

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 485**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06708017 .6**
96 Fecha de presentación: **06.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1851305**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Producción de un polipéptido en un líquido de cultivo sin suero con hidrolizado de proteínas vegetales**

30 Prioridad:
11.02.2005 DK 200500204

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2012

73 Titular/es:
**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:
KNUDSEN, Ida, Mølgaard

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 380 485 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

Producción de un polipéptido en un líquido de cultivo sin suero con hidrolizado de proteínas vegetales

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos mejorados para producir polipéptidos interesantes en células eucariotas en un líquido de cultivo sin suero.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Métodos para producción a gran escala de polipéptidos, como polipéptidos del factor VII, en células eucariotas se conocen en la técnica, ver, por ejemplo, WO 02/29083, WO 02/29084 y WO 03/29442.

15 [0003] En la producción a gran escala de polipéptidos, como polipéptidos del factor VII, es deseable por cuestiones económicas prolongar la fase de producción para beneficiar completamente los esfuerzos puestos en la propagación del cultivo celular.

También, se prevé que un índice de producción más constante para el polipéptido sobre un periodo temporal más largo hará el lote de polipéptido más homogéneo en que procesos postraduccionales (p. ej. glicosilación y formación de ácidos γ -carboxílicos) se cree que proceden con más precisión para un cultivo celular "no estresado".

20 [0004] La WO 01/23527 divulga un medio de cultivo celular para el cultivo sin suero y sin proteínas de células. El medio contiene una proporción de un hidrolizado de soja (peptona de soja).

25 Breve descripción de la invención

[0005] La invención se refiere a modificación de la concentración de un componente de hidrolizado de proteínas vegetales en el líquido de cultivo celular durante un cultivo, para, al mismo tiempo, 1) conseguir crecimiento celular óptimo durante las fases de propagación, y 2) conseguir estabilidad óptima a largo plazo del cultivo con respecto a rendimiento en la fase de producción, y así aumentar el rendimiento total del polipéptido en cuestión, por ejemplo, un polipéptido del factor VII.

[0006] Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para producción a gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenido en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo

- 35 (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
- (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,

40 donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).

[0007] Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para producción a gran escala de un polipéptido del factor VII en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo

- 45 (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
- 50 (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,

donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, tal como hidrolizado de proteínas de soja, y donde la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular está en el intervalo de 0,7-2,2 g/L.

55 Breve descripción de los dibujos

[0008]

La figura 1 ilustra un esquema de tratamiento de un proceso de cultivo.

60 La figura 2 muestra un gráfico con los resultados de cultivo microportador en un fermentador de 20 L, cf. Ejemplo 1.

La figura 3 muestra un gráfico con los resultados de cultivo microportador en un fermentador de 500 L, cf. Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

- 5 [0009] Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto principal de la presente invención se refiere a un método para producción a gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenido en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo
- (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
 - (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,
- 10 donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).
- 15 [0010] Mediante el término "producción a gran escala" se entiende producción implicando un vaso de cultivo de al menos 100 L. En formas de realización preferidas, no obstante, la escala es típicamente al menos 250 L, tal como al menos 500 L, por ejemplo, al menos 1000 L o incluso 5000 L o más. El término "gran escala" se puede utilizar de forma intercambiable con los términos "escala de producción" y "escala industrial".
- 20 [0011] El método para producción a gran escala del polipéptido se conduce típicamente sobre un periodo de al menos 120 horas, por ejemplo, 1-26 semanas.
- [0012] La presente invención debe entenderse como una mejora de métodos hasta ahora conocidos para producción a gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero. Se conoce el uso de hidrolizados de proteínas vegetales en tales métodos, pero la presente invención proporciona pautas para mejorar los resultados de tales métodos.
- 25 [0013] Una característica del método del aspecto principal de la invención es controlar el contenido del hidrolizado de proteínas vegetales en los líquidos de cultivo celular, de manera que la fase de propagación al igual que la fase de producción se optimizan. Esto se hace asegurando que la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular (usado para la fase de propagación) y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular (usado para la fase de producción) es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).
- 30 [0014] Típicamente, la concentración de hidrolizados de proteínas vegetales en los líquidos de cultivo celular están en el intervalo 0,01-10,0 g/L. En algunas formas de realización, una concentración (C_1) de alrededor de 5,0 g/L se puede utilizar durante las fases de propagación, y la concentración se disminuye luego, de modo que la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es, por ejemplo, 1,0 g/L en el inicio de la fase de producción. Posteriormente, durante la fase de producción la concentración se puede tener a un nivel sustancialmente fijo o puede aumentarse alternativamente y disminuirse entre un valor bajo y uno alto, por ejemplo, entre 1,0 g/L y 2,0 g/L, para mantener un cultivo estable.
- 35 [0015] Dicho esto, la proporción $C_1:C_2$ está preferiblemente en el intervalo de 2:1 a 10:1, tal como 2.5:1 a 8:1 o en el intervalo de 3:1 a 6:1.
- 40 [0016] Además, la concentración C_2 está típicamente en el intervalo de 0,2-3,5 g/L, tal como en el intervalo de 0,7-3,0 g/L, por ejemplo, en el intervalo de 0,9-2,5 g/L, tal como en el intervalo de 0,9-2,2 g/L, y la concentración C_1 está típicamente en el intervalo de 4,0-10,0 g/L, tal como en el intervalo de 4,5-8,0 g/L.
- 45 [0017] Como se ha mencionado anteriormente, algunas veces es ventajoso para modificar ligeramente la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales en el curso de la fase de producción, por ejemplo, variando la concentración dentro de una de los intervalos mencionados anteriormente, por ejemplo, en el intervalo de 0,2-3,5 g/L, tal como en el intervalo de 0,7-3,0 g/L, por ejemplo, en el intervalo de 0,9-2,5 g/L, tal como en el intervalo de 0,9-2,2 g/L.
- 50 [0018] Alternativamente, la concentración se mantiene a un nivel sustancialmente fijo.
- [0019] El hidrolizado de proteínas vegetales se puede obtener de una de varias fuentes, por ejemplo, fuentes comerciales. Tipos típicos de hidrolizados son hidrolizado de proteínas de soja, hidrolizados de proteínas de trigo, hidrolizado de proteínas de guisante, hidrolizado de proteínas de arroz, etc. La WO 01/23527 A1, que es por la presente incorporada por referencia, divulga la preparación y uso general de un hidrolizado de proteínas de soja. Preferiblemente, el hidrolizado de proteínas vegetales es hidrolizado de proteínas de soja.
- 55 [0020] La presente invención no se limita actualmente a la producción de un polipéptido particular o al uso de una célula eucariota particular. No obstante, ejemplos ilustrativos de polipéptidos pertinentes y células eucariotas útiles se proveen más adelante. No obstante, en alguno de las presentes formas de realización preferidas y más interesantes de la
- 60
- 65

invención, el polipéptido es un polipéptido del factor VII. Además, en tales formas de realización, la célula eucariota se selecciona típicamente de CHO, BHK, HEK293, células de mieloma, etc.

[0021] Así, una forma de realización preferida del aspecto principal de la invención se refiere a un método para producción a gran escala de un polipéptido del factor VII en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo

(i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y

(ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,

donde el primer líquido de cultivo celular comprende un hidrolizado de proteínas de soja en una concentración de 4,0-10,0 g/L, el segundo líquido de cultivo celular comprende un hidrolizado de proteínas de soja en una concentración de 0,2-3,5 g/L, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas de soja (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas de soja (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).

[0022] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producción a gran escala de un polipéptido del factor VII en células eucariotas contenido en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo

(i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y

(ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,

donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, tal como hidrolizado de proteínas de soja, y donde la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular está en el intervalo de 0,7-2,2 g/L. Preferiblemente, la concentración C_2 es dl en el intervalo de 0,9-2,2 g/L.

[0023] En una forma de realización, cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1, por ejemplo, en el intervalo de 2:1 a 10:1, tal como 2.5:1 a 8:1 o en el intervalo de 3:1 a 6:1. Preferiblemente, la concentración C_1 está en el intervalo de 4,0-10,0 g/L, tal como en el intervalo de 4,5-8,0 g/L.

[0024] Los resultados obtenidos hasta el momento indican que una concentración demasiado alta de hidrolizado de proteínas vegetales en la fase de producción irreversiblemente estropea el cultivo, conduciendo así a una fase de producción corta suficientemente eficaz (ver, por ejemplo, la figura 2, ♦, 5,0 g/L de hidrolizado), mientras que una concentración demasiado baja de hidrolizado de proteínas vegetales será desventajosa para el cultivo, pero en una manera reversible. Una concentración demasiado baja de hidrolizado de proteínas vegetales en la fase de producción es posible que cause una reducción en el número celular y así la concentración del producto, pero se ha demostrado que esto se puede superar aumentando ligeramente la concentración de hidrolizado de proteínas vegetales. Sin estar atado por cualquier teoría particular, se cree que el perfil para la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales ventajosamente tiene el siguiente perfil:

concentración alta en la fase de propagación (C_1);

concentración baja en la fase de producción - nivel A bajo (C_{2A});

concentración baja en la fase de producción - nivel B bajo (C_{2B});

concentración baja en la fase de producción - nivel A bajo (C_{2A});

concentración baja en la fase de producción - nivel B bajo (C_{2B});

etc.

[0025] Donde $C_1 \gg C_{2B} > C_{2A}$ y las concentraciones C_{2A} y C_{2B} están dentro de los intervalos de concentración especificados para C_2 , y donde el primera cambio de (C_{2A}) a nivel B bajo (C_{2B}) se conduce cuando una reducción gradual en el número celular se ha observado durante, por ejemplo, 2-5 días, y el cambio posterior de nivel B bajo (C_{2B}) a nivel A bajo (C_{2A}) se conduce cuando el número celular se ha restaurado a un nivel aproximadamente correspondiente al nivel antes de la reducción.

[0026] Preferiblemente, la concentración C_{2A} está en el intervalo de 0,2-2,0 g/L, tal como en el intervalo de 0,7-1,5 g/L, por ejemplo, en el intervalo de 0,9-1,3 g/L, tal como en el intervalo de 0,9-1,2 g/L, y la concentración C_{2B} está preferiblemente en el intervalo de 1,0-3,5 g/L, tal como en el intervalo de 1,1-3,0 g/L, por ejemplo, en el intervalo de 1,2-2,5 g/L, tal como en el intervalo de 1,2-2,2 g/L.

[0027] El término "líquido de cultivo" se destina para significar un líquido comprendiendo un cultivo de las células eucariotas en un medio de líquido adecuado. En una forma de realización importante, las células se inmovilizan por fijación sobre la superficie de microportadores sólidos o por fijación a o atrapamiento físico dentro de la estructura interna de microportadores macroporosos. Esto se explicará en más detalle más adelante.

Polipéptidos para producción a gran escala

[0028] Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a métodos pertinentes para el cultivo a gran escala mejorado de células eucariotas que expresan una o más proteínas de interés, ya sea a partir genes endógenos o después de la introducción en tales células de genes recombinantes que codifican la proteína. Tales proteínas incluyen, sin limitación, polipéptidos del factor VII; factor VIII; factor IX; factor X; proteína C; factor tisular; renina; hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona de estimulación del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona folículo-estimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o tipo de tejido plasminógeno activador (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalinasa; proteína humana macrófaga inflamatoria (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNsa; inhibina; activina; factor del crecimiento vascular endotelial (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor derivado de hueso neurotrófico (BDNF), neurotrofina-3; -4; -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento de nervio tal como factor de crecimiento derivado de las plaquetas NGF- β (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto tal como α -FGF y β -FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento de transformación (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, factor-I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I y IGF-II); proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, beta, y gama; factores de estimulación de colonias (LCRs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido-dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de deterioro; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una parte del revestimiento de SIDA; proteínas de transporte; receptores *homing*; *addressin*; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriores.

[0029] En formas de realización preferidas de la invención, el polipéptido es un polipéptido del factor VII.

[0030] En algunas formas de realización de este documento, las células usadas en la práctica de la invención son células humanas que expresan un gen del factor VII endógeno. En estas células, el gen endógeno puede estar intacto o puede haber sido modificado *in situ*, o una secuencia exterior al gen factor VII puede haber sido modificada *in situ* para alterar la expresión del gen del factor VII endógeno.

[0031] En otras formas de realización de este documento, células de cualquier fuente eucariota se crean genéticamente para expresar factor VII humano de un gen recombinante.

[0032] Como se utiliza en este caso, los términos "polipéptido del factor FVII" y "polipéptido de FVII" significa cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos 1-406 de factor VIIa humano de tipo salvaje (es decir, un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente US n°. 4,784,950), variantes de este al igual que polipéptidos relacionados con el factor VII, derivados del factor VII y conjugados del factor VII. Esto incluye variantes de FVII, polipéptidos relacionados con el factor VII, derivados del factor VII y conjugados del factor VII que muestran sustancialmente la misma actividad biológica o mejorada en relación al factor VIIa humano de tipo salvaje.

[0033] El término "Factor VII" se destina para abarcar polipéptidos del factor VII en sus formas de no divididas (zimógeno), al igual que aquellos que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas bioactivas respectivas, que puede designarse factor VIIa. Típicamente, factor VII se divide entre residuos 152 y 153 para producir factor VIIa.

[0034] Tales variantes del factor VII pueden mostrar propiedades diferentes en relación al factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión a fosfolípido, actividad específica alterada y similares.

[0035] Como se utiliza en este caso "FVIIa humano de tipo salvaje" es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente US n°. 4,784,950.

[0036] Como se utiliza en este caso "polipéptidos relacionados con el factor VII" abarcan polipéptidos, incluyendo variantes, en las que la actividad biológica del factor VIIa se ha modificado sustancialmente, tal como reducido, en relación a la actividad del factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, factor VII o factor VIIa en los que alteraciones en la secuencia de aminoácidos específicas se han introducido que modifican o disgregan la bioactividad del polipéptido.

[0037] El término "derivado del factor VII" como se utiliza en este caso, se destina para designar un FVII que muestra el polipéptido sustancialmente con la misma actividad biológica o mejorada en relación al factor VII de tipo salvaje, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido progenitor se ha modificado genéticamente y/o químicamente y/o enzimáticamente, por ejemplo, por alquilación, glicosilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar. Este incluye, pero no se limita a, factor VIIa humano PEGilado, factor VIIa humano de cisteína PEGilado

FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
 K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
 K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 5 K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII,
 K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-
 10 FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII,
 F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-
 FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII,
 15 F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII,
 F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII,
 20 F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII,
 F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,
 F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,
 25 F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII,
 F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,
 30 F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,
 35 F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,
 40 F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
 45 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A- Factor VII, S60A-Factor VII; R152E-Factor VII, S344A-
 Factor VII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII,
 K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII con sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de
 233Tr a 240Asn; FVII con sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cis; y
 50 FVII con sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de 153Ile a 223Arg.

[0042] Así, variantes de sustitución en un polipéptido del factor VII incluyen, sin sustituciones de limitación en posiciones
 P10; K32; L305; M306; D309; L305; L305; F374; V158; M298; V158; E296; K337; M298; M298; S336; S314; K316;
 K316; F374; S52; S60; R152, 5344; T106; K143; N145; V253; R290; A292; G291; R315; V317, y sustituciones,
 55 adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240 o de R304 a C329 o de I153 a R223, o
 combinaciones de estos, en particular variantes como P10Q, K32E, L305V, M306D, D309S, L305I, L305T, F374P,
 V158T, M298Q, V158D, E296V, K337A, M298Q, M298K, S336G, S314E, K316H, K316Q, F374Y, S52A, S60A, R152E,
 S344A, T106N, K143N, N145T, V253N, R290N, A292T, G291N, R315N, V317T, y sustituciones, adiciones o deleciones
 en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240, o de R304 a C329, o de I153 a R223, o combinaciones de estos.
 60

[0043] En algunas formas de realización, el polipéptido del factor VII es factor VIIa humano (hFVIIa), preferiblemente
 factor VIIa humano (rhVIIa) hecho de forma recombinante.

[0044] En otras formas de realización, el polipéptido del factor VII es una variante de secuencia del factor VII.

[0045] En algunas formas de realización, el polipéptido del factor VII tiene una glicosilación diferente a la del factor VII humano de tipo salvaje.

Células

5

[0046] En la práctica de la presente invención, las células son células eucariotas, más preferiblemente una línea celular de eucariota establecida, incluyendo, sin limitación, CHO (p. ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK), y líneas celulares 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⁻ts13 BHK (Waechter y Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 79:1106-1110, 1982), de ahora en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo Número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular tk⁻ts13 BHK está también disponible de ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Una línea celular CHO preferida es la línea celular CHO K1 disponible de ATCC bajo número de acceso CCL61.

10

15

[0047] Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep O (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); DUKX células (línea celular CHO) (*Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 77:4216-4220, 1980) (DUKX células también siendo referido como DXB11 células), y DG44 (línea celular CHO) (célula, 33: 405, 1983, y célula somática y genética molecular 12: 555, 1986). También útiles son células 3T3, células *Namalwa*, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En algunas formas de realización, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tal como, por ejemplo, células que expresan un espectro diferente cualitativa o cuantitativamente de enzimas que catalizan modificación postraduccional de proteínas (p. ej., enzimas de glicosilación tal como transferasas de glicosil y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tal como pro péptidos) del tipo celular de donde derivan. Líneas celulares de insecto adecuadas también incluyen, sin limitación, líneas celulares de lepidópteros, tal como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (ver, por ejemplo, US 5,077,214).

20

25

[0048] En algunas formas de realización, las células usadas en la práctica la invención son capaces de crecer en los cultivos de suspensión. Como se usan aquí, células competentes en suspensión son aquellas que pueden crecer en la suspensión sin formar grandes agregados firmes, es decir, células que están monodispersas o crecen en agregados sueltos con solo unas células por agregado. Suspensión de células competentes incluyen, sin limitación, células que crecen en la suspensión sin adaptación o manipulación (tal como, por ejemplo, células hematopoyéticas o células linfoides) y células que se han hecho competentes en suspensión por adaptación gradual de células dependientes de fijación (tal como, por ejemplo, epitelial o células de fibroblasto) a crecimiento en suspensión.

30

35

[0049] Las células usadas en la práctica de la invención pueden ser células de adhesión (también conocidas como células dependientes de fijación o dependientes de anclaje). Como se utiliza en este caso, células de adhesión son aquellas que necesitan adherirse o anclarse ellas mismas a una superficie adecuada para propagación y crecimiento. En una forma de realización de la invención, las células usadas son células de adhesión. En estas formas de realización, las fases de propagación y la fase de producción incluye el uso de microportadores. Las células de adhesión usadas deberían ser capaces de migrar sobre los portadores (y en la estructura interior de los portadores si un portador macroporoso se usa) durante la fase(s) de propagación y para migrar a portadores nuevos cuando se transfieren al biorreactor de producción. Si las células de adhesión no son suficientemente capaces de migrar a nuevos portadores por ellas mismas, se pueden liberar de los portadores por contacto de los microportadores que contienen células con enzimas proteolíticas o EDTA. El medio usado (particularmente cuando está libre de componentes derivados de animales) debería además contener componentes adecuados para permitir células de adhesión; medios adecuados para cultivo de células de adhesión están disponibles de proveedores comerciales, como, por ejemplo, Sigma.

40

45

[0050] Las células pueden ser también células adaptadas a suspensión o suspensión de células competentes. Si tales células se usan, la propagación de células se puede realizar en la suspensión, así microportadores se usan solo en la fase de propagación final en el vaso de cultivo de producción mismo y en la fase de producción. En el caso de células adaptadas a suspensión, los microportadores usados son portadores típicamente macroporosos donde las células se fijan mediante atrapamiento físico dentro de la estructura interna de los portadores.

50

[0051] En tales formas de realización, la célula eucariota se selecciona típicamente de células CHO, BHK, HEK293, de mieloma, etc.

55

Procedimientos de cultivo celular

[0052] Los métodos de la invención se realizan típicamente en un vaso de cultivo agitado y un tipo de proceso basado en microportador se emplea preferiblemente. En el proceso a base de microportador las células han emigrado en 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 a base de microportador, las células eucariotas, los microportadores y el líquido de cultivo celular se suministran en un vaso de cultivo inicialmente. En los siguientes días, líquido de cultivo celular adicional puede suministrarse si el volumen de cultivo no se portó al volumen de trabajo final del vaso del inicio. Durante el siguiente periodo, recogida periódica del sobrenadante del cultivo que contiene el producto y sustitución con líquido de medio nuevo se realiza, hasta que el cultivo finalmente se termina. Cuando se

60

65

recoge sobrenadante con producto, la agitación, por ejemplo, agitación, del cultivo se detiene y se le permite a los portadores con célula sedimentar seguido de que parte del cultivo celular con producto sobrenadante se quita.

5 [0053] Para mejorar los resultados totales del procedimiento, un paso de enfriamiento puede preferiblemente aplicarse antes de recogida del sobrenadante con producto, ver, por ejemplo, WO 03/029442. En algunas formas de realización, el líquido de cultivo se enfría a una temperatura entre aproximadamente 18°C y aproximadamente 32°C antes de permitir a los portadores sedimentar, o entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C, o entre aproximadamente 22°C y aproximadamente 28°C.

10 [0054] Otras variantes aplicables del procedimiento de cultivo celular se describen en WO 02/29084.

Pasos de propagación

15 [0055] Antes de alcanzar la fase de producción donde recogida regular de sobrenadante del cultivo que contiene el producto por otras operaciones de recuperación se realiza, las células se propagan según cualquier esquema o rutina que se puede adecuar a la célula particular en cuestión. La fase de propagación puede ser un único paso o un procedimiento de múltiples pasos. En un procedimiento de propagación de un paso las células se quitan del almacenamiento y se inoculan directamente en el vaso de cultivo con los microportadores, donde la producción va a tener lugar. En un procedimiento de propagación de múltiples pasos, las células se quitan del almacenamiento y se propagan a través de varios vasos de cultivo de tamaño creciente gradualmente hasta alcanzar el vaso de cultivo final con microportadores donde producción va a tener lugar. Durante los pasos de propagación, las células crecen bajo condiciones que se optimizan para crecimiento. Condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto, concentración de CO₂ disuelto, y similares, son aquellos conocidos por ser óptimos para la célula particular y serán aparentes a la persona experta o artesano dentro de este campo (ver, por ejemplo, *Animal Cell Culture: A Practical Approach 2ª Ed., Rickwood, D. and Hames, B.D., eds., Oxford University Press, New York (1992)*).

20 [0056] En un procedimiento, el proceso de cultivo celular se opera en un vaso de cultivo: las células se inoculan directamente en el vaso de cultivo con microportadores donde la producción va a tener lugar; las células se propagan hasta que una densidad de célula adecuada se alcanza y la fase de producción se inicia.

30 [0057] En otro método, el proceso de cultivo celular se opera en al menos dos vasos de cultivo diferentes: uno o más vaso(s) de cultivo de semilla (primer paso(s) de propagación) seguido por el vaso de cultivo de producción (último paso de propagación seguido de fase de producción). En el primer paso de propagación, las células que expresan el polipéptido deseado se inoculan en un vaso de cultivo de semilla con medio de cultivo y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad de sembrado de cruce mínima. Posteriormente, el cultivo de semilla propagada se transfiere al vaso de cultivo de producción con (a) medio de cultivo y (b) microportadores. En este vaso de cultivo las células se cultivan bajo condiciones en las que las células migran sobre la superficie de los portadores sólidos o el exterior y superficies interiores de los portadores macroporosos, y continúan para crecer en este último paso de propagación hasta que los portadores se colonizan completamente por las células. Durante este último paso de propagación, intercambio de medio se realiza permitiendo a los microportadores asentarse en el fondo del vaso de cultivo, después de lo cual un porcentaje predeterminado del volumen de tanque del medio se quita y un volumen de tanque de porcentaje correspondiente del medio fresco se añade al vaso. Los microportadores se resuspenden luego en el medio y este proceso de eliminación del medio y sustitución se repite a un intervalo predeterminado, por ejemplo, cada 24 horas. La cantidad de medio sustituido depende de la densidad celular y puede ser típicamente de 10-95%, preferiblemente de 25% a 80%, del volumen de tanque como se muestra en la tabla 1 de debajo.

40 [0058] Se entenderá que en un proceso donde la fase de propagación es un procedimiento de múltiples pasos, la propagación puede ocurrir en los vasos de cultivo de tamaño aumentado progresivamente hasta que un número suficiente de células se obtiene para la introducción del vaso de cultivo final. Por ejemplo, uno o más vasos de cultivo de semilla de 5 L, 50 L, 100 L o 500 L pueden utilizarse consecutivamente. Un vaso de cultivo de semilla tiene típicamente una capacidad de entre 5 L y 1000 L. Típicamente, células se inoculan en un vaso de cultivo de semilla a una densidad inicial de aproximadamente 0,2 a 0,4 x 10⁶ células/ml y se propagan hasta que el cultivo alcanza una densidad celular de aproximadamente 1,0 x 10⁶ células/ml. Típicamente, una densidad de sembrado de cruce mínima es entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 1,5 x 10⁶ células/ml.

55 [0059] Algunos de los puntos de ajuste que se adecúan para la producción de un polipéptido deseado, por ejemplo, factor VII, no son necesariamente adecuados para el crecimiento inicial de las células, bien en el cultivo de semilla o en los microportadores. Por ejemplo, temperatura, tensión de oxígeno disuelto, concentración de CO₂ disuelto y pH pueden ser diferentes para las dos fases. Los cambios del medio durante propagación se hacen para mantener las células vivas y creciendo, no para recoger el sobrenadante del cultivo para operaciones de recuperación.

60 [0060] Condiciones de cultivo posibles para el último paso de propagación en el vaso de cultivo final (con microportadores) se describen en la tabla 1, por debajo.

65

Tabla 1

Punto de ajuste	Intervalo	Intervalo preferido	Valor preferido A	Valor preferido B
Concentración de CO ₂ disuelto	80-200 mmHg	100-180 mmHg	120-180 mmHg	120-160 mm Hg
pH	6-8	6,6-7,6	7,0	7,0
Temperatura	28-40°C	34-38°C	35-37°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10- 90% de saturación	20-80% de saturación	50% de saturación	50% de saturación
Cambio de medio diario:				
- % de medio cambiado a	10-35% de medio cambiado a 0,4-1.0x10 ⁶ células /mL	25 % de medio cambiado a 0,4-1.0x10 ⁶ células /mL	25% de medio cambiado a 0,5x10 ⁶ células /mL	25% de medio cambiado a 0,5x10 ⁶ células /mL
- % de medio cambiado a	30-70% de medio cambiado a 0,7-3.0x10 ⁶ células /mL	50% de medio cambiado a 0,7-3,0x10 ⁶ células /mL	50% de medio cambiado a 1,0x10 ⁶ células /mL	50% de medio cambiado a 1,0x10 ⁶ células /mL
- % de medio cambiado a	60-90% de medio cambiado a 1,0-12.0x10 ⁶ células /mL	80% de medio cambiado a 1,0-12.0x10 ⁶ células /mL	80% de medio cambiado a 2,0-10x10 ⁶ células /mL	80% de medio cambiado a 2,0-10x10 ⁶ células /mL

Fase de producción

- 5 [0061] Además de las características y medidas definidas para los métodos de la presente invención, otras varias medidas necesitan ser tomadas para la producción para conseguir unos resultados satisfactorios como se describirá más adelante.
- 10 [0062] Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para inicio de fase de producción, es decir, para tener sobrenadante de cultivo con producto procesado abajo, 60- 95% del sobrenadante del cultivo se cosecha cada 24 horas, preferiblemente 80%. Este valor de densidad celular es típicamente 1-12 x 10⁶ células/ml. Puntos de ajuste se pueden cambiar a este punto y establecerse a valores adecuados para la producción del polipéptido deseado.
- 15 [0063] El intercambio de medio se realiza permitiendo a los microportadores asentarse en el fondo del tanque, después de lo cual el porcentaje seleccionado del volumen de tanque del medio se quita y un volumen de tanque de porcentaje correspondiente del medio fresco se añade al vaso. Entre 25 y 90% del volumen de tanque se sustituye típicamente; preferiblemente, 80% del volumen de tanque se sustituye con medio fresco. Los microportadores se resuspenden luego en el medio y este proceso de eliminación del medio y sustitución se repiten típicamente cada 10 a 48 horas; preferiblemente, cada 24 horas.
- 20 [0064] Un perfil de este aspecto del proceso se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Punto de ajuste	Intervalo	Intervalo preferido	Valor preferido C	Valor preferido D
Concentración de CO ₂ disuelto	80-200 mmHg	100-180 mmHg	120-180 mmHg	120-160 mm Hg
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO y 6,7-6,9 para BHK	7,0 para CHO y 6,7-6,9 para BHK
Temperatura	26-40°C	30-37°C	36°C	36°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90% de saturación	20-80% de saturación	50%	50%
- % de medio cambiado	25-90% de medio cambiado cada 10-48 horas	80% de medio cambiado cada 10-48 horas	80% de medio cambiado cada 24 horas	80% de medio cambiado cada 24 horas

[0065] Opcionalmente, una caída del punto de ajuste de temperatura del cultivo se puede emplear cuando introducción, y durante, la fase de producción.

5 [0066] Entrando en la temperatura de fase de producción, tensión de oxígeno disuelto, concentración de CO₂ disuelto, pH operativo y frecuencia de intercambio del medio se cambian típicamente a valores que son óptimos para la producción. Ejemplos de intervalos de temperatura y valores en el crecimiento y fase de producción, respectivamente, se pueden ver de las tablas 1 y 2. Una temperatura de aproximadamente 36°C se prefiere para una línea celular CHO durante la fase de producción.

10 Microportadores

[0067] Como se utiliza en este caso, microportadores son partículas que son suficientemente pequeñas para permitirles usarse en los cultivos de suspensión (con un índice de agitación que no causa daño de corte significativo a células). Son sólidos, porosos, o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento en la superficie. Microportadores pueden, por ejemplo, 15 sin limitación, ser a base de dextrano o celulosa, y sus superficies (superficies exterior e interior en caso de portadores porosos) pueden estar positivamente cargados. Detalles adicionales se pueden encontrar en la WO 02/29083 y en *Microcarrier cell culture, principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech. 18- 1140-62. Edition AA.*

[0068] En una serie de formas de realización, los microportadores tienen un diámetro de partícula total entre 20 aproximadamente 150 y 350 um; y tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En una serie de formas de realización, el microportador es un soporte sólido. Microportadores de sólido útiles incluyen, sin limitación, Cytodex 1™ y Cytodex 2™ (GE Healthcare). Portadores sólidos son particularmente adecuados para células de adhesión (células dependientes de anclaje).

[0069] En otra serie de formas de realización, el microportador es un portador macroporoso. Como se usan aquí, 25 portadores macroporosos son partículas, por ejemplo, a base de celulosa, que tienen las siguientes propiedades:

(a) Son suficientemente pequeñas para permitirles usarse en los cultivos de suspensión (con un índice de agitación que no causa daño de corte significativo a células); y (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño 30 suficiente para permitir a células migrar en los espacios interiores de la partícula. Sus superficies (exterior y interior) pueden en una forma de realización estar cargadas positivamente. En una serie de formas de realización, los portadores: (a) tienen un diámetro de partícula total entre aproximadamente 150 y 350 um; (b) tienen poros con un diámetro de abertura de poro medio de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 um; y (c) tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas formas de realización, la carga positiva se proporciona por grupos DEAE (N,N,dietilaminoetilo). Portadores útiles 35 macroporosos incluyen, sin limitación, Cytopore 1™ y Cytopore 2™ (GE Healthcare). Particularmente preferidos son portadores de Cytopore 1™, que tienen un diámetro de partícula medio de 230 um, un tamaño de poro medio de 30 um y una densidad de carga positiva de 1,1 meq/g.

40 Condiciones de cultivo a gran escala

[0070] Como se utiliza en este caso, un vaso de cultivo a gran escala tiene una capacidad de al menos 40 aproximadamente 100 L, preferiblemente al menos aproximadamente 500 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 L y de forma más preferida al menos aproximadamente 5000 L. Cuando el proceso de cultivo celular se opera en al menos dos vasos de cultivo diferentes, tal como uno o más vaso(s) de cultivo de semilla (primer 45 paso(s) de propagación) seguido por el vaso de cultivo de producción (último paso de propagación seguido de fase de producción), luego el proceso implica típicamente transferencia aproximadamente de 50 L del cultivo de semilla propagada (teniendo aproximadamente 1,0 x 10⁶ células/ml) en un vaso de cultivo de 500L con 150 L de medio de cultivo. El cultivo a gran escala se mantiene bajo condiciones apropiadas de, por ejemplo, temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT), concentración de CO₂ disuelto, e índice de agitación, y el volumen se aumenta gradualmente 50 añadiendo medio al vaso de cultivo. En caso de un proceso microportador, el vaso de cultivo también comprende una cantidad de microportadores correspondiente a una concentración de microportador final en el intervalo de 1 a 10 g/L. Después de la transferencia, las células típicamente migran sobre la superficie de los portadores o en el interior de los portadores en las primeras 24 horas.

55 Medio

[0071] Los términos "líquido de cultivo celular" y "medio de cultivo" (o simplemente "medio") se refieren a una solución 60 nutriente usada para crecimiento de células eucariotas 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 contribuyendo a la osmolalidad del medio; (2) una fuente de energía, normalmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa; (3) todos aminoácidos esenciales, y normalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos; (4) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos requeridos en concentraciones bajas; y (5) oligoelementos, donde oligoelementos se definen como 65 compuestos inorgánicos que se requieren típicamente en concentraciones muy bajas, normalmente en el intervalo micromolar. La solución nutriente puede opcionalmente complementarse con uno o más de los componentes de cualquiera de las siguientes categorías: (a) hormonas y otros factores de crecimiento como, por ejemplo, insulina,

transferrina y factor de crecimiento epidérmico; e (b) hidrolizados de proteínas y tejidos. Preferiblemente, el medio de cultivo celular no contiene ningún componente de origen animal.

5 [0072] De manera importante, el líquido de cultivo celular comprende un hidrolizado de proteínas vegetales tal y como se define además anteriormente.

10 [0073] La presente invención abarca cultivo de células eucariotas en medio carente de componentes derivados de animales. Como se utiliza en este caso, componentes "derivados de animales" son cualquier componente que se produce en un animal intacto (como, por ejemplo, proteínas aisladas y purificadas de suero), o producidos usando componentes producidos en un animal intacto (como, por ejemplo, un aminoácido hecho usando una enzima aislada y purificada de un animal para hidrolizar una fuente de material 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 se produce, *in vitro* en el cultivo celular (como, por ejemplo, en una levadura recombinante o célula bacteriana o en una línea celular eucariota continua establecida, recombinante o no), en medios carentes de componentes que se producen en, y se aíslan y se purifican de un animal intacto no es un componente "derivado de animal" (como, por ejemplo, insulina producida en una levadura o una célula bacteriana, o insulina producida en una línea celular de mamífero establecida, 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 produce en una célula recombinante en un medio carente de componentes derivados de animal (como, por ejemplo, insulina producida en una levadura o célula 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 son producidas por recombinación; tal medio, no obstante, no contiene, por ejemplo, suero animal o proteínas u otros productos purificados de suero animal. Tal medio puede, por ejemplo, contener uno o más componentes derivados de plantas. Cualquier medio de cultivo celular, en particular, uno carente de componentes derivados de animal, que permite crecimiento celular y mantenimiento bajo las condiciones de la invención puede utilizarse. Típicamente, el medio contiene agua, un regulador de osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente inorgánica o recombinante de hierro, 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 ("sin proteínas"). Medio carente de componentes derivados de animal y/o proteínas están disponibles de proveedores comerciales, como, por ejemplo, Sigma, SAFC Biosciences, Gibco and Gemini.

35 [0074] Además de componentes convencionales, un medio adecuado para producir factor VII o polipéptidos relacionados con el factor VII contiene vitamina K, que se requiere para γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico en el factor VII, en una concentración entre aproximadamente 0,1-50 mg/L, preferiblemente entre aproximadamente 0,5-25 mg/L, más preferiblemente entre aproximadamente 1-10 mg/L y de forma más preferida aproximadamente 5 mg/L.

[0075] Medios adecuados para uso en la presente invención están disponibles de proveedores comerciales como, por ejemplo, Gibco y SAFC Biosciences.

40 [0076] En una forma de realización, el medio está compuesto como se muestra en la tabla 3a.

[0077] La tabla de debajo (tabla 3a) es una composición de un medio adecuado para uso en la presente invención.

Tabla 3a

COMPONENTE	Intervalo (mg/L)
Cloruro sódico	0-70,000
Cloruro de potasio	0-3118
Monohidrato de dihidrógeno de fosfato de sodio	0-625
Hidrogenocarbonato de sodio	0-27
Hidrógeno fosfato de disodio anhidro	0-710
Heptahidrato de hidrógeno fosfato de disodio	0-1340
Cloruro de magnesio anhidro	0-287
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0-610
Sulfato magnésico anhidro	0-488
Heptahidrato de sulfato magnésico	0-1000
Cloruro de calcio anhidro	0-1166

ES 2 380 485 T3

Pentahidrato de sulfato de cobre	0-0,014
Heptahidrato de sulfato ferroso	0-4,17
Nonahidrato de nitrato férrico	0-0,5
Citrato férrico	0-123
Heptahidrato de sulfato de zinc	0-0,44
Dextrosa anhidro	0-45,000
Ácido linoleico	0-12
Insulina	0-50
DL 68 ácido tióctico	0-9
L-alanina	0-50
Cloruro de L-arginina	0-5500
Monohidrato de L-asparagina	0-6010
Ácido L-aspártico	0-1100
Monohidrato de hipocloruro de L-cisteína	0-1200
Ácido L-glutámico	0-2500
Glicina	0-190
Monohidrato de hidrocloreuro de L-histidina	0-2200
L-iso-leucina	0-750
L-leucina	0-1800
Hidrocloreuro de L-lisina	0-2400
L-metionina	0-1380
L-fenilalanina	0-1600
L-prolina	0-1150
L-serina	0-4300
L-treonina	0-1800
L-triptófano	0-2100
Dihidrato de disodio de L-tirosina	0-900
L-valina	0-1800

Tabla 3a

COMPONENTE	Intervalo (mg/L)
Dicloruro de L-cistina	0-320
Hipoxantina de sodio	0-25
Dihidrocloreuro de putrescina	0-1
Piruvato de sodio	0-2300
D-biotina	0-3
Pantotenato de D-calcio	0-60
Acido fólico	0-70
I-inositol	0-700

Nicotinamida	0-50
Cloruro de colina	0-450
Hidrocloruro de piridoxina	0-25
Riboflavina	0-3
Hidrocloruro de tiamina	0-35
Timidina	0-4
Vitamina B12	0-50
Hidrocloruro piridoxal	0-60
Glutaciona	0-50
Selenita sódica	0-0.5
Acido L-ascórbico	0-50
Plurónico F68	0-10,000
Vitamina K	0-50
Dextrano T 70	0-1000
Hidrolizado de proteínas vegetales	200-10000
Ácido oleico de lípidos	0-15
Factores de crecimiento HGR, IGF, EGF	0-50

[0078] En una forma de realización, el medio está compuesto como se muestra en la tabla 3b.

[0079] La tabla de debajo (tabla 3b) es una composición de un medio adecuado para uso en la presente invención.

5

Tabla 3b

COMPONENTE	Intervalo (mg/L)
Cloruro sódico	0-70,000
Cloruro de potasio	0-3118
Monohidrato de dihidrógeno de fosfato de sodio	0-625
Hidrogenocarbonato de sodio	0-5000
Hidrógeno fosfato de disodio anhidro	0-710
Heptahidrato de hidrógeno de fosfato de disodio	0-1340
Cloruro de magnesio anhidro	0-287
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0-610
Sulfato magnésico anhidro	0-488
Heptahidrato de sulfato magnésico	0-1000
Cloruro de calcio anhidro	0-1166
Pentahidrato de sulfato de cobre	0-0.014
Heptahidrato de sulfato ferroso	0-4.17
Nonahidrato de nitrato férrico	0-0.5
Citrato férrico	0-123
Heptahidrato de sulfato de zinc	0-0.44
Dextrosa anhidro	0-45,000

ES 2 380 485 T3

Ácido linoleico	0-12
Insulina	0-50
DL 68 ácido tióctico	0-9
L-alanina	0-50
Cloruro de L-arginina	0-5500
Monohidrato de L-asparaguina	0-6010
Acido L-aspártico	0-1100
Monohidrato de hidrocloreto de L-cisteína	0-1200
Ácido L-glutámico	0-2500
Glicina	0-190
Monohidrato de hidrocloreto de L-histidina	0-2200
L-isoleucina	0-750
L-leucina	0-1800
Hidrocloreto de L-lisina	0-2400
L- metionina	0-1380
L- fenilalanina	0-1600
L-prolina	0-1150
L-serina	0-4300
L- treonina	0-1800
L- triptófano	0-2100
Dihidrato disodio de L-tirosina	0-900
L-valina	0-1800

Tabla 3b

COMPONENTE	Intervalo (mg/L)
Dihidrocloreto de L-cistina	0-320
Hipoxantina de sodio	0-25
Dihidrocloreto de putrescina	0-1
Piruvato de sodio	0-2300
D-biotina	0-3
Pantotenato de D-calcio	0-60
Ácido fólico	0-70
I-inositol	0-700
Nicotinamida	0-50
Colina cloruro	0-450
Hidrocloreto de piridoxina	0-25
Riboflavina	0-3
Hidrocloreto de tiamina	0-35
Timidina	0-4

Vitamina B12	0-50
Hidrocloruro piridoxal	0-60
Glutaciona	0-50
Selenita sódica	0-0.5
Acido L-ascórbico	0-50
Plurónico F68	0-10,000
Vitamina K	0-50
Dextrano T 70	0-1000
Hidrolizado de proteínas vegetales	200-10000
Ácido oleico de lípidos	0-15
Factores de crecimiento HGR, IGF, EGF	0-50

[0080] El medio es preferiblemente un medio carente de componentes derivados de animal.

5 [0081] En una forma de realización el medio es un medio disponible comercialmente sin proteína carente componentes derivados de animal CHO (SAFC Biosciences).

10 [0082] En algunas formas de realización, las células usadas en la práctica de la presente invención se adaptan a crecimiento de suspensión en medio carente de componentes derivados de animal, como, por ejemplo, medio carente de suero. Tales procedimientos de adaptación se describen, por ejemplo, Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), *Kluwer Academic Publishers*, pp. 619-623, 1995 (células BHK y CHO); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11:117-120, 199 (células de insecto); Keen, *Cytotechnol.* 17:203-211, 1995 (células de mieloma); Berg et al., *Biotechniques* 14:972-978, 1993 (células 293 de riñón humano). En una forma de realización particularmente preferida, las células huésped son células BHK 21 o CHO o HEK 293 que han sido creadas genéticamente para expresar factor VII humano y que han sido adaptadas para crecer en ausencia de suero o
15 componentes derivados de animal.

Vaso de cultivo

20 [0083] Vasos de cultivo aplicables en la presente invención pueden, por ejemplo, basarse en fermentadores de tanque agitado convencionales (CSTR) donde agitación se obtiene por medio de tipos de propulsores convencionales o fermentadores de agitación por aire donde agitación se obtiene introduciendo aire desde el fondo del vaso. Entre los otros parámetros que se controlan típicamente dentro de límites específicos están pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT), concentración de CO₂ disuelto y temperatura. La tensión de oxígeno disuelto se puede mantener por, por ejemplo, burbujeo con oxígeno puro. La concentración de CO₂ disuelto se puede mantener por burbujeo con aire. El
25 medio de control de temperatura es típicamente agua, enfriado o calentado según sea necesario. El agua se puede pasar a través de una envoltura que rodea el vaso o a través de una bobina de canalización sumergida en el cultivo.

30 [0084] El término "vaso de cultivo" se puede utilizar de forma intercambiable con, "tanque" "reactor", "biorreactor" y "fermentador".

Tratamiento posterior

35 [0085] Un vez el medio ha sido quitado del vaso de cultivo, se puede someter a uno o más pasos de tratamiento para obtener la proteína deseada, incluyendo, sin limitación, centrifugado o filtración para eliminar células que no estaban inmovilizadas en los portadores; 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.*

40 [0086] Purificación de factor VII o polipéptidos relacionados con el factor VII puede implicar, por ejemplo, cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-factor VII (ver, por ejemplo, Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261:11097, 1986 y *Thim et al., Biochem.* 27:7785, 1988) y activación por escisión proteolítica, usando factor Xla u otras proteasas con especificidad de tipo tripsina, tal como, por ejemplo, factor IXa, calicreína, factor Xa y trombina. Ver, por ejemplo, Osterud et al., *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, patente U.S. n° 4,456,591 y Hedner et al., *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983). Alternativamente, factor VII se puede activar pasando este a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Farmacia) o similar.

[0087] Los siguientes ejemplos se destinan como ilustraciones no limitativas de la presente invención.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: Producción sin suero de factor VII (cultivo a escala piloto pequeño)**

[0088] El siguiente experimento se realizó para producir factor VII en un pequeño cultivo a escala piloto (20 L). Un esquema de tratamiento del proceso de cultivo se muestra en la figura 1. La parte de producción del proceso es un proceso de alta densidad celular (HCD) en el que las células se retienen en el fermentador mediante microportadores.

10

[0089] Células se descongelaron a partir de un banco celular de la línea celular productora de FVII. La línea celular productora de VII fue una línea celular CHO K1 modificada con gen de codificación de factor VII y adaptada para crecer en suspensión sin suero en ausencia de componentes derivados de animal. Después de descongelación, las células se propagaron consecutivamente en los frascos giratorios de tamaño creciente en un medio líquido libre de componentes derivados de animal. El medio usado para propagación tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de alrededor de 5,0 g/L. Como el número celular aumentó, el volumen aumentó gradualmente por adición de medio nuevo. El medio usado estuvo libre de suero y otros componentes derivados de animal. Cuando el volumen alcanzó 4 L y el número de células alcanzó $= 0,8 * 10^6$ /ml, el contenido de los frascos giratorios se transfirieron en un fermentador de tanque agitado de 20 L (fermentador de producción a escala piloto pequeño). El fermentador de producción contuvo portadores macroporosos Cytopore (GE Healthcare), y después de transferencia de células al fermentador de producción, las células se inmovilizaron en los portadores dentro de 24 horas. El volumen en el fermentador de producción aumentó gradualmente por adición de medio nuevo mientras el número celular aumentaba. Después de algunos días, cuando el volumen alcanzó 20 L, la fase de producción se inició. El medio usado en el fermentador de producción tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de 1,25 g/L (forma de realización a) o 5,0 g/L (referencia).

25

[0090] Durante la fase de producción un intercambio de medio se realizó cada 24 horas: agitación se detuvo para permitir sedimentación de los portadores, y aproximadamente 80% del sobrenadante del cultivo es recogido luego y se substituyó con medio nuevo. El sobrenadante del cultivo recogido se transfirió para tratamiento de flujo descendente. El proceso se llevó a cabo en la fase de producción de esta manera durante diferentes semanas. El cultivo en el fermentador de producción se mantuvo a una temperatura de alrededor de 36°C, a un nivel de oxígeno disuelto de alrededor de 50% de saturación con aire, y a un nivel de CO₂ disuelto de alrededor de 100-150 mmHg. Durante la fase de producción la densidad celular alcanzó $1-2 * 10^7$ células/ml y la concentración de FVII concentración en la recogida diaria 10-20 mg/L. El pH se mantuvo a sobre 6,70.

35

[0091] Los gráficos en la figura 2 muestran resultados de cultivos microportadores fermentadores de 20L (fermentadores a escala piloto pequeños). Los gráficos ilustran una diferencia en la estabilidad con respecto a productividad del factor VII cuando se usa 1,25 g/L de hidrolizado de soja en vez de 5,0 g/l de hidrolizado de soja en el fermentador de producción.

40

Ejemplo 2: Producción sin suero de factor VII (cultivo a escala piloto grande)

[0092] Células se descongelaron de un banco celular de la línea celular productora de FVII. La línea celular productora de FVII fue una línea celular CHO K1 modificada con gen que codifica factor VII y adaptada para crecer en la suspensión sin suero en ausencia de componentes derivados de animal. Después de descongelación, las células se propagaron consecutivamente en los frascos giratorios de tamaño creciente en un medio líquido libre de componentes derivados de animal. El medio usado para propagación tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de alrededor de 5,0 g/L. Mientras el número celular aumentaba, el volumen aumentó gradualmente por adición de medio nuevo. El medio usado estuvo libre de suero y otros componentes derivados de animal. Cuando el volumen alcanzó 4 L y el número celular alcanzó $= 0,8 * 10^6$ /ml, el contenido de los frascos giratorios se transfirieron en un fermentador de tanque agitado de 50 L (fermentador de semilla). El medio usado para propagación en el fermentador de 50 L tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de alrededor de 5,0 g/L. Mientras el número celular aumentaba, el volumen aumentó gradualmente por adición de nuevo medio. El medio usado estuvo libre de suero y otros componentes derivados de animal. Cuando el volumen alcanzó 50 L y el número celular alcanzó $= 1,0 * 10^6$ /ml, el contenido del fermentador de 50 L se transfirió en un fermentador de tanque agitado de 500 L (fermentador de producción a escala piloto grande). El fermentador de producción contuvo portadores macroporosos Cytopore (GE Healthcare), y después de transferencia de células al fermentador de producción, las células se inmovilizaron en los portadores dentro de 24 horas. El volumen en el fermentador de producción aumentó gradualmente por adición de medio nuevo mientras el número de células aumentaba. Después de algunos días, cuando el volumen alcanzó 450 L, la fase de producción se inició. El medio usado en la fase de propagación del fermentador de producción tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de 5 g/L, mientras el medio usado en la fase de producción tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja de 1 g/L (forma de realización a). En una ejecución de referencia el medio tuvo una concentración de hidrolizado de proteínas de soja en la propagación al igual que fase de producción.

60

[0093] Durante la fase de producción un intercambio de medio se realizó cada 24 horas: agitación se detuvo para permitir sedimentación de los portadores, y aproximadamente 80% del sobrenadante del cultivo se recogido luego y se

65

5 sustituyó con medio nuevo. El sobrenadante del cultivo cosechado se transfirió para tratamiento de flujo descendente. El proceso se llevó a cabo en la fase de producción de esta manera durante diferentes semanas. El cultivo en el fermentador de producción se mantuvo a una temperatura de alrededor de 36°C, a un nivel de oxígeno disuelto de alrededor de 50% de saturación con aire, y a un nivel de CO₂ disuelto de alrededor de 100-150 mmHg. Durante la fase de producción la densidad celular alcanzó 1-2 x 10⁷ células/ml y la concentración de FVII en la recogida diaria 10-20 mg/L. El pH se mantuvo por encima de 6,70.

10 [0094] Los gráficos en la figura 3 muestran resultados de cultivos microportadores en fermentadores de 500 L (fermentadores a escala piloto grande). Los gráficos ilustran una diferencia en la estabilidad con respecto a productividad del factor VII cuando se usa 1 g/L de hidrolizado de soja en vez de 5 g/l de hidrolizado de soja en la fase de producción del fermentador de producción.

Ejemplo 3: Producción sin suero de factor VII (gran escala)

15 [0095] Células se descongelan a partir de un banco celular de la línea celular productora de FVII. La línea celular productora de FVII es una línea celular CHO modificada con gen de codificación de factor VII y adaptada para crecer en suspensión libre de suero. Después de la descongelación, las células se propagan consecutivamente en los frascos giratorios de tamaño creciente. Mientras el número celular aumenta, el volumen aumenta gradualmente por adición de medio nuevo. El medio usado está libre de suero y otros componentes derivados de animal. Finalmente, 4 L de cultivo giratorio se transfieren al primer paso fermentador de semilla (fermentador de 50 L). Mientras el número celular aumenta, el volumen en el fermentador de semilla aumenta gradualmente a 50 L. Los 50 L de cultivo de semilla se transfieren luego al segundo paso fermentador de semilla (fermentador de 500 L). Mientras el número celular aumenta en el fermentador de semilla de 500 L, el volumen se aumenta gradualmente a 500 L. El fermentador de producción (5000 L) contiene portadores macroporosos Cytopore (GE Healthcare), y después de transferencia de células al fermentador de producción, las células se inmovilizan en los portadores dentro de 24 horas. El volumen en el fermentador de producción se aumenta gradualmente por adición de medio nuevo mientras el número celular aumenta. El medio en los frascos giratorios, fermentadores de semilla y la fase de propagación del fermentador de producción tiene una concentración (C₁) de hidrolizado de soja de aproximadamente 5 g/L. Después de algunos días, cuando el volumen alcanza 4500 L, la fase de producción se inicia. Durante la fase de producción intercambio de medio se realiza cada 24 horas: agitación se detiene para permitir sedimentación de los portadores, y aproximadamente 80% del sobrenadante del cultivo se recoge luego y se sustituye con medio nuevo. El medio en la fase de producción tiene una concentración (C₂) de hidrolizado de soja de aproximadamente 1 g/L. El sobrenadante del cultivo recogido se transfiere para tratamiento de flujo descendente. El proceso se lleva a cabo en la fase de producción de esta manera durante diferentes semanas. El cultivo en el fermentador de producción se mantiene a una temperatura de alrededor de 36°C, a un nivel de oxígeno disuelto de alrededor de 50% de saturación con aire, y a un nivel de CO₂ disuelto en el intervalo de 100-180 mmHg, como, por ejemplo, 100-150 mm Hg. Todos los biorreactores (50 L, 500 L, 5000 L) se instrumentan para control de temperatura, oxígeno disuelto (burbujeo de oxígeno a través de microsparger) índice de agitación, índice de aireación de espacio de aire y pH (control hacia abajo por adición de gas CO₂ para espacio de aire, no control hacia arriba por adición de base). Además, el fermentador de producción (5000 L) se instrumenta para control de CO₂ disuelto. Medición de CO₂ Online se realiza mediante un instrumento YSI 8500 CO₂. El nivel de CO₂ se controla por burbujeo de aire atmosférico en el líquido a través de un tubo según la señal de CO₂. El índice de burbujeo se fija a 0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO₂ está a o por debajo del punto de ajuste, y a 0,01-0,05 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO₂ está sobre el punto de ajuste. Durante la fase de producción la densidad celular alcanza 1-2 x 10⁷ células/ml, y la concentración de FVII en la recogida diaria 10-20 mg/L. El pH se mantiene a sobre 6,70.

REIVINDICACIONES

1. Método para producción a gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo
- 5 (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
- (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de medio de cultivo celular,
- 10 donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).
2. Método según la reivindicación 1, donde la proporción $C_1:C_2$ está en el intervalo de 2:1 a 10:1.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración C_2 está en el intervalo de 0,2-3,5 g/L.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración C_1 está en el intervalo de 4,0-10,0 g/L.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el hidrolizado de proteínas vegetales es hidrolizado de proteínas de soja.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido es un polipéptido del factor VII.
7. Método para producción a gran escala de un polipéptido del factor VII en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo
- 30 (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
- (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de medio de cultivo celular, donde el primer líquido de cultivo celular comprende un hidrolizado de proteínas de soja en una concentración de 4,0-10,0 g/L, el segundo líquido de cultivo celular comprende un hidrolizado de proteínas de soja en una concentración de 0,2-3,5 g/L, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas de soja (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas de soja (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1 ($C_1:C_2$).
- 35 8. Método para producción a gran escala de un polipéptido del factor VII en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo sin suero, dicho método comprendiendo
- 40 (i) una fase de propagación para dichas células, donde las células se propagan en un primer líquido de cultivo celular, y
- (ii) una fase de producción para dichas células, donde las células están presentes en un segundo líquido de cultivo celular,
- 45 donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, tal como hidrolizado de proteínas de soja, y donde la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular está en el intervalo de 0,7- 2,2 g/L.
9. Método según la reivindicación 8, donde la concentración C_2 está en el intervalo de 0,9-2,2 g/L.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde cada uno de los líquidos de cultivo celular comprenden un hidrolizado de proteínas vegetales, y donde la proporción entre la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_1) en el primer líquido de cultivo celular y la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales (C_2) en el segundo líquido de cultivo celular es al menos 1.5:1.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, donde la concentración C_1 está en el intervalo de 4,0-10,0 g/L.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 7 y 8-11, donde la concentración del hidrolizado de proteínas vegetales tiene el siguiente perfil:
- 60 concentración alta en la fase de propagación (C_1);
- concentración baja en la fase de producción - nivel A bajo (C_{2A});
- concentración baja en la fase de producción - nivel B bajo (C_{2B});
- concentración baja en la fase de producción - nivel A bajo (C_{2A});
- concentración baja en la fase de producción - nivel B bajo (C_{2B});
- etc.
- 65 donde $C_1 \gg C_{2B} > C_{2A}$ y las concentraciones C_{2A} y C_{2B} están dentro de los intervalos de concentración especificados para C_2 , y donde el primer cambio de nivel A bajo (C_{2A}) a nivel B bajo (C_{2B}) se realiza cuando se observa una reducción en el

número celular y el cambio posterior de nivel B bajo (C_{2B}) a nivel A bajo (C_{2A}) se realiza cuando el número celular se ha restaurado a un nivel aproximadamente correspondiente al nivel antes de la reducción.

Diagrama de flujo de procedimiento de cultivo de células

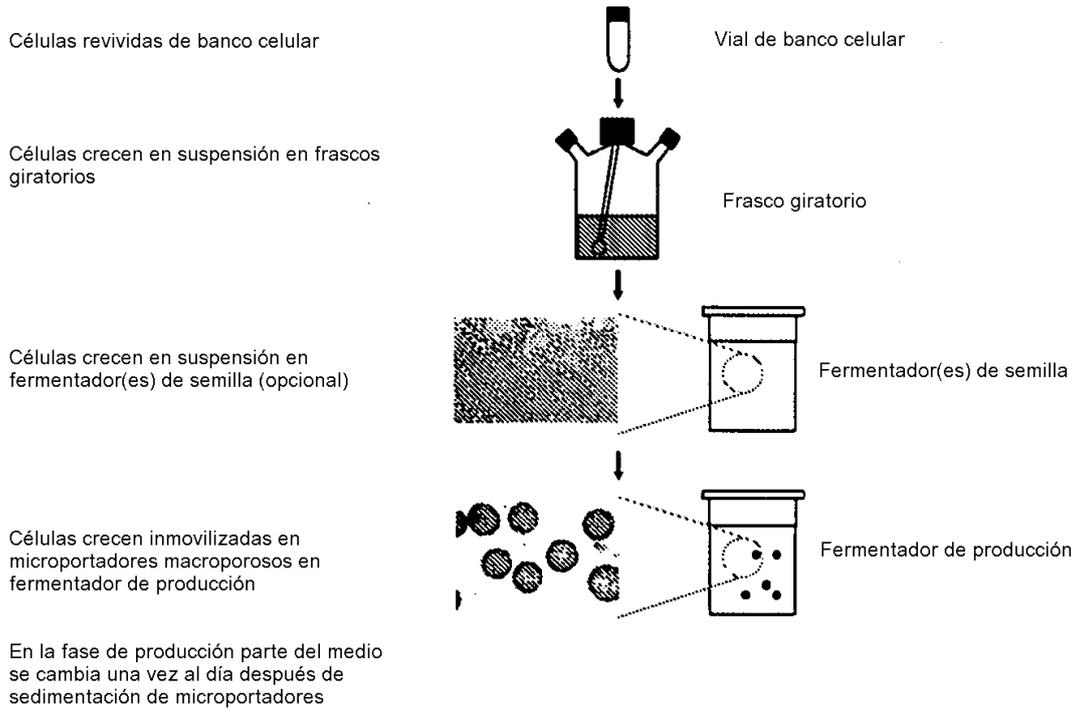


Fig. 1

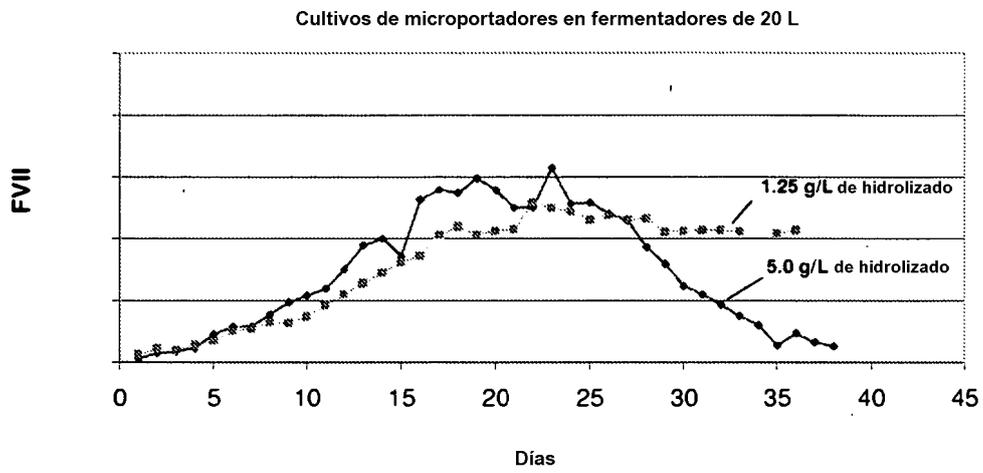


Fig. 2

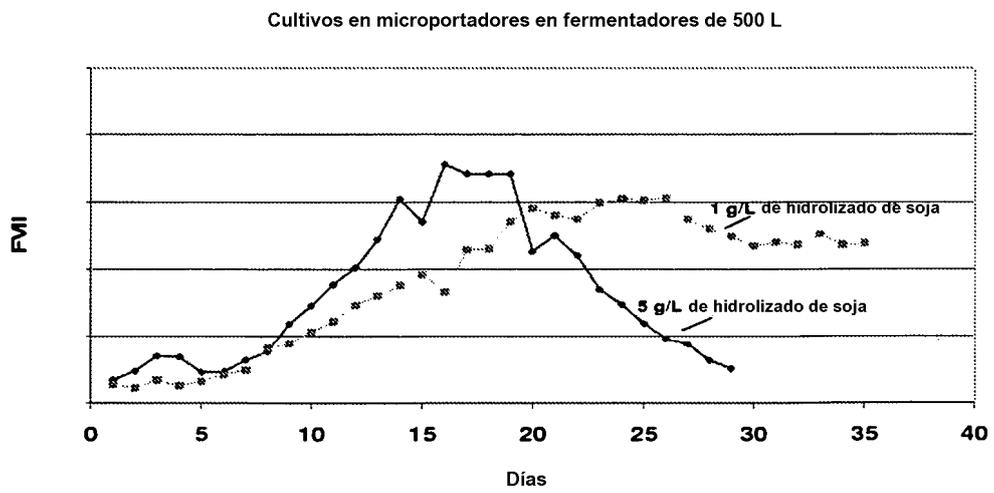


Fig. 3