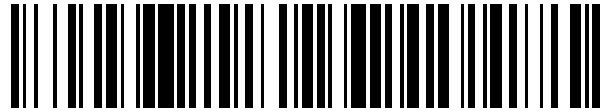


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 573**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2007 E 12160789 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2522717**

54 Título: **Medio de cultivo celular sin oligopéptidos**

30 Prioridad:

**04.01.2006 US 756419 P**

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

**09.07.2014**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)  
One Baxter Parkway  
Deerfield, IL 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 474 573 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**

Medio de cultivo celular sin oligopéptidos

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a medios de cultivo celular sin oligopéptidos que comprenden al menos 0,5 mg/l de una poliamina y a procedimientos para cultivar células en dichos medios de cultivo celular sin oligopéptidos que comprenden al menos 0,5 mg/l de una poliamina. La invención también se refiere a procedimientos para expresar al menos una proteína en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina y a procedimientos para producir al menos un virus en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.

**Antecedentes de la invención**

15 Para el cultivo de células, particularmente células eucariotas, y más específicamente células de mamífero, hay una necesidad constante de usar medios de cultivo especiales que proporcionen las sustancias nutrientes que se requieren para el crecimiento eficaz de las células y para la producción de productos biológicos, especialmente productos biofarmacéuticos, tales como, por ejemplo, proteínas recombinantes, anticuerpos, virus, antígenos víricos y partículas similares a virus. Para la producción eficaz de dichos productos biológicos es importante lograr una densidad celular óptima, además de un aumento de la propia expresión de proteínas con el fin de obtener el máximo rendimiento de productos.

20 Las formulaciones de medios de cultivo celular se han enriquecido con una variedad de aditivos, que incluyen componentes indefinidos de suero bovino fetal (SBF), varias proteínas derivadas de animales y/o hidrolizados de proteínas de origen bovino, además de hidrolizados de proteínas derivadas de plantas o levadura.

En general, el suero o las sustancias basadas en suero tales como, por ejemplo, albúmina, transferrina o insulina, pueden comprender agentes no deseados que pueden contaminar los cultivos celulares y los productos biológicos obtenidos de los mismos. Además, los aditivos derivados de suero humano tiene que probarse para todos los virus conocidos, que incluyen virus de la hepatitis y VIH, que pueden transmitirse mediante el suero. Además, el suero bovino y los productos derivados del mismo poseen el riesgo de contaminación por EEB. Además, todos los productos derivados del suero pueden estar contaminados por sustancias desconocidas. Si se usa suero o aditivos de proteína derivados de fuentes humanas o animales en cultivo celular, hay numerosos problemas (por ejemplo, la calidad variable en la composición de diferentes lotes y el riesgo de contaminación con micoplasma, virus o EEB), particularmente si las células se usan en la fabricación de fármacos o vacunas para administración humana.

Por tanto, se han hecho muchos intentos para proporcionar sistemas huésped y condiciones de cultivo eficaces que no requieran suero u otros compuestos de proteína animal.

40 Tales medios libres de suero se han desarrollado basándose en extractos de proteína derivados de plantas o levadura. Por ejemplo, los hidrolizados de soja son conocidos por ser útiles para los procedimientos de fermentación y pueden potenciar el crecimiento de muchos organismos, levaduras y hongos molestos. El documento WO 96/26266 describe que los digestos papaicos de harina de soja son una fuente de hidratos de carbono y nitrógeno y muchos de los componentes pueden usarse en cultivo de tejido. Franek y col. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688 - 692) describen los efectos promotores del crecimiento y la productividad de fracciones definidas de péptidos de hidrolizados de soja y de trigo.

50 El documento WO 96/15231 desvela un medio sin suero compuesto de un medio esencial mínimo sintético y un extracto de levadura para la propagación de células de vertebrado y un procedimiento de producción de virus. Una formulación de medio compuesta de un medio de cultivo celular basal que comprende un péptido de arroz y un extracto de levadura y un digesto enzimático de la misma, y/o un lípido de planta para el crecimiento de células animales, se desvela en el documento WO 98/15614. Un medio que comprende hidrolizado de soja purificado para el cultivo de células recombinantes se desvela en el documento WO 01/23527. El documento WO 00/03000 desvela un medio que comprende un hidrolizado de soja y un extracto de levadura, pero también requiere la presencia de formas recombinantes de proteínas animales, tales como factores de crecimiento.

60 El documento EP-A-0 481 791 describe un medio de cultivo bioquímicamente definido para cultivar células CHO manipuladas que está libre de proteína, lípido e hidrato de carbono aislados de una fuente animal, que comprende además una insulina recombinante o análogo de insulina, 1 % al 0,025 % en peso/volumen de peptona y putrescina de soja digeridas con papaína. El documento WO 98/08934 describe un cultivo celular eucariota sin suero que comprende péptidos de soja hidrolizados (1 - 1000 mg/l), 0,01 a 1 mg/l de putrescina y una variedad de componentes derivados de animal, que incluyen albúmina, fetuina, diversas hormonas y otras proteínas. En este contexto debe observarse que la putrescina también es conocida por estar comprendida en medios estándar como DMEM/Ham's F12 en una concentración de 0,08 mg/l.

65 Sin embargo, los hidrolizados de planta y/o levadura son mezclas indefinidas de oligopéptidos y otros componentes

y contaminantes desconocidos. Además, la calidad de lotes comercialmente disponibles de hidrolizados varía extremadamente. Como resultado, hay grandes variaciones en la producción de proteínas recombinantes o productos víricos (una variación de hasta un factor de 3) en función de los lotes de hidrolizados usados ("variación lote a lote"). Este inconveniente afecta a la proliferación de las células, además de la expresión de proteínas de cada célula.

En resumen, los medios conocidos en el estado de la técnica se enriquecerán con proteínas o extractos de péptidos derivados de animales, plantas o levadura; o con versiones recombinantes de proteínas tales como, por ejemplo, insulina, factor de crecimiento similar a insulina u otros factores de crecimiento.

Por tanto, existe la necesidad de un medio de cultivo celular que esté libre de proteínas y/u oligopéptidos animales, herbales y fúngicos con el fin de vencer los problemas anteriormente mencionados. Además, existe una actual necesidad de aumentar el rendimiento de proteínas recombinantes expresadas o cualquier otro producto de expresión, y de proporcionar un medio de cultivo celular óptimo para la producción de productos biológicos, tales como aquellos usados como productos farmacéuticos o vacunas en seres humanos.

### Resumen de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios de cultivo celular sin oligopéptidos. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos para cultivar células en dicho medio, además de procedimientos para la expresión eficaz de proteínas recombinantes y/o procedimientos para la producción eficaz de virus.

Es otro objetivo de la presente invención eliminar hidrolizados derivados de animal, planta y/o levadura y proporcionar medios que no comprendan ninguna proteína u oligopéptido complementario añadido.

Sorprendentemente, la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina a medio de cultivo celular proporciona un efecto ventajoso no solo promoviendo el crecimiento celular, sino también aumentando la expresión de proteínas y/o virus por célula. Dicho efecto ventajoso inesperado puede lograrse incluso en medios sin oligopéptido.

Además, el medio sin oligopéptido usado en un procedimiento según la presente invención permite el coherente crecimiento celular y elevado rendimiento de productos deseados, particularmente de proteínas diana tales como proteínas recombinantes y/o virus, independiente de la calidad o variaciones de lotes de cualquier hidrolizado de proteínas. El enriquecimiento específico de medios de cultivo celular con una concentración específica de poliaminas actúa aumentando el crecimiento celular, productividad específica de células y densidad celular final.

Por tanto, los medios usados en un procedimiento según la presente invención son más favorables para la expresión de proteínas recombinantes, producción de virus y velocidad de crecimiento celular en comparación con los medios conocidos en la técnica. Además, el medio sin oligopéptidos usado en un procedimiento según la presente invención obvia la adición de hidrolizado de proteínas al medio de cultivo celular.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una gráfica que describe el efecto de la adición de 2,0 mg/l de putrescina.2HCl sobre la productividad volumétrica de FVIII-CoA, expresada en [Unidades por Litro por Día], de células GD8/6 cultivadas en medio BAV con el tiempo de cultivo, expresado en [días]. Flecha = Día 11: Adición de putrescina.2HCl (2,0 mg/l)

La Figura 2 muestra una tabla que compara el efecto de la adición de putrescina opcionalmente en combinación con el enriquecimiento adicional con Fe (II) y Cu (II) sobre la productividad volumétrica y específica de células (QP, expresada en [Unidades por Litro por Día], qp, expresada en [mU por 10E06 células por día]) y sobre la velocidad de crecimiento específica  $\mu$ , expresada como velocidad de crecimiento específica por día en [ $d^{-1}$ ] de células GD8/6 cultivadas en medio BAV.

La Figura 3 muestra una tabla que compara el efecto de putrescina y/u ornitina sobre la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$  absoluta,  $\mu$  relativa) y la productividad específica de células (qp absoluta, expresada en [mU por 10E06 células por día], qp relativa, expresada en %) de células GD8/6 cultivadas en medio BAV.

La Figura 4 muestra una tabla que compara el efecto de putrescina y espermina sobre la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$  absoluta,  $\mu$  relativa) y la productividad específica de células (qp absoluta, qp relativa) de células GD8/6 cultivadas en medio BAV.

La Figura 5 muestra una tabla que compara el efecto de putrescina y etanolamina sobre el crecimiento específico ( $\mu$  absoluta,  $\mu$  relativa) y la productividad específica de células (qp absoluta, qp relativa) de células GD8/6 cultivadas en medio BAV.

La Figura 6 muestra una gráfica que describe el efecto de la adición de 3,6 mg/l de putrescina.2HCl sobre el título de virus MVA promedio, expresado en [TCID<sub>50</sub>/ml x 10<sup>8</sup>]. -: sin adición de putrescina, Putr.: con adición de 3,6 mg/l de

putrescina.2HCl.

La Figura 7 muestra una gráfica que describe el efecto de la adición de diversas concentraciones de putrescina.2HCl, expresada en [mg/l], sobre el título de virus MVA promedio, expresado en [TCID<sub>50</sub>/ml x 10<sup>6</sup>].

5

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona:

- 10 1. Un procedimiento de expresión de al menos una proteína, que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar un cultivo de células;
  - 15 (b) introducir al menos una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica al menos una proteína seleccionada del grupo de factor VII de coagulación, factor VIII de coagulación, factor IX de coagulación, vWF, ADAMTS13 y furina en las células;
  - (c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácidos nucleicos; y
  - 20 (d) expresar la proteína en las células en un medio sin oligopéptidos que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.
2. El procedimiento de [1], en el que las células se cultivan por cultivo en quimioestado.
- 25 3. El procedimiento de [1] o [2], en el que las células son células CHO, células 293 o células BHK.
4. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [3], en el que la combinación de células/proteína está seleccionada del grupo que consiste en células CHO/factor VIII de coagulación, células CHO/factor VII de coagulación, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina, células 293/factor IX de coagulación.
- 30 5. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [4], en el que la combinación de células/proteína es célula CHO/factor VIII de coagulación, en el que el medio comprende Fe (II) y Cu (II) añadidos y en el que la poliamina es putrescina.
- 35 6. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [5], en el que la poliamina está seleccionada del grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina, y combinaciones de las mismas.
7. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [6], en el que el medio comprende ornitina, putrescina o espermina, o combinaciones de las mismas.
- 40 8. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [7], en el que la poliamina se produce sintéticamente.
9. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [8], en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que oscila de 0,5 a 30 mg/l.
- 45 10. El procedimiento de una cualquiera de [1] a [9], en el que el medio está químicamente definido.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.

50

A menos que se establezca de otro modo, los valores de concentración indicados en todo este documento se refieren a la forma de base libre del (de los) componente(s).

55

El término "poliamina" se refiere a cualquiera del grupo de poliaminas biógenas, que son policationes orgánicas derivados de aminoácidos aromáticos o catiónicos. Las poliaminas están compuestas de carbono, nitrógeno e hidrógeno y comprenden dos o más grupos amino. Las poliaminas tienen una o más cargas positivas y un esqueleto hidrófobo. El término engloba, por ejemplo, moléculas seleccionadas del grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina, y combinaciones de las mismas. En una realización de la invención, el medio de cultivo sin oligopéptidos comprende ornitina, o putrescina, o espermina, o combinaciones de las mismas.

60

En otra realización del medio de cultivo celular sin oligopéptidos usado en un procedimiento según la invención, la poliamina se origina a partir de una fuente distinta de un hidrolizado de proteínas. En una realización, la poliamina se produce sintéticamente.

65

En una realización de la invención, la concentración de poliamina es al menos aproximadamente 0,5 mg/l, en otra

realización al menos aproximadamente 1 mg/l, en otra realización al menos aproximadamente 2 mg/l, en todavía otra realización al menos 5 mg/l, en otra realización más al menos 8 mg/l, y en otra realización al menos 10 mg/l.

En una realización de la invención, la concentración de poliamina oscila de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 30 mg/l, en otra realización de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, en otra realización de aproximadamente 1,0 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, en otra realización de aproximadamente 2,0 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, en otra realización de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, en una realización alternativa de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 8 mg/l, y en otra realización de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 5 mg/l en el medio.

Las concentraciones indicadas anteriormente son las concentraciones respectivas de poliamina pura. Si se usa un derivado de poliamina o un compuesto que comprende poliamina, la concentración del grupo poliamina está en los intervalos anteriormente especificados. Por ejemplo, 2 mg/l de putrescina.2HCl es equivalente a una concentración de putrescina de aproximadamente 1,095 mg/l (sin .2HCl).

El término “medio de cultivo celular sin oligopéptidos” según la invención se refiere a un medio sin proteínas que no comprende oligopéptidos, tales como, por ejemplo, oligopéptidos derivados de un hidrolizado de proteínas. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tengan veinte o más aminoácidos. En una realización de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tengan quince o más aminoácidos. En otra realización de la invención, el medio no comprende oligopéptidos que tengan diez o más aminoácidos. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tengan siete o más aminoácidos, en otra realización no comprende oligopéptidos que tengan cinco o más aminoácidos, en todavía otra realización no comprende oligopéptidos que tengan tres o más aminoácidos. Según otra realización de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tengan dos o más aminoácidos.

El medio usado en un procedimiento según la invención puede comprender opcionalmente glutatión y/o al menos una forma estable de glutamina tal como, por ejemplo, L-alanil-L-glutamina. El término “glutatión”, como se usa en el presente documento, describe un tripéptido compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina que incluye la forma oxidada de glutatión, es decir, disulfuro de glutatión, un dímero de glutatión formado por un enlace disulfuro entre las cadenas laterales de sulfhidrilo de cisteína durante el transcurso de ser oxidado.

En una realización de la presente invención, el medio de cultivo celular sin oligopéptidos no comprende oligopéptidos que tengan tres o más aminoácidos, pero opcionalmente puede comprender glutatión.

En otra realización, el medio de cultivo celular sin oligopéptidos no comprende oligopéptidos que tengan dos o más aminoácidos, pero opcionalmente puede comprender glutatión y/o al menos una forma estable de glutamina.

Proteínas y/o oligopéptidos típicos que son evitados en los medios usados en un procedimiento según la invención son aquellos encontrados en suero y sustancias derivadas del suero, tales como, por ejemplo, albúmina, transferrina, insulina u otros factores de crecimiento, además de formas recombinantes de los mismos, u oligopéptidos de hidrolizados de planta o de levadura o formas ultrafiltradas de los mismos.

El medio de cultivo sin oligopéptidos usado en un procedimiento según la invención puede basarse en cualquier medio basal tal como DMEM, Ham's F12, medio 199, McCoy o RPMI generalmente conocidos para un experto en la materia. El medio basal puede comprender varios componentes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de hidrato de carbono, estando cada componente presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula, siendo dichas cantidades generalmente conocidas para un experto en la materia. El medio puede comprender sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón, por ejemplo, bicarbonato sódico, antioxidantes, estabilizadores para contrarrestar la tensión mecánica, o inhibidores de proteasas. Si se requiere, puede añadirse un tensioactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles y polipropilenglicoles (por ejemplo, Pluronic F68<sup>®</sup>, SERVA).

En una realización del medio de cultivo usado en un procedimiento según la presente invención, la poliamina controla la síntesis de ADN y ARN, y/o proliferación celular, y/o diferenciación celular, y/o estabilización de membranas, y/o protección de ADN antioxidante.

En una realización, la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos aumenta la expresión de la proteína y/o virus en las células cultivadas. En otra realización, la expresión de proteínas o título de virus en las células cultivadas puede aumentarse al menos el 50 % mediante la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos. En todavía otra realización, dicho aumento es al menos el 60 %. En otra realización más, la productividad específica de células aumenta al menos dos veces mediante la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos; en otra realización, la productividad específica de células aumenta al menos tres veces. En todavía otra realización, la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina produce un aumento en la expresión de proteínas y/o título de virus de al menos el 400 %; en otra realización de al menos el 500 %; en otra realización de al menos el 600 %; en otra realización de al menos el 700 %.

En una realización, la velocidad de crecimiento específica de las células cultivadas puede aumentarse mediante la adición de al menos 0,5 mg/l de una poliamina a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos. En otra realización, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 10 %. En todavía otra realización, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 20 %. En otra realización más, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 50 %. En otra realización, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 70 %. En otra realización, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 80 %. En todavía otra realización, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 90 %. En otra realización más, dicha velocidad de crecimiento específica puede aumentarse el 100 %.

En otra realización de la presente invención, el medio está químicamente definido. El término “químicamente definido” como se usa en el presente documento debe significar que el medio no comprende ningún suplemento indefinido, tal como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levadura. Por consiguiente, cada componente de un medio químicamente definido está definido con exactitud.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para cultivar células, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un medio de cultivo celular sin oligopéptidos como se describe en el presente documento, y
- (b) propagar las células en el medio para formar un cultivo celular.

La presente invención no se limita a cualquier tipo de células. Ejemplos de tipos de células incluyen células de mamífero, células de insecto, células aviarias, células bacterianas y células de levadura. Las células pueden ser, por ejemplo, citoblastos o células recombinantes transformadas con un vector para la expresión génica recombinante, o células transfectadas con un virus para producir productos víricos. Las células también pueden ser, por ejemplo, células que producen una proteína de interés sin transformación recombinante, por ejemplo, un linfocito B que produce un anticuerpo, que puede transformarse en un estado inmortalizado, por ejemplo, por infección vírica como infección por el virus de Epstein Barr. Las células también pueden ser, por ejemplo, células primarias, por ejemplo, células de embrión de pollo, o líneas celulares primarias. Son útiles células que se usan para la producción de virus *in vitro*. Ejemplos específicos de células útiles incluyen células BSC, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293, células RK, células Per.C6 y células de embrión de pollo.

Las células usadas según la presente invención pueden cultivarse, por ejemplo, por un procedimiento seleccionado del grupo de cultivo por lote, cultivo por lote alimentado, cultivo por perfusión y cultivo en quimiostato, todos los cuales son generalmente conocidos en el campo.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de expresión de al menos una proteína tal como, por ejemplo, una proteína heteróloga o autóloga o una proteína recombinante, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un cultivo de células;
- b) introducir al menos una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica al menos una proteína en las células;
- c) seleccionar las células seleccionadas del grupo de factor VII de coagulación, factor VIII de coagulación, factor IX de coagulación, vWF, ADAMTS13 y furina que llevan la secuencia de ácidos nucleicos; y
- d) expresar la proteína en las células en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.

El medio de la etapa d) es un medio sin oligopéptidos según la presente invención. En otra realización de la presente invención, las células del cultivo de la etapa a) se han cultivado en un medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la presente invención. En otra realización, las etapas a) a d) se realizan en un medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la invención.

La secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica al menos una proteína puede ser un vector. El vector puede administrarse por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional del mismo. En una realización, la proteína es al menos una parte biológicamente activa de un factor de coagulación de la sangre tal como factor VIII o al menos una parte biológicamente activa de una proteína que participa en la producción de glóbulos rojos y angiogénesis tales como eritropoyetina, o un anticuerpo monoclonal.

La secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia que codifica al menos una proteína seleccionada del grupo de factor VII de coagulación, factor VIII de coagulación, factor IX de coagulación, vWF, ADAMTS13 y furina.

En una realización de la presente invención, el ácido nucleico comprende además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tal como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de iniciación de la transcripción, poliligadores, sitios de restricción, secuencias de poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección, y similares, que generalmente son conocidos para un experto en la materia.

5 En una realización de la invención, las células están seleccionados del grupo de células CHO, células 293 y células BHK.

10 Según otra realización de la presente invención, las siguientes líneas celulares pueden transformarse con un vector recombinante para la expresión de los productos respectivos: células CHO para la producción de factores de coagulación recombinantes, por ejemplo, factor VII y/o factor VIII, y/o anticuerpos monoclonales, células BHK para la producción de eritropoyetina recombinante, virus de Epstein Barr transformado, linfocitos B humanos inmortalizados para la producción de anticuerpos humanos. Combinaciones de células/proteína útiles son, por ejemplo, células CHO/factor VIII de coagulación, células CHO/factor VII de coagulación, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina, y células 293/factor IX de coagulación.

20 En otra realización de la presente invención, la expresión de la al menos una proteína por células que se cultivan en un medio según la presente invención aumenta cuando se compara con la expresión de la proteína por células que no se cultivan en un medio de la presente invención. En otra realización, dicha expresión aumenta al menos el 10 %, según otra realización al menos el 50 %.

En el presente documento se describe un procedimiento de producción de al menos un virus o al menos una parte de un virus, que comprende las etapas de:

- 25 a) proporcionar un cultivo de células;
- b) infectar las células con al menos un virus;
- 30 c) seleccionar las células infectadas por el virus; y
- d) propagar el al menos un virus en las células en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.

35 El medio de la etapa d) puede ser un medio sin oligopéptidos según la presente invención. Las células del cultivo de etapa a) pueden haberse cultivado en un medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la presente invención. Las etapas a) a d) pueden realizarse en un medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la invención.

40 El virus usado en el procedimiento puede ser cualquier virus, tal como, por ejemplo, virus de la viruela, por ejemplo, virus de la variolovacuna o de la variolovacuna atenuados; coronavirus, por ejemplo, virus del SRAG; ortomixovirus, por ejemplo, virus de la gripe A o B; paramixovirus; retrovirus, por ejemplo, lentivirus; togavirus, por ejemplo, virus del río Ross; flavivirus, por ejemplo, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla o virus de la ETG (es decir, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas); enterovirus, por ejemplo, virus de la hepatitis A; picornavirus; arenavirus; virus del herpes; o adenovirus. El virus puede ser virus de la variolovacuna Ankara modificado (MVA). El virus puede propagarse según la invención para la producción de una vacuna respectiva.

45 El virus puede ser un virus natural, un virus atenuado, un virus reagrupado o un virus recombinante, o combinaciones de los mismos, por ejemplo, atenuado y recombinante. Además, en lugar de los viriones actuales que se usan para infectar células con un virus, puede usarse un clon de ácido nucleico infeccioso. También pueden usarse viriones fraccionados.

50 El procedimiento para producir un virus puede usarse para producir composiciones inmunogénicas que comprenden un virus, un antígeno de virus, o una partícula similar a virus.

55 Las células usadas en el procedimiento para producir un virus pueden seleccionarse del grupo que consiste en células de mamífero, células de insecto, células aviares, células bacterianas y células de levadura. Las células usadas en el procedimiento para producir un virus según la presente invención están seleccionadas del grupo que consiste en células Vero y células de embrión de pollo.

60 Combinaciones útiles de células con virus para producir un virus o parte de un virus son, por ejemplo, célula Vero/variolovacuna atenuada, célula Vero/variolovacuna, célula Vero/hepatitis A, célula Vero/virus de la gripe, célula Vero/virus del Nilo occidental, célula Vero/virus del SRAG, célula Vero/virus de la fiebre amarilla y células de embrión de pollo/virus de la ETG. En una realización de la invención, la combinación de célula/virus es células de embrión de pollo/virus de la variolovacuna Ankara modificado (MVA).

65 Procedimientos de cultivo útiles incluyen cultivo por lote, cultivo por lote alimentado, cultivo por perfusión y cultivo en quimiostato.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin estar limitada a éstos.

### Ejemplos

5

Ejemplo 1: Preparación de medio BAV

Se preparó medio sin oligopéptidos (medio BAV) con medio DMEM/HAM's F12 (1:1) basal que comprende sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes (Life technologies, 32500 Powder). También se añadieron L-glutamina (600 mg/l), ácido ascórbico (20 µM), etanolamina (25 µM), Synperonic® (SERVA) (0,25 g/l), selenito de sodio (50 nM). Adicionalmente, aminoácidos esenciales enriquecieron el medio de cultivo celular: L-asparagina.H<sub>2</sub>O 20 mg/l, L-cisteína.HCl.H<sub>2</sub>O 15 mg/l, L-cistina.2HCl 20 mg/l, L-prolina 35 mg/l, L-triptófano 20 mg/l.

15

Ejemplo 2: Determinación de cifras de células

Las cifras de células de las células en suspensión o células inmovilizadas se determinaron contando con un contador de células CASY® como se describe por Schärfe y col., Biotechnologie in LaborPraxis 10: 1096 - 1103 (1988), o bien por extracción con ácido cítrico y tinción fluorescente de los núcleos, seguido de contando con NucleoCounter® (Chemometec, DK). La velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) se calcula a partir del aumento de las densidades celulares ( $X_t$ ) y/o la velocidad de dilución (D) del estado estacionario de los cultivos en quimiostato de suspensiones de células durante un cierto intervalo de tiempo (t):

$$\mu = D + \ln (X_t/X_0)/t$$

25 Ejemplo 3: Determinación de la actividad de FVIII

La actividad del factor VIII (FVIII) (véanse las Figuras 1 a 5) se midió por un ensayo cromogénico (Chromogenic, Suecia).

30 Ejemplo 4: Cálculo de la productividad volumétrica QP y específica de células (qp)

La productividad volumétrica (QP) se calcula a partir de la cantidad de unidades de actividad dadas por litro de reactor volumen por día (U/l/d) en el sistema de producción.

35 La productividad específica de células (qp) se define como la cantidad específica de proteína producida (U o µg) por número de células por día.

Ejemplo 5: Condiciones de cultivo celular a gran escala

40 Cultivos celulares de células de mamífero recombinantes (por ejemplo, células CHO que expresan establemente factor VIII, tal como las células GD8/6) se cultivaron en suspensión en un cultivo en quimiostato en birreactores de 10 l. Las condiciones de cultivo de 37 °C, saturación de oxígeno del 20 % y pH 7,0 a 7,1 se mantuvieron constantes. Los cultivos se suministraron con una alimentación constante de medio BAV.

45 Ejemplo 6: Efecto de la adición de una poliamina sobre la expresión de FVIII

50 Células GD8/6 se cultivaron en cultivo en quimiostato en un biorreactor de 10 l como se describe en el Ejemplo 5 con una alimentación continua de medio BAV durante 11 días, produciendo una disminución de la productividad de &lt; 100 U/l/d. Mediante la adición de putrescina.2HCl (2 mg/l) la expresión volumétrica de FVIII aumentó el 800 % (véase la Figura 1). Por consiguiente, la putrescina podría identificarse claramente como el factor impulsor de la expresión específica de células para la línea celular GD8/6.

Ejemplo 7: Efecto de la adición de una poliamina y Fe (II) y Cu II sobre la expresión de FVIII

55 Células GD8/6 se cultivaron en cultivo en quimiostato en un biorreactor de 10 l como se describe en el Ejemplo 5, produciendo una productividad promedio de 271 U/l/d, con bajas velocidades de productividad específica de células y de crecimiento específico. Mediante la adición de putrescina.2HCl (2 mg/l), la expresión de FVIII aumentó a 870 U/l/d, principalmente debido a un aumento de la productividad específica de células. El enriquecimiento adicional con Fe (II) y Cu (II) en una concentración que de otro modo normalmente está comprendida en hidrolizados de soja condujo a un aumento de la velocidad de crecimiento específica de aproximadamente 0,60 d<sup>-1</sup>, y pudo lograrse un aumento de la productividad específica de células de más de 1700 mU/10E06 células/día. Bajo estas condiciones se alcanzó una productividad volumétrica de más de 2685 U/l/d. Otro aumento de la densidad celular produjo una productividad volumétrica de más de 3000 U/l/d. La máxima productividad volumétrica de un hidrolizado de soja que comprende medio bajo condiciones de fermentación comparables fue 2000 a 2500 U/l/d, que indica que un medio

60



químicamente definido que comprende solo putrescina y 2 iones metálicos adicionales es superior a cualquier hidrolizado de soja que comprende la formulación de medio investigada en este procedimiento antes (véase la Figura 2).

#### 5 Ejemplo 8: Condiciones de cultivo celular a pequeña escala

Se llevaron a cabo experimentos a pequeña escala con células GD8/6 en cultivo en suspensión en matraces con agitación centrífuga Techne de 200 ml de volumen de trabajo en modo de realimentación de lotes a 37 °C, sin control de pH y pO<sub>2</sub>. Los cultivos se suministraron con medio BAV como se ha definido anteriormente adicionalmente  
10 enriquecido con putrescina.2HCl, ornitina.HCl, espermina.4HCl o etanolamina, o combinaciones de las mismas, en el intervalo de 0-18 mg/l (equivalente a 0-10 mg/l de la amina biógena sin .HCl (véanse las Figuras 3 a 5).

#### Ejemplo 9: Efecto de la adición de varias poliaminas y combinaciones de poliaminas sobre la expresión de FVIII

15 Células GD8/6 de un cultivo con medio BAV como se describe en el Ejemplo 8 se centrifugaron y se transfirieron a matraces con agitación centrífuga Techne con un volumen de trabajo de 200 ml y se incubaron a una densidad celular de aproximadamente 1-2E06 células/ml con medio definido, enriquecido con etanolamina, putrescina, ornitina y/o espermina como se indica en las Figuras 3, 4 y 5. La ornitina, que es un precursor de la putrescina en la ruta de  
20 aminas biógenas, podría sustituir parcialmente la putrescina en un modo dependiente de la concentración. La adición de ornitina a diferentes concentraciones a los medios que comprende putrescina.2HCl produjo un aumento adicional de las productividades de FVIII y velocidades de crecimiento específicas (véase la Figura 3). Sin embargo, la etanolamina, que no es una poliamina según la presente invención, no pudo ni sustituir la putrescina a ninguna concentración investigada ni un aumento de la concentración de etanolamina en medio que comprende putrescina  
25 produjo un aumento significativo de las productividades volumétricas o velocidades de crecimiento específicas (véase la Figura 5). Otro experimento bajo condiciones similares mostró que la espermina, otro producto intermedio en la ruta de aminas biógenas, también podría sustituir la putrescina en un modo dependiente de la concentración (véase la Figura 4).

#### Ejemplo 10: Efecto de la adición de una poliamina sobre la producción de virus MVA

30 Cultivos de células primarias de embriones de pollo se cultivaron en matraces con agitación centrífuga Techne (volumen de trabajo 200 ml) usando un medio sin péptidos (medio FM) sin y con enriquecimiento de 3,6 mg/l de putrescina.2HCl.

35 El medio FM se preparó con medio M199 basal que comprende sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes (Life technologies, 31150 Powder). También se añadieron NaHCO<sub>3</sub> (a 4,4 g/l), gentamicina.SO<sub>4</sub> (50 µg/l) y neomicina.SO<sub>4</sub> (50 µg/l).

40 Los cultivos celulares se infectaron con el virus MVA y los sobrenadantes se analizaron para el título de virus en un ensayo de TCID<sub>50</sub>. Mediante la adición de putrescina, el título de virus promedio (n = 16 muestras cada uno) podría aumentarse aproximadamente el 50 % (véase la Figura 6).

#### Ejemplo 11: Efecto de la adición de varias dosis de una poliamina sobre la producción de virus MVA

45 Cultivos de células primarias de embriones de pollo se cultivaron en matraces con agitación centrífuga Techne (volumen de trabajo 200 ml) usando un medio sin péptidos (medio FM) sin y con enriquecimiento de 3,6 y 9 mg/l de putrescina.2HCl.

50 El medio CEM se preparó con medio DMEM/HAM's F12 (1:1) basal que comprende sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes (Life technologies, 32500 Powder). También se añadieron NaHCO<sub>3</sub> (2 g/l), L-glutamina (600 mg/l), ácido ascórbico (20 µM), etanolamina (25 µM), Synperonic ® (SERVA) (0,25 g/l), selenito de sodio (50 nM), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (600 µg/l), gentamicina.SO<sub>4</sub> (50 µg/l) y neomicina.SO<sub>4</sub> (50 µg/l). Adicionalmente, aminoácidos esenciales enriquecieron el medio de cultivo celular. Adicionalmente, aminoácidos esenciales enriquecieron el medio de cultivo celular: L-asparagina.H<sub>2</sub>O 20 mg/l, L-cisteína.HCl.H<sub>2</sub>O 15 mg/l, L-cistina.2HCl 20  
55 mg/l, L-prolina 35 mg/l, L-triptófano 20 mg/l.

Los cultivos celulares se infectaron con el virus MVA y los sobrenadantes se analizaron para el título de virus en un ensayo de TCID<sub>50</sub>. Mediante la adición de putrescina con 9 mg/l, el título de virus promedio (n = 4 muestras cada uno) pudo aumentarse aproximadamente el 60 % (véase la Figura 7).

60

#### Las siguientes condiciones también se describen en el presente documento:

1. Un medio de cultivo celular sin oligopéptidos, que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.
- 65 2. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que la poliamina está seleccionada del grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina, y combinaciones de

las mismas.

3. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que la poliamina se produce sintéticamente.
- 5 4. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que oscila de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg/l.
- 10 5. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que el medio no comprende oligopéptidos que tengan veinte o más aminoácidos.
6. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según producen 1, en el que el medio no comprende oligopéptidos que tengan tres o más aminoácidos, comprendiendo opcionalmente glutatión.
- 15 7. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que el medio no comprende oligopéptidos que tengan dos o más aminoácidos, comprendiendo opcionalmente glutatión y/o al menos una forma estable de glutamina.
- 20 8. El medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1, en el que el medio está químicamente definido.
9. Un procedimiento para cultivar células, que comprende las etapas de:
  - 25 (a) proporcionar un medio de cultivo celular sin oligopéptidos según la condición 1,
  - y
  - (b) propagar las células en el medio para formar un cultivo celular.
- 30 10. El procedimiento según la condición 9, en el que las células están seleccionadas del grupo que consiste en células de mamífero, células de insecto, células aviares, células bacterianas y células de levadura.
11. Un procedimiento de expresión de al menos una proteína, que comprende las etapas de:
  - 35 (a) proporcionar un cultivo de células;
  - (b) introducir al menos una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica al menos una proteína en las células;
  - 40 (c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácidos nucleicos; y
  - (d) expresar la proteína en las células en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.
- 45 12. El procedimiento según la condición 11, en el que el medio es un medio sin oligopéptidos según la condición 1.
13. El procedimiento según la condición 11, en el que la proteína está seleccionada del grupo de factor VII de coagulación, factor VIII de coagulación, factor IX de coagulación, vWF, ADAMTS13 y furina.
- 50 14. El procedimiento según la condición 11, en el que las células son células CHO, células 293 o células BHK.
15. El procedimiento según la condición 11, en el que la combinación de células/proteína está seleccionada del grupo que consiste en células CHO/factor VIII de coagulación, células CHO/factor VII de coagulación, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina, células 293/ factor IX de coagulación.
- 55 16. Un procedimiento de producción de al menos un virus, que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar un cultivo de células;
  - 60 (b) infectar las células con el al menos un virus;
  - (c) seleccionar las células infectadas por el virus; y
  - (d) propagar el al menos un virus en las células en un medio que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.
- 65 17. El procedimiento según la condición 16, en el que el medio es un medio sin oligopéptidos según la condición 1.

18. El procedimiento según la condición 16, en el que el virus está seleccionado del grupo de virus de la viruela, coronavirus, ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, togavirus, flavivirus, enterovirus, picornavirus, arenavirus, virus del herpes y adenovirus.
- 5
19. El procedimiento según la condición 16, en el que el virus está seleccionado del grupo de virus de la variolovacuna, virus del SRAG, virus de la gripe A, virus de la gripe B, lentivirus, virus del río Ross, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla, virus de la ETG y virus de la hepatitis A.
- 10
20. El procedimiento según la condición 16, en el que las células son células Vero o células de embrión de pollo.
- 15
21. El procedimiento según la condición 16, en el que la combinación de células/virus está seleccionada del grupo que consiste en células Vero/variolovacuna atenuada, células Vero/variolovacuna, células Vero/hepatitis A, células Vero/virus de la gripe, células Vero/virus del Nilo occidental, células Vero/virus del SRAG, células Vero/virus de la fiebre amarilla, células de embrión de pollo/virus de la ETG y células de embrión de pollo/virus de la variolovacuna Ankara modificado (MVA).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de expresión de al menos una proteína, que comprende las etapas de:
  - 5 (a) proporcionar un cultivo de células;
  - (b) introducir al menos una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica al menos una proteína seleccionada del grupo de factor VII de coagulación, factor VIII de coagulación, factor IX de coagulación, vWF, ADAMTS 13 y furina en las células;
  - 10 (c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácidos nucleicos; y
  - (d) expresar la proteína en las células en un medio sin oligopéptidos que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se cultivan por cultivo en quimiostato.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que las células son células CHO, células 293 o células BHK.
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la combinación de células/proteína está seleccionada del grupo que consiste en células CHO/factor VIII de coagulación, células CHO/factor VII de coagulación, células CHO/ADAMTS 13, células CHO/furina, células 293/factor IX de coagulación.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la combinación de células/proteína es célula CHO/factor VIII de coagulación, en el que el medio comprende Fe (II) y Cu (II) añadidos y en el que la poliamina es putrescina.
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la poliamina está seleccionada del grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina, y combinaciones de las mismas.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio comprende ornitina, putrescina o espermina, o combinaciones de las mismas.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la poliamina se produce sintéticamente.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que oscila de 0,5 a 30 mg/l.
- 40 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio está químicamente definido.
- 45

Figura 1

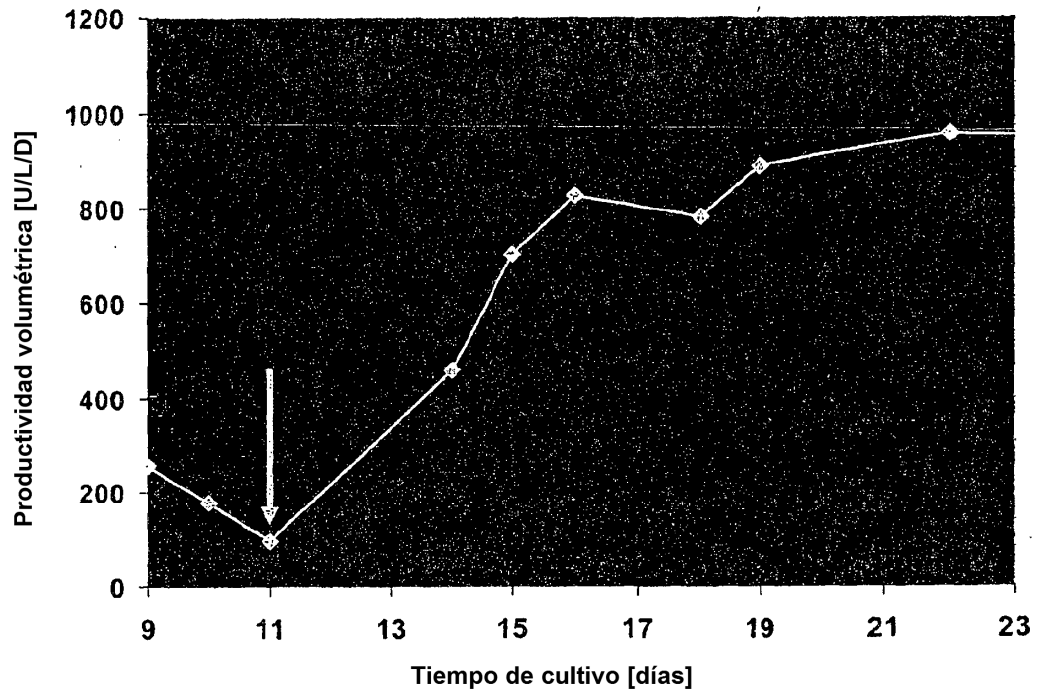


Figura 2

	QP [U/L/D]	qp [mU/10E06 células/día]	$\mu$ [d <sup>-1</sup> ]
Medio BAV sin enriquecimiento	271	236	0,37
Medio BAV + putrescina.2HCl (2 mg/l)	870	671	0,41
Medio BAV + putrescina.2HCl (2 mg/l) + Fe (II) a 2,3 x concentración + Cu (II) a 2,0 x concentración	1393	958	0,59
Medio BAV + putrescina.2HCl (2 mg/l) + Fe (II) a 2,3 x concentración + Cu (II) a 12,5 x concentración	2685	1744	0,63
Medio BAV + putrescina.2HCl (2 mg/l) + Fe (II) a 2,3 x concentración + Cu (II) a 12,5 x concentración Con aumento de la densidad celular	3107	1756	0,63

Figura 3

	qp absoluta [mU/10E06 células/día]	qp relativa [ % ]	$\mu$ absoluta [ d-1 ]	$\mu$ relativa [ % ]
Medio BAV sin amina biógena adicional	172	100	0,19	100
Putrescina.2HCl (2 mg/l)	697	405	0,34	179
Ornitina.HCl (2 mg/l)	457	266	0,34	179
Ornitina.HCl (10 mg/l)	587	341	0,37	195
Putrescina.2HCl (2 mg/l) + ornitina.HCl (2 mg/l)	806	467	0,36	189
Putrescina.2HCl (2 mg/l) + ornitina.HCl (10 mg/l)	1050	610	0,39	205

Figura 4

	qp absoluta [mU/10E06 células/día]	qp relativa [ % ]	$\mu$ absoluta [ d-1 ]	$\mu$ relativa [ % ]
Putrescina.2HCl (2 mg/l)	2303	100	0,61	100
Espermina.4HCl (0,4 mg/l)	1331	58	0,59	97
Espermina.4HCl (2 mg/l)	2639	115	0,60	98
Espermina.4HCl (10 mg/l)	2651	115	0,59	97



Figura 5

	qp absoluta [mU/10E06 células/día]	qp relativa [ % ]	$\mu$ absoluta [ d-1 ]	$\mu$ relativa [ % ]
Patrón de medio BAV Etanolamina (1,53 mg/l) Conc. estándar = control neg.	172	100	0,19	100
Etanolamina (a 3,83 mg/l)	188	109	0,23	118
Etanolamina (a 15,3 mg/l)	183	106	0,22	118
Etanolamina (a 38,3 mg/l)	171	100	0,23	125
Putrescina.2HCl (2 mg/l) + etanolamina (a 3,83 mg/l)	545	317	0,36	193
Putrescina.2HCl (2 mg/l) + etanolamina (a 15,3 mg/l)	609	354	0,32	173
Putrescina.2HCl (2 mg/l) + etanolamina (a 38,3 mg/l)	553	322	0,32	172

Figura 6

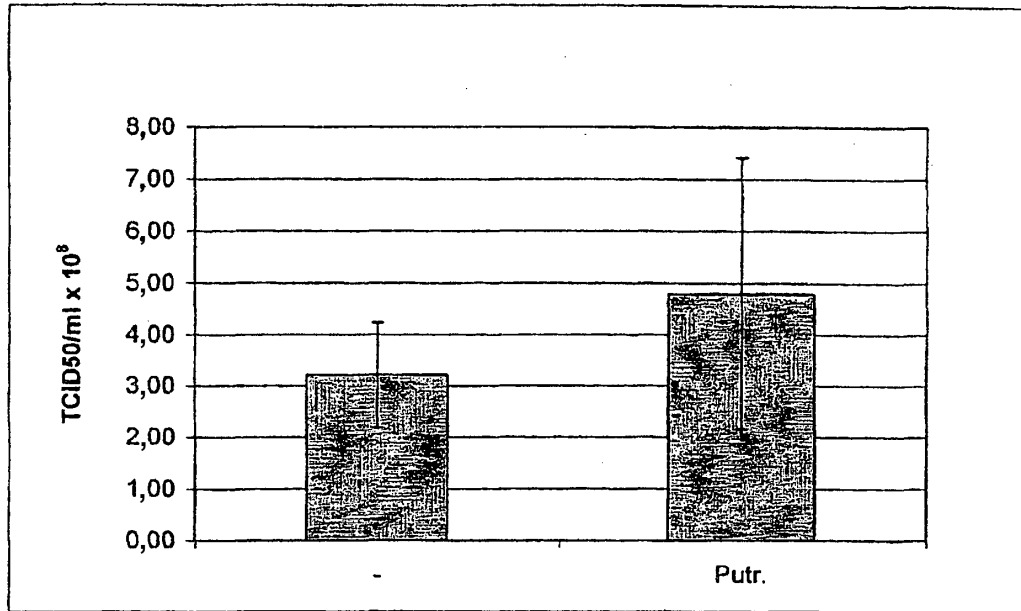


Figura 7

