	4320
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg	4380
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tactga	4416

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases de a) cultivo de una célula de mamífero expresando un polipéptido de factor VIII en condiciones de expresión de dicho polipéptido de factor VIII, comportando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular comprendiendo O-fosfo-L-serina (OPLS), y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado a partir de la célula de mamífero mediante medios adecuados.
- 10 2. Método para la producción de un polipéptido de factor VIII, comprendiendo el método las fases de a) cultivo de una célula de mamífero expresando un polipéptido de factor VIII en condiciones de expresión de dicho polipéptido de factor VIII, comportando dichas condiciones de cultivo un medio de cultivo celular, y b) aislamiento del polipéptido de factor VIII expresado a partir de la célula de mamífero mediante medios adecuados, comportando dichos medios adecuados la adición de O-fosfo-L-serina (OPLS) a dichas células.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la OPLS está presente en el medio de cultivo celular en una concentración de 0.1-100 mM.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la OPLS se añade a las células en la fase b) en una concentración de 1-200 mM.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular comprende además un inhibidor de tripsina de semilla de soja.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular comprende además un hidrolizado de proteína vegetal.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula de mamífero se selecciona del grupo consistente en células de mamífero que expresan endógenamente el polipéptido de factor VIII y células de mamífero que han sido transfeccionadas con un gen para el polipéptido de factor VIII.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula de mamífero ha sido transfeccionada con un vector de expresión comprendiendo una molécula de ácido nucleico codificando el polipéptido de factor VIII y regiones de control de expresión operativamente unidas a este.
- 25 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular está esencialmente libre de suero.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido de factor VIII se recoge a partir del medio de cultivo celular sustancialmente sin reducción de la viabilidad de las células.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la producción se continúa utilizando el mismo lote de células.

30

# ES 2 379 846 T3

Secuencia genética del factor VIII (ADNc) (SEC. ID n.º1)

atggaatagagctctccacctgctcttctgtgcctttgagattctgcttagtgccaccagaagatactacctgggtgcagtgga  
ctgtcatgggactatatgcaaagtgatctcggtagctgctgtggacgcaagattcctcctagagtccaaaatctttccattcaac  
acctcagctgtgtacaaaagactctgtttgtagaattcaggatcacctttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtct  
gctaggctctaccatccaggctgaggttatgatacagtggtcattacactaagaacatggcttccatctgtcagcttcatgctgtt  
gggtatcctactggaagactctgaggagctgaatatgatgatcagaccagtcacaaagggagaagaagatgataaagtcttccc  
tggtggaagccatacatatgtctggcaggctcctgaaagagaatggccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatcttc  
tcatgtggacctggtaaaagactgaattcaggcctcattggagccctactagatgtagagaagggagtctggccaaggaaaga  
cacagacctgtcacaattatactacttttctgtgatttgatgaagggaaaagttggcactcagaaacaaagaactccttgatgag  
gataggatgctgcatctgctcggcctggcctaaatgcacacagtcattggtatgtaaacaggctctgcccaggctgattggat  
gccacaggaaatcagctattggcatgtgattggaatgggaccactcctgaagtgcactcaatattcctgaaggtcacacattctt  
gtgaggaaccatcgccaggctcctggaaatctcgcaataacttcttactgctcaaacactctgatggacctggacagtttcta  
ctgtttgtcatatctctccaccaacatgatggcatggaagcttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaacccaactcgaat  
gaaaaataatgaagaagcgaagactatgatgatgatcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgacaactctct  
tcctttatccaaatcgtcagttgccaagaagcatcctaaaacttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgc  
tccttagtctcgccccgatgacagaagtataaaagtaaatgtgaacaatggcctcagcggattggtaggaagtacaaaa  
agtccgatttatggcatacacagatgaaaccttaagactcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatctgggaccttactttatg  
gggaagttggagacacactgttgattatattaagaatcaagcaagcagaccataatacatctaccctcaggaatcactgatgtccg  
tcctttgtattcaaggagattacaaaaggtgtaaaacattgaaagatttccaattctgccaggagaaatattcaatataaatgga  
cagtgactgtagaagatggccaactaaatcagatctcggctgaccgctattactctagttctgtaatatggagagagatct  
agcttcaggactcattggcctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatcaaagaggaaaccagataatgtcagacaagaggaa  
tgtcatcctgtttctgtatttgatgagaaccgaagctggtaacctcagagaaatatacaacgctttctcccaatccagctggagtga  
gcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatgcacagatcaatggctatgttttgatagtttgacagttgctgattgtgcat  
gagggtggcactggtacattctaagcattggagcagactgacttcttctgtcttctctctggatataacctcaaacacaaaatg  
gtctatgaagacacactaccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcagtggaacccaggctatggattctgggtg  
ccacaactcagactttcgaacagaggcatgaccgcttactgaaggttctagttgtgacaagaactggtgattattcagaggac  
agttatgaagatattcagcacttctgctgagtaaaaaaatgccattgaaccaagaagcttctccagaattcgcgacacctagca  
ctaggcaaaagcaattaatgccacccaccggtcttgaacgcatcaacgggagatcactcgtactactctcagctgatcaaga  
ggaaattgactatgatgataccatatcagttgaaatgaagaaggaagattttgacattatgatgaggatgaaaaatcagagccccg  
cagctttcaaaagaaaacacgacactatttattgctgcagtgagaggctctggattatgggatgagtagctccccacatgttcta  
agaaacagggctcagagtggcagtgctcctcagttcaagaaagttgtttccaggaattactgatggctccttactcagccctata  
ccgtggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatataagagcagaagttgaagataatatcatggtaacttccagaaa  
tcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttattctatgaggaagatcagaggcaaggagcagaacctagaaaaaacttgt  
caagcctaataaaccaaaacttacttttggaaagtgcaacatcatatggcaccactaaagatgagtttgactgcaagcctgggc  
ttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggacccctctggtctgccacactaacacactgaaccctgc  
tcatgggagacaagtgacagtcaggaattgctctgttttccacatctttgatgagaccaaaagctggtacttactgaaaatag

aaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaagatcccacttttaagagaattatcgcttccatgcaatcaatggctacat  
aatggatacactacctggcttagtaatggctcaggatcaaaggattcgatggatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatcca  
ttctattcattcagtggaatgtgttactgtacgaaaaaagaggagtataaatggcactgtacaatctctatccagggtgttttga  
gacagtggaatgttaccatccaaagctggaatttgcggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacact  
tttctgggtgacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagattttcagattacagcttcaggacaat  
atggacagtgggcccaagctggccagacttcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagcccttttcttgatcaa  
ggatggatctgttggaccaatgattattcacggcatcaagaccagggtgcccgtcagaagttctccagcctctacatctcagttat  
catcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcagacttatcgaggaaattccaactggaacctaattggtcttcttgcaatgtggatt  
catctgggataaaacacaatatttttaaccctccaattattgctcgatacatccgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactctt  
cgatggagttgatgggctgtgatttaaatagttgcagcatgccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattact  
gcttcatcctactttaccaatatgtttgccacctggctccttcaaaagctcgacttcacctcaaggaggagtaatgcctggagacct  
caggtgaataatccaaaagagtggctgcaagtggactccagaagacaatgaaagtcaaggagtaactactcagggagtaaaat  
ctctgcttaccagcatgtatgtgaaggagttcctcatctccagcagtcaagatggccatcagtggtactctttttcagaatggcaaag  
taaaggttttcagggaaatcaagactcctcacactgtggtgaactctctagaccaccggtactgactcgctaccttcaattcacc  
cccagagttgggtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgagggcacaggaccttactga

FIGURA 1

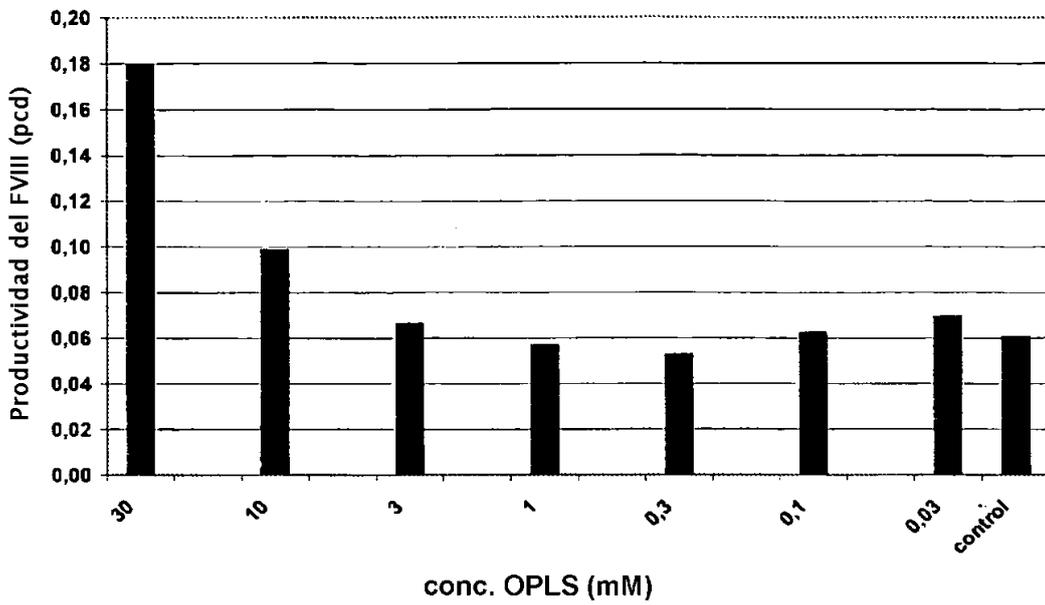


Figura 2A

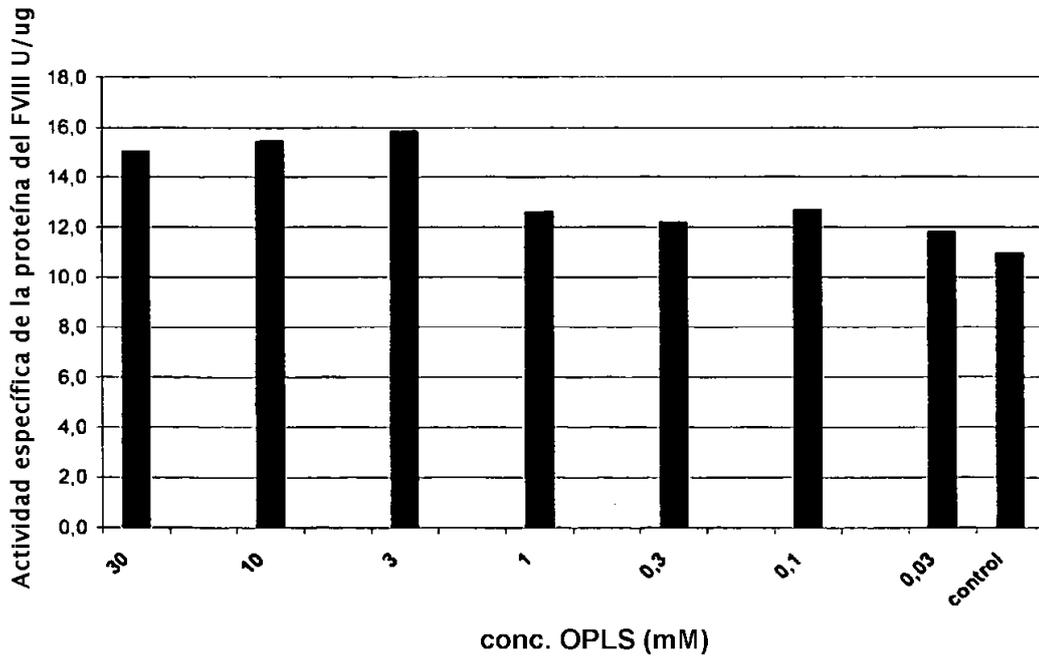


Figura 2B

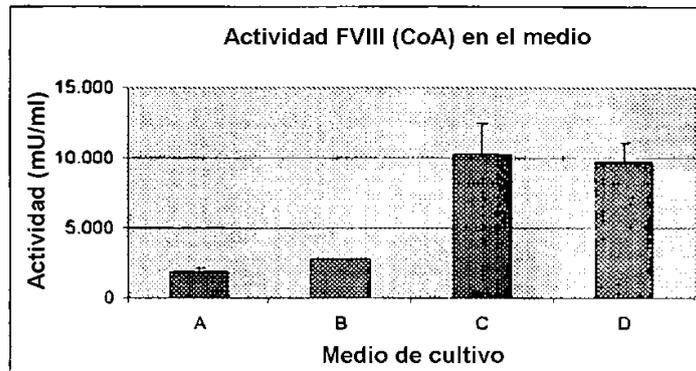


Figura 3A

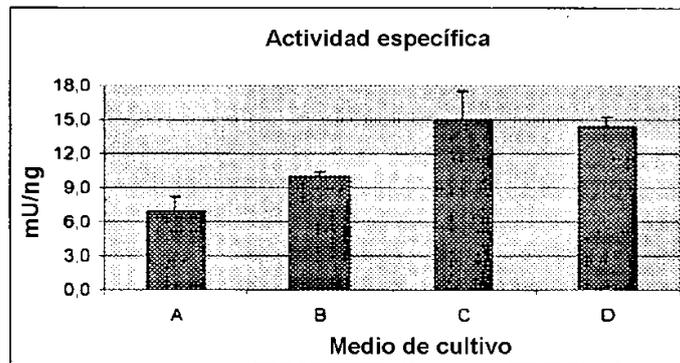


Figura 3B

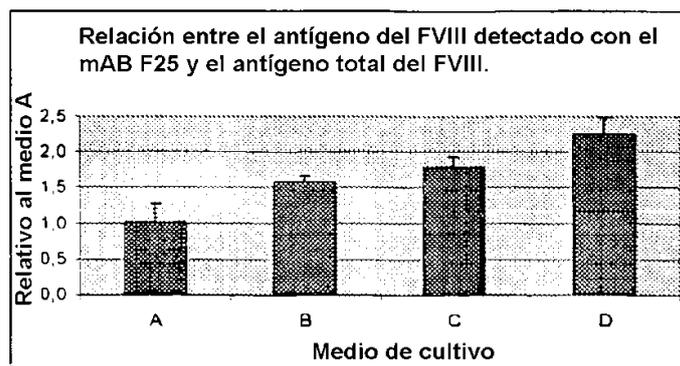


Figura 3C