

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 881**

51 Int. Cl.:

C12P 21/04 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2009 E 09826577 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2356247**

54 Título: **Método de producción de factor VII libre de suero y libre de insulina**

30 Prioridad:

12.11.2008 US 113792 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2015

73 Titular/es:

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

VON FIRCKS, SIMONE;
ELMER, RUTH y
REITER, MANFRED

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 547 881 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

Método de producción de factor VII libre de suero y libre de insulina

5 **Antecedentes de la invención**

El principal papel de FVII es iniciar el proceso de coagulación junto con el factor tisular (TF). El factor tisular se encuentra en el exterior de los vasos sanguíneos y no está expuesto normalmente al torrente sanguíneo. Tras la lesión de un vaso, el factor tisular se expone a la sangre y al factor VII circulante. Una vez unido a TF, FVII se activa para dar FVIIa por diferentes proteasas, entre las que están trombina (factor IIa), factor X activado y el propio complejo FVIIa-TF. Los sustratos más importantes para FVIIa-TF son el factor X y el factor IX. El factor VIIa que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente el 1% de la masa de proteína de factor VII total. El factor VII existe en plasma principalmente como un zimógeno monocatenario que se escinde por FXa en su forma activada bicatenaria, el factor VIIa.

El factor VII activado recombinante (rFVIIa) se ha desarrollado como agente prohemostático. La administración de rFVIIa ofrece una repuesta prohemostática rápida y sumamente eficaz en sujetos hemofílicos con hemorragias, que tienen limitado su tratamiento mediante otros factores de coagulación debido al desarrollo de anticuerpos. También puede tratarse de manera satisfactoria con rFVIIa la hemorragia en sujetos con deficiencia en el factor VII o sujetos que tienen un sistema de coagulación normal pero que experimentan una hemorragia excesiva.

La preparación de factores de coagulación sanguínea recombinantes está adquiriendo importancia. Por ejemplo, el factor VIIa, como otras proteínas de coagulación, está sometido a una variedad de modificaciones co- y postraduccionales, incluyendo, por ejemplo, glucosilación unida a asparagina (unida a N); glucosilación unida a O; y es preferible la γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico para producir estas proteínas recombinantes en células de mamífero que son capaces de modificar las proteínas recombinantes de manera apropiada.

Esto es para permitir el crecimiento óptimo de células recombinantes; se ha realizado de manera tradicional el cultivo de células de mamífero en presencia de suero de animales o componentes derivados de animales tales como albúmina, transferrina, insulina, etc. No obstante, reconociendo que existe la necesidad de reducir el riesgo de contaminación y disminuir la variabilidad en el producto producido, se han desarrollado diversos métodos y composiciones para el uso de medio libre de suero para la preparación de factores de coagulación sanguínea recombinantes (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 6.100.061 y los documentos US 2003/0203448A1 o US 2006/0094104A1). El uso de tal medio en el procedimiento de preparación también permite una purificación más sencilla de las proteínas expresadas. En la mayor parte de los casos, en primer lugar se cultivan células recombinantes en medio que contiene suero hasta una alta densidad celular, por ejemplo para un banco de células de trabajo, y posteriormente se readaptan a medio libre de suero durante la fase de producción.

Zang *et al.* (Biotechnology (N Y). abril de 1995; 13(4):389-92) citan la producción de las proteínas recombinantes activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPa) y una cadena ligera kappa de inmunoglobulina G (IgG) humanizada usando un medio de cultivo celular libre de proteínas.

Hunt *et al.* (Cytotechnology. Mayo de 1997; 24(1):55-64) citan células de ovario de hámster chino que contienen un gen heterólogo de IGF-I dirigido por el promotor de citomegalovirus y que crecen de manera autónoma en medio libre de suero.

El documento WO 02/29083 se refiere a métodos para cultivar células de mamífero y para producir proteínas recombinantes en cultivos a gran escala de tales células.

Métodos para el cultivo libre de suero han producido resultados variables y han requerido la adición de insulina para el crecimiento celular y la producción de proteínas del factor VII. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos para el cultivo de células de mamífero libre tanto de suero como de otros componentes derivados de animales e insulina para producir cantidades de proteínas de coagulación, particularmente factor VII humano recombinante o polipéptidos relacionados con el factor VII.

55 **Breve resumen de la invención**

Según aspectos específicos, la presente invención se refiere a un método para producir factor VII (FVII) humano recombinante que comprende obtener una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa FVII humano recombinante; y cultivar la célula CHO en medio libre de suero que carece de insulina; tal como se define en las reivindicaciones. Específicamente, la producción del FVII en la célula CHO es comparable a la producción de FVII en presencia de insulina.

La célula CHO usada en el método de producción se prepara adaptando una línea celular CHO que expresa FVII humano recombinante modificada para el crecimiento en cultivo libre de suero para crecer en cultivo celular en ausencia de insulina mediante el cultivo en serie de la línea celular CHO en cantidades decrecientes de insulina para

obtener una línea celular CHO que produce FVII que crece en ausencia de insulina.

En realizaciones específicas, la línea celular CHO que expresa FVII humano recombinante modificada para el crecimiento en cultivo libre de suero es la línea celular 1E9, línea celular depositada con el número de registro n.º 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.

En otras realizaciones, la línea celular CHO que produce FVII producida para crecer en ausencia de insulina es una línea celular 1E9 depositada con el número de registro n.º 08100802 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.

El medio de cultivo celular usado en el método de producción comprende preferiblemente vitamina K1. Más particularmente, el medio es una formulación basada en DMEM/F12 de HAM libre de suero complementada con uno o más de los siguientes aditivos i) glutamina; concentración final de 0,9 g/l, ii) sulfato férrico $\times 7H_2O$ 0,0006 g/l, iv) putrescina, $\times 2HCl$ 0,0036 g/l, vi) vitamina K1 0,0025 g/l, vii) Synperonic; concentración final de 1 g/l, rojo de fenol 0,008 g/l, etanolamina 0,00153 g/l e hidrogenocarbonato de Na 2 g/l).

Las células se preparan usando un método en el que el cultivo en serie comprende pulsar pases sucesivos de células CHO con concentraciones decrecientes de insulina. Se encontró que tal pulsación produce células viables mientras que hacer crecer dichas células en una cantidad de insulina sucesivamente menor sin el pulsado no produce células viables.

Una etapa a modo de ejemplo en el método de pulsado comprende hacer crecer una línea celular CHO hasta el día 14 en medio libre de suero convencional que contiene insulina y en el día 14 transferir la línea celular a un medio libre de suero y libre de insulina.

En un aspecto específico, las células se hacen crecer entonces en el medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días, preferiblemente un día y entonces se transfieren de nuevo a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,2 mg/ml y se hacen crecer en el medio que contiene insulina durante de 1 a 3 días, preferiblemente 3 días. Posteriormente, tras el crecimiento durante de 1 a 3 días, pero preferiblemente, 3 días en medio que contiene insulina, la línea celular CHO se transfiere de nuevo a medio libre de suero y libre de insulina.

En realizaciones a modo de ejemplo, las células se hacen crecer entonces en un medio libre de suero y libre de insulina durante un periodo de tiempo adicional, preferiblemente un día y entonces se transfieren a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,070 mg/ml y se hacen crecer en el medio que contiene insulina durante de 3 a 8 días, pero preferiblemente 8 días. Tras el crecimiento durante los de 3 a 8 días, pero preferiblemente 8 días en medio que contiene insulina, la línea celular CHO se transfiere a medio libre de suero y libre de insulina. El método implica entonces hacer crecer las células en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir las células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,030 mg/ml y hacer crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero preferiblemente, 9 días. De nuevo, tras el crecimiento durante de 3 a 9 días, pero preferiblemente 9 días en medio que contiene insulina, la línea celular CHO se transfiere a medio libre de suero y libre de insulina. Esta línea celular se hace crecer entonces en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces se transfieren las células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,016 mg/ml y se hace crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero preferiblemente 9 días. Esta línea celular se transfieren entonces a medio libre de suero y libre de insulina y es estable en medio libre de insulina durante al menos 30 pases y preferiblemente al menos 40 pases. En la figura 1, se proporciona la concentración real de insulina (basándose en cálculos) durante la adaptación desde el día 0-88. La invención también se refiere a un método de adaptación tal como se define en la reivindicación 9.

Por tanto, la invención también se refiere a un método de adaptación de una línea celular que produce FVII que crece en medio libre de suero a una línea celular que crece en medio libre de suero y libre de insulina, que comprende pulsar pases sucesivos de células CHO con concentraciones decrecientes de insulina, en el que el pulsado comprende: a) hacer crecer la línea celular durante de 3 a 9 días pero más específicamente 9 días en medio que contiene insulina seguido por b) crecimiento en medio libre de suero y libre de insulina durante un día y repetir las etapas a) y b) en el que el medio en cada etapa a) sucesiva contiene aproximadamente la mitad de la concentración de insulina que en la etapa a) anterior hasta que el medio no contiene insulina detectable.

En un método de adaptación de este tipo preferido, el método comprende a) hacer crecer una línea celular CHO hasta el día 14 en medio libre de suero convencional que contiene insulina y en el día 14 transferir la línea celular a un medio libre de suero y libre de insulina; b) hacer crecer las células de la etapa b) en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días pero más específicamente, un día y entonces transferir las células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,2 mg/ml y hacer crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 1 a 3 días, pero más específicamente durante 3 días; c) tras el crecimiento durante de 1 a 3 días, pero más específicamente 3 días en medio que contiene insulina de la etapa b), transferir la línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina; d) hacer crecer las células de la etapa c) en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir las células a un medio que contiene insulina que comprende

insulina 0,070 mg/ml y hacer crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 3 a 8 días pero más específicamente durante 8 días; e) tras el crecimiento durante de 3 a 8 días, pero más específicamente, durante 8 días en medio que contiene insulina en la etapa d), transferir la línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina; f) hacer crecer las células de la etapa e) en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir las células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,030 mg/ml y hacer crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero más específicamente durante 9 días; g) tras el crecimiento durante un día en medio que contiene insulina en la etapa f), transferir la línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina; h) hacer crecer las células de la etapa g) en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir las células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,016 mg/ml y hacer crecer la línea celular CHO en el medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero más específicamente durante 9 días; e i) tras el crecimiento durante los de 3 a 9 días, pero más específicamente los 9 días en medio que contiene insulina en la etapa h), transferir la línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina, en el que las células en la etapa i) se adaptan para el crecimiento a largo plazo en medio libre de suero y libre de insulina. La invención también se refiere a una célula CHO que puede obtenerse mediante estos métodos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula CHO recombinante que expresa FVII humano y se adapta para el crecimiento en un medio libre de insulina que carece de componentes derivados de animales, tal como se define en la reivindicación 12. Preferiblemente, la célula recombinante se produce adaptando una línea celular que produce FVII que crece en medio libre de suero a una línea celular que crece en medio libre de suero y libre de insulina, que comprende pulsar pases sucesivos de células CHO con concentraciones decrecientes de insulina, en el que el pulsado comprende a) hacer crecer la línea celular durante 9 días en medio que contiene insulina seguido por b) crecimiento en medio libre de suero y libre de insulina durante un día y repetir las etapas a) y b) en el que el medio en cada etapa a) sucesiva contiene aproximadamente la mitad de la concentración de insulina que en la etapa a) anterior hasta que el medio no contiene insulina detectable.

Una célula CHO recombinante que expresa FVII humano preferida es una que se depositó con el número de registro n.º 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008. Una célula CHO recombinante que expresa FVII humano preferida adicional es una que se depositó con el número de registro n.º 08100802 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.

La invención también se refiere a un método para la producción a gran escala de un FVII o un polipéptido relacionado con FVII en células de mamífero, comprendiendo el método (a) inocular una célula recombinante adaptada de la invención en un recipiente de cultivo que contiene medio libre de suero y libre de insulina y propagar el cultivo de células de mamífero al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada; (b) transferir el cultivo simiente propagado a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene medio libre de suero y libre de insulina; (c) propagar el cultivo a gran escala en medio libre de suero y libre de insulina, al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada; (d) mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de suero y libre de insulina, en condiciones apropiadas para la expresión de FVII o la expresión de polipéptido relacionado con FVII; y (e) recuperar el FVII o el polipéptido relacionado con FVII del cultivo mantenido.

Preferiblemente, el método comprende además antes de la etapa (b), repetir la etapa (a) usando recipientes de cultivo de simiente de tamaño progresivamente creciente. El método también puede comprender además mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de suero y libre de insulina mediante la recogida regular del medio de cultivo y la sustitución por nuevo medio.

El método de cultivo puede ser cualquier método, tal como por ejemplo, procedimiento de microportadores; un procedimiento de portadores macroporosos. El método puede ser un procedimiento de microportadores convencional o un procedimiento de perfusión de microportadores. Alternativamente, el método es un procedimiento en suspensión, que puede ser un procedimiento de perfusión o un procedimiento discontinuo/semicontinuo (*draw-fill*). El procedimiento de cultivo celular puede ser un procedimiento discontinuo sencillo, un procedimiento alimentado por lotes o un procedimiento semicontinuo. Antes de la etapa de inoculación, las células se han adaptado para crecer en medio libre de suero que carece de insulina. Además, es preferible que las células, antes de la etapa de inoculación, sean capaces de crecer en cultivo en suspensión.

En los métodos descritos, preferiblemente, el FVII o polipéptido relacionado con FVII deseado es FVII humano o un polipéptido relacionado con FVII humano. El método de producción a gran escala es uno que produce preferiblemente el FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 1 mg/l/día de cultivo. Más preferiblemente, se produce el FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 2,5 mg/l/día de cultivo. En otras realizaciones, el rendimiento del método es uno en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 5 mg/l/día de cultivo. En otras realizaciones preferidas, se produce el FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 8 mg/l/día de cultivo. En realizaciones específicas a modo de ejemplo, se produce el FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de aproximadamente 3-4 mg/l/día.

El método produce al menos 5000 U/l/día de FVII o polipéptido relacionado con FVII. En otras realizaciones, se

producen al menos 7000 U//día de FVII o polipéptido relacionado con FVII. Un intervalo preferido de unidades de actividad de FVII o un polipéptido relacionado con FVII producidas es de aproximadamente 7000-10.000 U//día.

En realizaciones específicas, el método comprende además mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de suero y libre de insulina mediante la recogida regular de parte del sobrenadante de cultivo tras la sedimentación de los portadores que contienen células y la sustitución por nuevo medio. Preferiblemente, el método comprende además enfriar el cultivo hasta una temperatura predeterminada por debajo del punto de consigna del cultivo antes de la sedimentación de portadores. Por ejemplo, el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 30°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo antes de la sedimentación de portadores. En otras realizaciones, el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 20°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo. En todavía otras realizaciones, el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 15°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo. Realizaciones más específicas implican el enfriamiento el cultivo hasta una temperatura de aproximadamente 10°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo.

En aspectos definidos, el medio usado en el presente documento es una formulación basada en DMEM/F12 de HAM libre de suero complementada con uno o más de los siguientes aditivos i) glutamina; concentración final de 0,9 g/l, ii) sulfato férrico $\times 7H_2O$ 0,0006 g/l, iv) putrescina, $\times 2HCl$ 0,0036 g/l, vi) vitamina K1 0,0025 g/l, vii) Synperonic; concentración final de 1 g/l, rojo de fenol 0,008 g/l, etanolamina 0,00153 g/l e hidrogenocarbonato de Na 2 g/l).

En realizaciones específicas, las condiciones en un método preferido son tales que la densidad celular de las células en el cultivo a gran escala está a $1-3 \times 10^6/ml$, y el cultivo se mantiene a pH 7,1 \pm 0,3, pO_2 del 10-50%, con una tasa de dilución de 0,25-1,5.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico de las estrategias de reducción para seleccionar una línea celular 1E9 que crece en condiciones libres de suero y libres de insulina.

La figura 2 muestra un gráfico que representa el pulsado de células CHO-K1 con medio libre de suero con y sin insulina para derivar una línea celular CHO-K1 capaz de crecer en medio libre de suero y libre de insulina.

La figura 3 muestra un gráfico que representa la comparación de la adaptación de células a medio libre de suero y libre de insulina mediante dilución por pases convencional y la técnica de pulsado de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para producir factor VII (FVII) humano recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) en condiciones libres de suero y libres de insulina; tal como se define en las reivindicaciones. El método comprende obtener a recombinante línea celular CHO que expresa FVII humano y cultivar la célula CHO en medio libre de suero que carece de insulina.

La presente invención engloba cultivar células de mamífero que expresan FVII o sus derivados en medio libre de suero y libre de insulina. Tal como se usa en el presente documento, "libre de suero" significa que el medio carece de cualquier componente que se haya preparado en o extraído de un animal intacto ("derivado de animales", por ejemplo, proteínas aisladas y purificadas de suero) o que sean componentes producidos usando componentes que se han producido en un animal intacto (por ejemplo, aminoácidos preparados usando una enzima aislada y purificada de un animal para hidrolizar un material fuente vegetal).

Tal como se usa en el presente documento, "libre de insulina" o "medio que carece de insulina" se refiere a un medio que no contiene cantidades de insulina rastreables. Insulina incluye tanto insulina derivada de animales (por ejemplo, purificada de suero de animales) e insulina no derivada de animales, tal como, por ejemplo, insulina recombinante producida en una célula de levadura o bacteriana o insulina producida en una línea celular de mamífero establecida, tal como, por ejemplo, células CHO, BHK o HEK.

Puede usarse cualquier medio de cultivo celular que soporte el crecimiento y el mantenimiento celular en condiciones de la invención siempre que ese medio esté libre de (es decir, que carezca de) componentes derivados de animales y libre de insulina. Normalmente, el medio contiene agua, un regulador de la osmolaridad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o más factores de crecimiento sintéticos o recombinantes, vitaminas y cofactores. Están disponibles medios que carecen de proteínas y/o componentes derivados de animales de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, JHR Biosciences, Gibco y Gemini.

Además de los componentes convencionales, un medio adecuado para producir el factor VII o un polipéptido relacionado con factor VII puede contener de manera ventajosa vitamina K. La vitamina K es un cofactor que se requiere para la carboxilación de residuos de ácido glutámico en el factor VII. Normalmente, la vitamina K puede

estar presente en el medio a una concentración de entre aproximadamente 0,1-50 mg/litro, preferiblemente entre aproximadamente 0,5-25 mg/litro, más preferiblemente entre aproximadamente 1-10 mg/litro y lo más preferiblemente 5 mg/litro aproximadamente.

- 5 La tabla a continuación (tabla 1) muestra una composición de un medio a modo de ejemplo adecuado para su uso en la presente invención. El medio usado es un medio libre de suero (BCS). El medio BCS es medio basado en DMEM/F12 de HAM que se ejemplifica de la siguiente manera:

Componente	g/l	Cantidad preferida
Medio mínimo sintético (DMEM/F12 de HAM)	1-100	11,00 -12,00
L-glutamina	0,05-1	0,9
NaHCO ₃	0,1-10	2,00
Etanolamina	0,0005-0,05	0,00153
Synperonic F 68	0,01-10	1,0
Rojo de fenol		0,008
Putrescina x 2HCl		0,0036
Sulfato férrico x7H ₂ O		0,0006
Opcionalmente: insulina		0,005
Vitamina K1 (o K3)		0,0025

- 10 Opcionalmente, pueden añadirse uno o más de componentes adicionales al medio de cultivo con los intervalos adecuados enumerados. Por ejemplo, el medio puede contener opcionalmente peptona de soja en un intervalo de 0,5-50 g/l y preferiblemente a 2,5 g/l. Otro componente opcional es ácido ascórbico presente en un intervalo de 0,0005-0,05 g/l y preferiblemente en un intervalo de 0,0035 g/l. En otros medios, un componente opcional es selenito de Na en un intervalo de aproximadamente 0,0001-0,001 g/l y preferiblemente a 0,0086 g/l.

- 15 Al poner en práctica la presente invención, las células que están cultivándose son líneas celulares CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650). Una línea celular CHO preferida es la línea celular CHO K1 disponible de la ATCC con el número de registro CCL61. En realizaciones específicas, la línea celular usada para los métodos de producción descritos en el presente documento es CHO rFVIIa BI WCB07002 con número de registro 08100801, esta línea celular es una línea celular que produce factor VII recombinante que se adapta para el crecimiento en condiciones libres de suero.

- 20 Cualquier línea celular CHO K1 estable adecuada que exprese FVII humano recombinante o derivados puede adaptarse para el crecimiento en condiciones libres de suero y libres de insulina y usarse en la práctica de esta invención. De manera adecuada, una línea celular CHO K1 estable que expresa rFVII puede crearse mediante transfección con el vector de plásmido pLN 194, vector de plásmido que codifica para el ADNc de FVII humano recombinante (rFVII) que se ha descrito previamente (Persson y Nielsen, 1996, FEBS Lett. 385, 241-243, incorporado como referencia en su totalidad); pLN329, un vector que codifica para una secuencia de reconocimiento de gamma-carboxilación, tal como se describió previamente en la solicitud PCT, PCT/DK01/00634 (incorporada como referencia en su totalidad); o una combinación de los mismos. En resumen, el vector pLN174 porta la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica para FVII humano que incluye el propéptido bajo el control de un promotor de metalotioneína de ratón para la transcripción del ADNc insertado, y ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón bajo el control de un promotor temprano de SV40 para su uso como marcador seleccionable. Una línea celular de este tipo adecuada incluye, pero no se limita a, E11, divulgada en la solicitud de patente PCT, PCT/DK01/00634, incorporada al presente documento en su totalidad.

- 35 En la realización más adecuada, la línea celular CHO K1 que expresa FVII humano recombinante se adapta para crecer en medio libre de suero y libre de insulina, tal como, por ejemplo, la línea celular descrita en los ejemplos más adelante, incluyendo, pero sin limitarse un clon 1E9 derivado de la línea celular HHü07 DMCB#10. Esta línea celular se denomina CHO rFVIIa BI WCB07002 y se depositó según el Tratado de Budapest con el número de registro 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.

- 40 La presente tecnología proporciona un método de adaptación de una línea celular CHO K1 recombinante que expresa FVII para crecer en condiciones libres de suero y libres de insulina. En determinadas realizaciones, una línea celular adaptada de este tipo se usa para la producción de rFVII. La línea celular CHO se prepara adaptando una línea celular CHO que expresa FVII humano recombinante que es capaz de crecer en condiciones de cultivo libres de suero para crecer en un cultivo celular libre de suero en ausencia de insulina mediante el cultivo en serie de dicha línea celular CHO en cantidades decrecientes de insulina para obtener una línea celular CHO que produce FVII que crece en ausencia de insulina y en ausencia de componentes derivados de animales. En algunas realizaciones, la línea celular CHO que crece en medio de cultivo libre de suero es 1E9. Una realización del método de cultivo en serie de la línea celular CHO que expresa FVII humano comprende pulsar pases sucesivos de la línea celular CHO que expresa FVII humano con concentraciones decrecientes de insulina. Una línea celular CHO a modo de ejemplo que se preparó usando los métodos de adaptación descritos en el presente documento se denomina

CHO rFVIIa BI insulinfree WCB08001 que se depositó según el Tratado de Budapest con el número de registro 08100802 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.

5 En un método a modo de ejemplo, la línea celular CHO que expresa FVII humano (por ejemplo, la línea celular depositada con el número de registro 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008) se adapta para el crecimiento en condiciones libres de insulina haciendo crecer una línea celular CHO que es capaz de crecer en medio libre de suero durante hasta el día 14 en medio libre de suero convencional que contiene insulina y en el día 14 transfiriendo dicha línea celular a un medio libre de suero y libre de insulina. Esta etapa en el método va seguida por hacer crecer las células en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días, pero más específicamente un día y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,2 mg/ml y hacer crecer las células de la línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 1 a 3 días, pero preferiblemente durante 3 días. El método puede comprender entonces además tras el crecimiento durante los de 1 a 3 días pero preferiblemente 3 días en medio que contiene insulina, transferir las células de dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina. El método comprende además hacer crecer dichas células de dicha línea celular CHO en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir dichas células de dicha línea celular CHO a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,070 mg/ml y hacer crecer dichas células de dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 8 días, pero más específicamente 8 días. El método puede incluir adicionalmente tras el crecimiento durante los de 3 a 8 días pero más específicamente 8 días en medio que contiene insulina, transferir dichas células de dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina. El método puede incluir además hacer crecer dichas células de dicha línea celular CHO en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir dichas células de dicha línea celular CHO a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,030 mg/ml y hacer crecer dichas células de dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero más específicamente 9 días. El método también puede incluir además tras el crecimiento durante de 3 a 9 días, pero más específicamente 9 días en medio que contiene insulina, transferir dichas células de dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina. En otro aspecto, el método puede comprender además hacer crecer dichas células en un medio libre de suero y libre de insulina durante un día y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,016 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, pero más específicamente 9 días. La línea celular se transfiere entonces un medio libre de suero y libre de insulina, en el que las células se adaptan para el crecimiento a largo plazo en medio libre de suero y libre de insulina (día 66 de cultivo). En usos a modo de ejemplo de este procedimiento, se generó la línea celular CHO rFVIIa BI insulinfree WCB08001 (que se depositó según el Tratado de Budapest con el número de registro 08100802 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008).

35 Además, según la presente divulgación, los métodos empleados para adaptar una línea celular que produce FVII para crecer en condiciones libres de suero y libres de insulina pueden aplicarse a otras líneas celulares. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1); células DUKX (línea celular CHO) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) (denominándose también las células DUKX, células DXB11) y DG44 (línea celular CHO) (Cell, 33: 405, 1983, y Somatic Cell 10 and Molecular Genetics 12: 555, 1986). También son útiles células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En algunas realizaciones, las células puede ser células mutantes o recombinantes, tales como, por ejemplo, células que expresan un espectro de enzimas cualitativa o cuantitativamente diferentes que catalizan la modificación postraducciona de proteínas (por ejemplo, enzimas de glicosilación tales como glicosil transferasas y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como propéptidos) del tipo celular del que se derivaron.

50 En otras realizaciones, se modifican mediante ingeniería genética células CHO para que expresen factor VII humano a partir de un gen recombinante. Tal como se usa en el presente documento, "factor VII" o "polipéptido de factor VII" engloba factor VII de tipo natural (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente estadounidense n.º 4.784.950), así como variantes de factor VII que presentan actividad biológica sustancialmente igual o mejorada con relación a factor VII de tipo natural. El término "factor VII" pretende englobar polipéptidos del factor VII en su forma sin escindir (zimógeno), así como aquéllos que se han procesado de manera proteolítica para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse como factor VIIa.

60 Normalmente, el factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para producir el factor VIIa. En los métodos de la invención, el factor VII producido puede ser un factor VII de tipo natural o puede ser un factor VII o factor VIIa en el que se han introducido alteraciones específicas de la secuencia de aminoácidos que modifican la bioactividad del polipéptido para o bien aumentar o bien disminuir la actividad.

65 La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación sanguínea se deriva de su capacidad para (i) unirse al factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del factor IX o el factor X para producir factor IX o X activado (el factor IXa o Xa, respectivamente). Con los propósitos de la invención, la actividad biológica del factor VIIa puede cuantificarse midiendo la capacidad de una preparación para promover la coagulación sanguínea usando plasma deficiente en factor VII y tromboplastina, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º

5.997.864. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción del tiempo de coagulación con relación a una muestra de control y se convierte en "unidades de factor VII" mediante comparación con un patrón de suero humano reunido que contiene 1 unidad/ml de actividad de factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del factor VIIa puede cuantificarse mediante (i) la medición de la capacidad del factor VIIa para producir el factor Xa en un sistema que comprende TF incrustado en una membrana lipídica y factor X. (Persson *et al.*, J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) la medición de la hidrólisis del factor X en un sistema acuoso; (iii) la medición de su unión física a TF usando un instrumento basado en la resonancia de plasmones superficiales (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997) y (iv) la medición de la hidrólisis de un sustrato sintético.

10 Las variantes del factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente igual o mejorada con relación a factor VIIa de tipo natural engloban aquéllas que presentan al menos aproximadamente el 25%, preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de la actividad específica del factor VIIa que se ha producido en el mismo tipo celular, cuando se somete a prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión a TF tal como se describió anteriormente. Las variantes del factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida con relación al factor VIIa de tipo natural son aquéllas que presentan menos de aproximadamente el 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de la actividad específica del factor VIIa de tipo natural que se ha producido en el mismo tipo celular, cuando se somete a prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión a TF, tal como se describió anteriormente. Las variantes del factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada con relación al factor VII de tipo natural incluyen, sin limitación, las variantes del factor VII que presentan actividad proteolítica del factor X independiente de TF y aquéllas que se unen a TF pero no escinden el factor X.

25 En algunas realizaciones, las células usadas en la práctica de la invención son capaces de crecer en cultivos en suspensión. Tal como se usa en el presente documento, células competentes para suspensión son aquéllas que pueden crecer en suspensión sin producir agregados grandes y firmes, es decir, células que están monodispersadas o crecen en agregados sueltos con sólo unas pocas células por agregado. Las células competentes para suspensión incluyen, sin limitación, células que crecen en suspensión sin adaptación o manipulación (tales como, por ejemplo, células hematopoyéticas o células linfoides) y células que se han hecho competentes para suspensión mediante la adaptación gradual de células dependientes de fijación (tales como, por ejemplo, células epiteliales o fibroblastos) a crecimiento en suspensión.

35 En algunas realizaciones, las células usadas en la práctica de la invención son células de adhesión (también conocidas como células dependientes de anclaje o dependientes de fijación). Tal como se usa en el presente documento, células de adhesión son aquéllas que necesitan adherirse o anclarse ellas mismas a una superficie adecuada para su propagación y crecimiento.

40 Métodos de cultivo

La presente invención usa métodos para el cultivo a gran escala de células CHO, que se llevan a cabo mediante las etapas de:

45 (i) inocular células en un recipiente de simiente que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina de cultivo y propagar el cultivo simiente al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada mínima;

(ii) transferir el cultivo simiente propagado a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene (a) medio de cultivo libre de suero y libre de insulina, en condiciones en las que las células migran sobre los portadores (en el caso de un procedimiento de portadores macroporosos); y

50 (iii) propagar el cultivo a gran escala en medio libre de suero y libre de insulina, al menos hasta que dichas células alcancen una densidad útil.

Los métodos pueden llevarse a cabo mediante las etapas de:

55 (i) inocular células en un recipiente de cultivo simiente que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y propagar el cultivo simiente al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada mínima;

60 (ii) transferir el cultivo simiente propagado a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene (a) medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y (b) portadores macroporosos, en condiciones en las que las células migran hacia los portadores; y

(iii) propagar el cultivo a gran escala en medio libre de suero y libre de insulina, al menos hasta que dichas células alcancen una densidad útil.

65 Los métodos pueden comprender además la etapa de:

(iv) mantener el cultivo obtenido en la etapa (iii) en medio en libre de suero y libre de insulina mediante la recogida regular del medio de cultivo y la sustitución por nuevo medio libre de suero y libre de insulina.

5 El intercambio de medio se realiza permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del recipiente de cultivo, tras lo cual se retira un porcentaje predeterminado del medio y se añade al cultivo un porcentaje correspondiente de medio libre de suero y libre de insulina. Los microportadores se resuspenden entonces en el medio. Este proceso de retirada y reposición de medio puede repetirse a intervalos predeterminados, tales como, por ejemplo, cada 24 horas.

10 Una etapa opcional adicional puede incluir una etapa de enfriamiento en el plazo de 10-240 minutos, tal como, por ejemplo, 20-180 minutos, o 30-120 minutos, antes de sedimentar los microportadores que contienen células. La etapa se lleva a cabo normalmente de la siguiente manera: Se enfría el biorreactor y se monitoriza la temperatura. Cuando el biorreactor alcanza una temperatura predeterminada por debajo de la temperatura del punto de consigna, tal como, por ejemplo, 10°C por debajo del punto de consigna del cultivo, se detiene la agitación del contenido del biorreactor y se sedimentan los portadores que contienen células. Cuando ha tenido lugar el intercambio de medio, se regula de nuevo la temperatura hasta el punto de consigna del cultivo. El nuevo medio que está añadiéndose se precalienta normalmente hasta una temperatura próxima al punto de consigna del cultivo.

20 El procedimiento puede ser un procedimiento de microportadores y las células son células dependientes de anclaje. En tal caso, tanto la fase de propagación como la fase de producción incluyen el uso de microportadores. Las células dependientes de anclaje deben ser capaces de migrar hacia los portadores (y al interior de los portadores si se usa un portador macroporoso) durante la(s) fase(s) de propagación y migrar hasta el nuevo portador cuando se transfieren al biorreactor de producción. Si las células dependientes de anclaje no son lo suficientemente capaces de migrar hasta los nuevos portadores por sí mismas, pueden liberarse de los portadores poniendo en contacto los microportadores que contienen células con enzimas proteolíticas o EDTA. El medio usado (específicamente, el medio libre de suero y libre de insulina) debe contener además componentes adecuados para soportar el crecimiento de células dependientes de anclaje; tal medio para células dependientes de anclaje está fácilmente disponible de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma.

30 Si se usan células adaptadas a suspensión o competentes para suspensión en un procedimiento de microportadores, la propagación de células puede realizarse en suspensión, por tanto sólo son necesarios microportadores en la fase de producción.

35 Inoculación y propagación inicial:

Se entenderá que la etapa (i) puede repetirse con un aumento progresivo del tamaño del recipiente de cultivo simiente, hasta que se obtenga un número suficiente de células para la etapa (ii). Por ejemplo, pueden usarse secuencialmente uno o más recipientes de cultivo de simiente de 5 litros, 50 litros, 100 litros o 500 litros. Un recipiente de cultivo simiente tal como se usa en el presente documento es uno que tiene una capacidad de entre aproximadamente 5 litros y 1000 litros. Normalmente, se inoculan células en un recipiente de cultivo simiente a una densidad inicial de aproximadamente $0,2-0,4 \times 10^6$ células/ml y se propagan hasta que el cultivo alcance una densidad celular de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml. Tal como se usa en el presente documento, la densidad mínima es de entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml.

45 Microportadores:

Tal como se usa en el presente documento, los microportadores son partículas, a menudo basadas en celulosa o dextrano, que normalmente son lo suficientemente pequeñas como para usarlas en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no provoque un daño por cizallamiento significativo a las células); son sólidas, porosas o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento poroso sobre la superficie; y tienen superficies cargadas positivamente (superficie exterior y interior en el caso de portadores porosos). Normalmente, los microportadores tienen un diámetro de partícula global de entre aproximadamente 150 y 350 μm ; y tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. Tales microportadores a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, Cytodex 1TM y Cytodex 2TM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ).

En una serie de realizaciones, el microportador es un portador sólido. Los portadores sólidos son particularmente adecuados para el crecimiento celular dependiente de anclaje. En otra serie de realizaciones, el microportador es un portador macroporoso.

60 Portadores macroporosos:

Tal como se usa en el presente documento, los portadores macroporosos son partículas, habitualmente basadas en celulosa, que tienen las siguientes propiedades: (a) son lo suficientemente pequeñas como para usarlas en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no provoque un daño por cizallamiento significativo a las células); (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente como para permitir que las células migren hacia

los espacios interiores de la partícula y (c) sus superficies (exterior e interior) están cargadas positivamente. En una serie de realizaciones, los portadores: tienen un diámetro de partícula global de entre aproximadamente 150 y 350 μm ; tienen poros que tienen un diámetro de abertura de poro promedio de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 μm ; y tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas realizaciones, la carga positiva la proporcionan grupos DEAE (N,N-dietilaminoetilo). Los portadores macroporosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1TM y Cytopore 2TM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ). Se prefieren particularmente portadores Cytopore 1TM, que tienen un diámetro medio de partícula de 230 μm , un tamaño de poro promedio de 30 μm y una densidad de carga positiva de 1,1 meq/g.

10 Condiciones de cultivo a gran escala:

Tal como se usa en el presente documento, un recipiente de cultivo a gran escala tiene una capacidad de al menos aproximadamente 100 litros, preferiblemente al menos aproximadamente 500 litros, más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 litros y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 5000 litros. Normalmente, la etapa (ii) implica transferir aproximadamente 50 litros del cultivo simiente propagado (que tiene aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml) a un recipiente de cultivo de 500 litros que contiene 150 litros de medio de cultivo. El cultivo a gran escala se mantiene en condiciones apropiadas de, por ejemplo, temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT), tensión de O_2 y CO_2 y velocidad de agitación, y el volumen se aumenta gradualmente añadiendo medio al recipiente de cultivo.

En el caso de un procedimiento de microportadores, el recipiente de cultivo también comprende aproximadamente 750 g de microportadores. Tras la transferencia, las células normalmente migran sobre la superficie de los portadores en el plazo de las primeras 24 horas. En el caso de un procedimiento de portadores macroporosos, el recipiente de cultivo también comprende aproximadamente 750 g de portadores macroporosos. Tras la transferencia, las células normalmente migran hacia el interior de los portadores en el plazo de las primeras 24 horas.

El término "procedimiento a gran escala" puede usarse de manera intercambiable con el término "procedimiento a escala industrial". Además, el término "recipiente de cultivo" puede usarse de manera intercambiable con "tanque", "reactor" y "biorreactor".

30 Expresión de proteína a alto nivel:

Cuando las células están propagándose con el fin de producir altos niveles de una proteína de factor VII, el periodo de tiempo hasta que la densidad celular alcanza una densidad celular predeterminada (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^6 células/ml) se designa como la "fase de crecimiento". La fase de crecimiento comprende normalmente las etapas (i), (ii) y (iii). Cuando la densidad celular alcanza el valor predeterminado (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^6 células/ml, preferiblemente al menos 2×10^6 células/ml, más preferido 5×10^6 células/ml), la fase se designa como la "fase de producción". La fase de producción comprende normalmente la etapa (iv). Cualquier cambio de parámetro adecuado, relacionado se introduce en esta fase.

40 Recipientes de cultivo:

Los recipientes de cultivo pueden ser, por ejemplo, reactores de tanque agitado convencionales (CSTR, *conventional stirred tank reactors*) en los que se obtiene la agitación por medio de reactores de elevación neumática o tipos de impulsores convencionales en los que se obtiene la agitación por medio de la introducción de aire desde el fondo del recipiente. Entre los parámetros controlados dentro de límites especificados están el pH, la tensión de oxígeno disuelto (DOT) y la temperatura. El pH puede controlarse mediante, por ejemplo, la variación de la concentración de CO_2 en el gas de espacio de cabeza y mediante la adición de base al líquido de cultivo cuando se requiera. Puede mantenerse la tensión de oxígeno disuelto mediante, por ejemplo, rociado con aire u oxígeno puro o mezclas de los mismos. El medio de control de la temperatura es agua, calentada o enfriada según sea necesario. El agua puede hacerse pasar a través de una camisa que rodea el recipiente o a través de un serpentín sumergido en el cultivo.

Una vez que se ha retirado el medio del recipiente de cultivo, puede someterse a una o más etapas de procesamiento para obtener la proteína deseada, incluyendo, sin limitación, centrifugación o filtración para retirar células que no se inmovilizaron en los portadores; cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión molecular; procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque (IEF) preparativo, solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), o extracción y similares. (Véanse, generalmente, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y Protein Purification, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

La purificación del factor VII o los polipéptidos relacionados con factor VII puede implicar, por ejemplo, cromatografía de afinidad en una columna con anticuerpo anti-factor VII (véanse, por ejemplo, Wakabayashi *et al.*, J. Biol. Chem. 261:11097, 1986; y Thim *et al.*, Biochem. 27:7785, 1988) y activación mediante escisión proteolítica, usando el factor XIIa u otras proteasas que tienen especificidad similar a tripsina, tales como, por ejemplo, el factor IXa, calicreína, el

factor Xa y trombina. (Véanse, por ejemplo, Osterud *et al.*, Biochem. 11:2853 (1972); Thomas, patente estadounidense n.º 4.456.591; y Hedner *et al.*, J. Clin. Invest. 71:1836 (1983)). Alternativamente, el factor VII puede activarse haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q® (Pharmacia) o similar.

5 La presente invención usa además métodos para el cultivo a gran escala de células de mamífero para producir cantidades industriales de los polipéptidos del factor VII que se expresan por tales células en condiciones libres de suero y libres de insulina. Los métodos se llevan a cabo mediante las etapas de:

10 (i) inocular células en un recipiente de cultivo que contiene medio libre de suero y libre de insulina y propagar dicho cultivo de células de mamífero al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada mínima;

15 (ii) transferir dicho cultivo celular propagado a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina; y

(iii) propagar el cultivo a gran escala en medio libre de suero y libre de insulina al menos hasta que dichas células alcancen una densidad útil.

20 Los métodos pueden comprender además la etapa de:

(iv) mantener el cultivo obtenido en la etapa (iii) en medio libre de suero y libre de insulina mediante la recogida regular del medio de cultivo y la sustitución por nuevo medio libre de suero y libre de insulina.

25 La siguiente descripción de procedimientos es aplicable para cualquier tipo celular en cualquier formulación de medio libre de suero y libre de insulina. Los dos primeros procedimientos descritos son para células fijadas a y/o inmovilizadas en un portador macroporoso.

Procedimientos de microportadores:

30 Pueden usarse dos tipos de procedimientos de microportadores, que son procedimiento de microportadores convencional y procedimiento de perfusión de microportadores. En el procedimiento de microportadores convencional, el procedimiento se opera en dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento y la fase de producción.

Fase de crecimiento

35 En un procedimiento de microportadores convencional, se inoculan las células en un recipiente de cultivo simiente que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y se propagan hasta que las células alcanzan la densidad mínima. Posteriormente, el cultivo simiente propagado se transfiere a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene (a) medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y (b) microportadores, en condiciones en las que
40 los portadores se colonizan completamente por las células, por ejemplo migrando al interior de los portadores en el caso de un procedimiento que usa portadores macroporosos.

45 En esta fase de crecimiento, se hacen crecer las células sobre microportadores hasta que los portadores se colonizan completamente. El intercambio de medio se realiza permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del recipiente de cultivo, tras lo cual se retira un porcentaje predeterminado del volumen de tanque y se añade al recipiente un porcentaje de volumen de tanque correspondiente de nuevo medio libre de suero y libre de insulina. Los microportadores se resuspenden entonces en el medio y este procedimiento de retirada y reposición de medio se repite a un intervalo predeterminado, por ejemplo cada 24 horas. La cantidad de medio repuesto depende de la densidad celular y puede ser normalmente de desde el 10-95%, preferiblemente desde el 25% hasta el 80%, del
50 volumen de tanque tal como se muestra en la tabla 2 a continuación.

55 Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para la expresión de proteína, aproximadamente el 60-95% del medio en el tanque se cambia cada 24 horas, preferiblemente el 80% aproximadamente. También se usa preferiblemente un intercambio de medio del 80% en la fase de producción.

En la siguiente tabla 2, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0
Temperatura	28-40°C	34-38°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90% de la saturación	20-80% de la saturación	50% de la saturación
Cambio de medio diario:			
- % de medio cambiado a	10-35% de medio intercambiado a 0,4-1,0x10 ⁶ células/ml	25% de medio intercambiado a 0,4-1,0x10 ⁶ células/ml	25% de medio intercambiado a 0,5x10 ⁶ células/ml
- % de medio cambiado a	30-70% de medio intercambiado a 0,7-3,0x10 ⁶ células/ml	50% de medio intercambiado a 0,7-3,0x10 ⁶ células/ml	50% de medio intercambiado a 1,0x10 ⁶ células/ml
- % de medio cambiado a	60-90% de medio intercambiado a 1,0-12,0x10 ⁶ células/ml	80% de medio intercambiado a 1,0-12,0x10 ⁶ células/ml	80% de medio intercambiado a 2,0-10x10 ⁶ células/ml

Tabla 2

Algunos de los puntos de consigna que son adecuados para la producción de FVII no son necesariamente adecuados para el crecimiento inicial de las células, o bien en el cultivo simiente o bien sobre los microportadores. Por ejemplo, la temperatura, DOT y/o pH pueden ser diferentes para las dos fases.

5 El intercambio de medio en esta fase, aunque sea al mismo nivel que en la fase de producción, se realiza para mantener las células vivas y creciendo.

10 Fase de producción

En la fase de crecimiento, el cultivo se propaga hasta que las células alcanzan una densidad de 1-12x10⁶ células por ml. Al alcanzar esta densidad, el cultivo entra en la fase de producción. También pueden cambiarse los puntos de consigna en este momento y establecerse en valores adecuados para la producción de FVII. El intercambio de medio se realiza permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del tanque, tras lo cual se retira el % seleccionado del volumen de tanque y se añade al recipiente un % correspondiente del volumen de tanque de nuevo medio. Puede intercambiarse desde el 25-90% del volumen de tanque; preferiblemente, se intercambia el 80% del volumen de tanque. Los microportadores se resuspenden entonces en el medio y este procedimiento de retirada y reposición de medio se repite cada 10-48 horas; preferiblemente, cada 24 horas.

20 En la tabla 3, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	26-40°C	30-37°C	32°C para CHO
Tensión de oxígeno disuelto	10-90% de la saturación	20-80% de la saturación	50%
- % de medio cambiado	25-90% de medio intercambiado cada 10-48 horas	80% de medio intercambiado cada 10-48 horas	80% de medio intercambiado cada 24 horas

Tabla 3

25 Opcionalmente, puede emplearse una disminución del punto de consigna de temperatura del cultivo cuando se entra en y durante la fase de producción. En particular, se prefiere una disminución de temperatura cuando se usa una línea celular CHO. A partir de las tablas 2 y 3, pueden observarse intervalos de temperatura y valores preferidos en la fase de crecimiento y de producción, respectivamente. Se preferiría una temperatura de aproximadamente 32°C para una línea celular CHO durante la fase de producción.

30 Alternativamente, puede aplicarse opcionalmente una etapa de enfriamiento inmediatamente antes de cada sedimentación de portadores. El cultivo se enfría hasta una temperatura predeterminada por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo (por ejemplo desde 5°C hasta 30°C, o desde 5°C hasta 20°C, o desde 5°C hasta 15°C, o hasta aproximadamente 10°C por debajo del punto de consigna). La etapa de enfriamiento se realiza dentro de un plazo de 10-240 minutos, tal como, por ejemplo 20-180 minutos, o 30-120 minutos, antes de sedimentar los microportadores que contienen células. La etapa se lleva a cabo normalmente de la siguiente manera: se enfría el biorreactor y se monitoriza la temperatura. Cuando el biorreactor alcanza una temperatura predeterminada por debajo de la temperatura del punto de consigna, tal como, por ejemplo, 10°C por debajo del punto de consigna del cultivo, se detiene la agitación del contenido del biorreactor y se sedimentan los portadores que contienen células. Cuando ha tenido lugar el intercambio de medio, se regula de nuevo la temperatura hasta el punto de consigna del

cultivo. El nuevo medio que está añadiéndose se precalienta normalmente hasta una temperatura próxima al punto de consigna del cultivo.

Procedimiento de perfusión de microportadores:

5 Este procedimiento se asemeja al procedimiento de microportadores convencional y se opera de nuevo en dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento y la fase de producción. La principal diferencia entre este procedimiento y el convencional descrito anteriormente es el método empleado para cambiar el medio de cultivo. En el procedimiento de microportadores convencional descrito anteriormente, se cambia de una vez un porcentaje definido del volumen de tanque, por ejemplo, el 80% del volumen total del tanque. En un procedimiento de perfusión, se añade el medio de manera continua y también se retira de manera continua un volumen igual de recogida. Esencialmente, el medio (% del volumen de tanque definido) se cambia gradualmente a lo largo de un periodo de tiempo predeterminado, por ejemplo un periodo de 24 horas.

15 Los microportadores se mantienen en el recipiente usando un dispositivo de separación (o dispositivo de perfusión) que permite que el medio salga del recipiente pero retiene los microportadores dentro del tanque.

Fase de crecimiento

20 Tal como se describe para el procedimiento de microportadores convencional excepto por el intercambio de medio gradual. El intercambio de medio se proporciona como el % de volumen de tanque por día, es decir, 24 horas. En la tabla 4, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento.

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0
Temperatura	28-40°C	34-38°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90% de la saturación	20-80% de la saturación	50%
Velocidad de flujo de medio			
- % de volumen de tanque por día (24 horas) a	10-35% de medio perfundido a 0,4-1,0x10 ⁶ células/ml	25% de medio perfundido a 0,4-1,0x10 ⁶ células/ml	25% de medio perfundido a 0,5x10 ⁶ células ml-1
- % de volumen de tanque por día (24 horas) a	30-70% de medio perfundido a 0,7-3,0x10 ⁶ células/ml	50% de medio perfundido a 0,7-3,0x10 ⁶ células/ml	50% de medio perfundido a 1,0x10 ⁶ células/ml
- % de volumen de tanque por día (24 horas) a	60-95% de medio perfundido a 1,0-12,0x10 ⁶ células/ml	80% de medio perfundido a 1,0-12,0x10 ⁶ células/ml	80% de medio perfundido a 2,0-10x10 ⁶ células/ml

Tabla 4

25 De nuevo, aunque esté perfundiéndose el cultivo a alto intercambio de medio (por ejemplo, el 80% del volumen de tanque) en una fase temprana, esto no se considera que es la fase de producción. Esto se debe a que parte de los puntos de consigna que son adecuados para la producción de FVII pueden no ser adecuados para el crecimiento inicial de las células sobre los microportadores. La perfusión con nuevo medio en esta fase se realiza para mantener las células vivas y creciendo. Con el propósito de comparación con el "procedimiento de microportadores convencional", la velocidad de flujo se expresa en cuanto al porcentaje del volumen de tanque de medio por día (24 horas).

Fase de producción

35 Como en el procedimiento descrito anteriormente, en la fase de crecimiento, el cultivo se propaga hasta que las células alcanzan una densidad de 1-12x10⁶ células por ml. Al alcanzar esta densidad, el cultivo entra en la fase de producción.

40 La perfusión de medio se realiza de manera continua. Con el propósito de comparación con el "procedimiento de microportadores convencional", la velocidad de flujo de medio se expresa en cuanto al porcentaje del volumen de tanque de medio por periodo de tiempo definido. La perfusión de medio puede ser de desde el 25-90% del volumen de tanque por 10-48 horas; preferiblemente, la perfusión de medio es del 80% por 10-48 horas, más preferido del 80% del volumen de tanque cada 24 horas. En la tabla 5, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

45

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	26-40°C	30-37°C	32°C para CHO
Tensión de oxígeno disuelto	10-90%	20-80%	50%
- % del volumen de tanque perfundido	25-90% de medio perfundido cada 10-48 horas	80% de medio perfundido cada 10-48 horas	80% de medio perfundido cada 24 horas

Tabla 5

Medios adecuados para lograr la retención de portadores es un dispositivo de asentamiento en el interior del recipiente, por ejemplo un tubo de inmersión.

- 5 Puede emplearse una disminución de temperatura cuando se entra en, y durante, la fase de producción. En particular, cuando se usa una línea celular CHO, se prefiere una disminución de temperatura. A partir de las tablas 2 y 3, pueden observarse intervalos de temperatura y valores preferidos en la fase de crecimiento y de producción, respectivamente. Se preferiría una temperatura de aproximadamente 32°C para una línea celular CHO durante la fase de producción.

10 Procedimientos con células en suspensión:

Existen dos opciones principales para un procedimiento con células en suspensión que son: 1) Procedimiento de perfusión; y 2) Procedimiento discontinuo/semidiscontinuo.

15 Procedimiento de perfusión:

Este procedimiento se asemeja al procedimiento resumido para la perfusión de microportadores. La principal diferencia es 1) que las células se hacen crecer suspendidas libremente sin inmovilizarse en portadores y 2) la naturaleza del dispositivo de perfusión empleado para retener la célula en el recipiente de cultivo. El procedimiento se opera de nuevo en dos fases diferenciadas: la fase de crecimiento y la fase de producción.

20 Fase de crecimiento

25 En un procedimiento de perfusión de células en suspensión, se inoculan las células en un recipiente de cultivo simiente que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad predeterminada mínima. Posteriormente, el cultivo simiente propagado se transfiere a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y se propaga hasta que se alcanza al menos una densidad celular predeterminada. En esta fase, las células se hacen crecer en suspensión para permitir que aumente el número de células dentro del recipiente de cultivo hasta un valor predeterminado o crítico. El intercambio de medio se realiza perfundiendo de manera continua el recipiente de cultivo con nuevo medio. La cantidad de medio perfundido depende de la densidad celular y puede ser normalmente de desde el 10-95%, preferiblemente desde el 25% hasta el 80%, del volumen de tanque por día (24 horas) tal como se muestra en la tabla 6 más adelante. Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para el inicio de la fase de producción, el 60-95% del medio del tanque en el tanque se cambia cada 24 horas, preferiblemente el 80%. También se usa preferiblemente un intercambio de medio del 80% en la fase de producción.

40 De nuevo, aunque esté perfundiéndose el cultivo en una fase temprana, esto no se considera que es la fase de producción. Esto se debe a que algunos de los puntos de consigna que son adecuados para la producción de FVII no son adecuados para el crecimiento inicial de las células sobre los portadores macroporosos. La perfusión con nuevo medio en esta etapa se realiza para mantener las células vivas y creciendo.

En la tabla 6, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0
Temperatura	28-40°C	34-38°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90%	20-80%	50%
Velocidad de flujo de medio			
- % de volumen de tanque por día a	10-35% del volumen a $0,4-1,0 \times 10^6$ células/ml	25% del volumen de tanque perfundido a $0,4-1,0 \times 10^6$ células/ml	25% del volumen de tanque perfundido a $0,5 \times 10^6$ células/ml
- % de volumen de tanque por día a	30-70% del volumen a $0,7-3,0 \times 10^6$ células/ml	50% del volumen de tanque perfundido a $0,7-3,0 \times 10^6$ células/ml	50% del volumen de tanque perfundido a $1,0 \times 10^6$ células/ml
- % de volumen de tanque por día a	60-95% del volumen a $1,0-12,0 \times 10^6$ células ml-1	80% del volumen de tanque perfundido a $1,0-12,0 \times 10^6$ células/ml	80% del volumen de tanque perfundido a $2,0-10 \times 10^6$ células/ml

Tabla 6

Fase de producción

5 En la fase de crecimiento, el cultivo se propaga hasta que las células alcanzan una densidad de $1-12 \times 10^6$ células por ml. Al alcanzar esta densidad, el cultivo entra en la fase de producción. También pueden cambiarse los puntos de consigna en este momento y establecerse en valores adecuados para la producción de FVII. La perfusión de medio se realiza de manera continua. Con el propósito de comparación, la velocidad de flujo de medio se expresa en cuanto al porcentaje del volumen de tanque de medio por periodo de tiempo definido. (Una unidad más convencional sería litros por día). La perfusión de medio puede ser de desde el 10-200% del volumen de tanque por 10-48 horas; 10 preferiblemente, la perfusión de medio es del 80% por 10-48 horas, más preferido el 80% del volumen de tanque cada 24 horas.

En la tabla 7, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	26-40°C	30-37°C	32°C para CHO
Tensión de oxígeno disuelto	10-90%	20-80%	50%
- % del volumen de tanque perfundido	10-200% del volumen de tanque perfundido en 10-48 horas	80% del volumen de tanque perfundido en 10-48 horas	80% del volumen de tanque perfundido cada 24 horas

Tabla 7

15 Dispositivos de perfusión

20 Puede lograrse la retención de células dentro del recipiente de cultivo usando varios dispositivos de retención de células. Los siguientes conjuntos de aparatos pueden usarse todos para este procedimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, cabezal de asentamiento externo, cabezal de asentamiento interno, centrífuga continua, filtro de centrifugación interno o externo, filtro externo o cartucho de fibra hueca, dispositivo de separación de células ultrasónico y un tramo de tubo en el interior del recipiente de cultivo.

25 Opcionalmente, puede emplearse una disminución de temperatura cuando se entra en y/o durante la fase de producción. En particular, cuando se usa una línea celular CHO, se prefiere una disminución de temperatura. A partir de las tablas 4 y 5, pueden observarse intervalos de temperatura y valores preferidos en la fase de crecimiento y de producción, respectivamente. Se preferiría una temperatura de aproximadamente 32°C para una línea celular CHO durante la fase de producción.

30 Procedimiento discontinuo / semicontinuo:

Estos son probablemente el tipo más sencillo de operar fermentaciones y existen tres opciones principales para un procedimiento con células en suspensión usando este formato: 1. Procedimiento discontinuo sencillo; 2. Procedimiento alimentado por lotes o 3. Procedimiento semicontinuo.

35 Procedimiento discontinuo sencillo:

En un procedimiento discontinuo sencillo, se inoculan las células en un recipiente de cultivo simiente que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima. Posteriormente, el cultivo simiente propagado se transfiere a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene medio de cultivo libre de suero y libre de insulina. El recipiente de cultivo se opera entonces hasta que se agotan los nutrientes en el medio. En la tabla 8, se muestra un resumen de este aspecto del procedimiento:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0
Temperatura	28-40°C	30-37°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90%	20-80%	50%
- disminución de temperatura hasta (opcional)	26-39°C	30-36°C	32°C
- disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml

Tabla 8

Un aspecto opcional del procedimiento es el uso de una temperatura operativa reducida. Un procedimiento discontinuo de este tipo consistiría en una fase inicial de crecimiento a una temperatura específica adecuada para el crecimiento de la línea celular usada seguido por una disminución de la temperatura operativa a una densidad celular predeterminada, por ejemplo de 1-12x10⁶ células/ml. Esto es particularmente relevante para líneas celulares CHO. Un procedimiento discontinuo preferido para CHO consistiría en una fase inicial de crecimiento a 37°C seguido por una disminución de la temperatura operativa a 1-12x10⁶ células/ml, preferiblemente 2-10x10⁶ células/ml. Preferiblemente, la disminución de temperatura sería de desde 37°C hasta 32°C en el caso de células CHO. Ha de determinarse el tiempo de recogida. Se opera un lote tradicional hasta que se hayan agotado todos los nutrientes. Sin embargo, esto provoca normalmente lisis celular, que o bien puede ser dañina para el producto o bien puede provocar problemas para la purificación.

Procedimiento alimentado por lotes:

Tal como se estableció previamente, un procedimiento discontinuo sencillo consiste en inocular un recipiente de cultivo con células y operar el tanque hasta que se agoten los nutrientes en el medio. Un procedimiento discontinuo tal como éste puede extenderse alimentando una disolución concentrada de nutrientes al tanque. Esto extiende el tiempo de procedimiento y conduce, en última instancia, a un aumento de la producción de FVII dentro del recipiente de cultivo.

Es importante monitorizar la concentración de glucosa en el recipiente de cultivo. El control y el inicio de la alimentación están relacionados con el nivel de este nutriente. Cuando la concentración de glucosa disminuye por debajo de un valor crítico, se inicia una alimentación y la cantidad de alimentación añadida es suficiente para elevar la concentración de glucosa de vuelta hasta este valor crítico. En la tabla 9, se muestra un resumen de un procedimiento del aspecto de alimentación por lotes:

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
pH	6-8	6,6-7,6	7,0
Temperatura	28-40°C	30-37°C	36-37°C
Tensión de oxígeno disuelto	10-90%	20-80%	50%
- Disminución de temperatura hasta (opcional)	28-39°C	30-36°C	32°C
- Disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml
Alimentación iniciada a la concentración de glucosa	6-0 g/l	3-0 g/l	Cuando la glucosa < 2 g/l

Tabla 9

De nuevo, puede ser útil usar una temperatura operativa particularmente reducida cuando se hacen crecer líneas celulares CHO. Un procedimiento de alimentación por lotes de este tipo consistiría en una fase inicial de crecimiento a una temperatura específica adecuada para el crecimiento de la línea celular usada seguido por una disminución de la temperatura operativa a una densidad celular predeterminada, por ejemplo 1-12x10⁶ células/ml. Un procedimiento

de alimentación por lotes preferido para CHO consistiría en una fase inicial de crecimiento a 37°C seguido por una disminución de la temperatura operativa a $1-12 \times 10^6$ células/ml, preferiblemente $2-10 \times 10^6$ células/ml. Preferiblemente, la disminución de temperatura sería de desde 37°C hasta 32°C en el caso de células CHO.

- 5 Como en un procedimiento discontinuo sencillo, ha de determinarse el tiempo de recogida como un equilibrio entre el funcionamiento más largo posible del tanque y el riesgo de lisis celular.

Composición de alimentación y estrategia de adición

- 10 La alimentación más sencilla adecuada para su uso sería una disolución concentrada de glucosa. Sin embargo, la alimentación de glucosa sola únicamente extenderá la fase por lotes durante una corta duración de tiempo. Esto es debido a que entonces se agotará otro nutriente tal como un aminoácido o un lípido o una vitamina. Por este motivo, sería preferible una alimentación concentrada. La alimentación concentrada más sencilla adecuada para su uso sería el medio celular a una concentración $\times 10-50$.

- 15 En la tabla 10, se muestra un resumen de este aspecto.

Composiciones de alimentación	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
Glucosa	50-1000 g/l	50-500 g/l	200 g/l
Concentrado de medio	X 10-50	X 2-20	X 10
Concentrado modificado de modo que los componentes individuales del medio están en los intervalos de:	0 - x50	0 - x20	0 - x10
La composición más probable de un concentrado			
• Tampón	0 - x50	0 - x20	x1
• Lípidos	0 - x50	0 - x20	x1
• Fuente de hierro	0 - x50	0 - x20	x1
• Cisteína y cistina	0 - x50	0 - x20	x1
• Hidrolizados de plantas	0 - x50	0 - x20	x1
• Todos los demás componentes	0 - x50	0 - x20	x10

Tabla 10

- 20 Desafortunadamente, parte de los componentes del medio pueden ser perjudiciales para la célula o simplemente no se disolverán a alta concentración. Por este motivo, la alimentación podría necesitar una modificación para mantener estos componentes problemáticos a bajo nivel. El método de adición de la alimentación es también una variable. Puede añadirse la alimentación o bien como un único pulso (una vez, dos veces, tres veces etc., al día) o bien puede alimentarse gradualmente a lo largo de un periodo de 24 horas. Una opción de alimentación avanzada sería tener cierta forma de sensor de glucosa en el recipiente de cultivo que controlase la velocidad de alimentación para mantener una concentración de glucosa constante en el recipiente. Ha de determinarse el tiempo de recogida. Se opera un lote tradicional, o sencillo, hasta que se hayan agotado todos los nutrientes. Esto no es generalmente un problema en un sistema de alimentación por lotes. Sin embargo, el procedimiento no puede sostenerse indefinidamente debido a la acumulación de metabolitos tóxicos. Esto conduce a una disminución de la viabilidad celular y, en última instancia, a lisis celular. Esto puede provocar daño al producto o provocar problemas para la purificación posterior.

30 Procedimiento semicontinuo (Draw-Fill):

Se describirán en este caso dos tipos de procedimiento semicontinuo. Éstos son el procedimiento semicontinuo sencillo y el procedimiento semicontinuo de alimentación por lotes.

35 Procedimiento semicontinuo sencillo:

- 40 Este procedimiento se asemeja estrechamente a una fermentación por lotes repetida. En la fermentación por lotes, las células crecen en el recipiente de cultivo y se recoge el medio al final de la ejecución. En un procedimiento semicontinuo, se recoge el recipiente de cultivo antes de que llegue a agotarse cualquiera de los nutrientes. En lugar de retirar todo el contenido del recipiente, sólo se retira una proporción del volumen de tanque (normalmente el 80%

del volumen de tanque). Tras la recogida, se añade el mismo volumen de nuevo medio de vuelta al recipiente. Entonces se permite que crezcan las células en el recipiente una vez más y se toma otro 80% de recogida un número establecido de días después. En procedimientos por lotes repetidos, las células que quedan en el recipiente tras una recogida pueden usarse como inóculo para el siguiente lote.

5 En la tabla 11, se muestra un resumen de un procedimiento semicontinuo. El procedimiento se opera en dos fases. La primera fase del procedimiento se opera de manera idéntica a un procedimiento discontinuo sencillo. Tras la primera recogida, se opera de nuevo el recipiente de cultivo como un procedimiento discontinuo sencillo; sin embargo, la duración del lote es más corta que la del primer lote debido a la mayor densidad inicial celular. Se continúan indefinidamente estas "fases por lotes repetidas" cortas.

10 Un resumen sencillo de un procedimiento semicontinuo que va a emplearse es:

15 Fase por lote inicial

- i. Inocular el recipiente y permitir que crezcan las células a una temperatura adecuada para el crecimiento.
- ii. Disminuir la temperatura hasta una temperatura adecuada para la expresión a una densidad celular predeterminada.
- 20 iii. 7 días tras la inoculación retirar un % predeterminado, por ejemplo el 80%, del volumen de tanque y reponer con el mismo volumen de nuevo medio.

25 Fase por lote repetida

- iv. Aumentar la temperatura hasta una temperatura adecuada para el crecimiento y permitir que crezcan las células.
- v. Disminuir la temperatura hasta una temperatura adecuada para la expresión a una densidad celular predeterminada.
- 30 vi. 5 días tras el comienzo de esta fase retirar un % predeterminado, por ejemplo el 80%, del volumen de tanque y reponer con el mismo volumen de nuevo medio.
- vii. Ir a la etapa iv.

35 En una realización preferida, la línea celular es una línea celular CHO. Un resumen sencillo de un procedimiento semicontinuo que podría emplearse para una línea celular CHO es:

40 Fase por lotes inicial

- viii. Inocular el recipiente y permitir que crezcan las células a 37°C.
- vix. Disminuir la temperatura hasta 32°C a $2 \cdot 10 \times 10^6$ células/ml.
- 45 vx. 7 días tras la inoculación retirar el 80% del volumen de tanque y reponer con el mismo volumen de nuevo medio libre de suero y libre de insulina.

Fase por lotes repetida

- 50 xi. Aumentar la temperatura hasta 37°C y permitir que crezcan las células.
- xii. Disminuir la temperatura hasta 32°C a $2 \cdot 10 \times 10^6$ células/ml.
- xii. 5 días tras el comienzo de esta fase retirar el 80% del volumen de tanque y reponer con el mismo volumen de nuevo medio libre de suero y libre de insulina.
- 55 xiii. Ir a la etapa xi.

60 El recipiente de cultivo puede operarse dentro de un amplio intervalo de tiempos de ciclo y un amplio intervalo de volúmenes semicontinuos. A partir de la tabla 11, pueden observarse intervalos y valores preferidos.

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Intervalo más preferido
Fase por lotes inicial			
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	28-40°C	30-37°C	37°C para CHO
Disminución de temperatura (OPCIONAL)			
• Disminución de temperatura hasta	26-39°C	30-36°C	32°C
• Disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml
DOT	10-100%	20-60%	30%
Recogida			
• Volumen de tanque	10-99%	10-90%	80%
• Volumen de recogida	2-10 días.	5-10 días.	9 días tras el comienzo
Alimentación iniciada	6-0 g/l	3-0 g/l	Cuando la glucosa < 2 g/l
Fases por lotes repetidas			
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	28-40°C	30-37°C	37°C para CHO
Disminución de temperatura (OPCIONAL)			
- Disminución de temperatura hasta	26-39°C	30-36°C	32°C
- Disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml
DOT	10-100%	20-60%	30%
Recogida			
• Volumen de tanque	10-99%	10-90%	80%
• Volumen de recogida	2-10 días.	5-10 días.	9 días tras el comienzo
Alimentación iniciada	3-0 g/l	3-0 g/l	Cuando la glucosa < 2 g/l

Tabla 11

Procedimiento semicontinuo de alimentación por lotes

- 5 Este procedimiento es una fermentación semicontinua con una alimentación concentrada similar al tipo propuesto en el procedimiento alimentado por lotes. Una preocupación con un procedimiento semicontinuo sencillo es que el nuevo medio añadido puede no ser suficiente para sostener las células a lo largo de fermentaciones por lotes repetidas. La inclusión de una alimentación eliminaría esta preocupación. Una alimentación también permitiría operar el recipiente de cultivo con largos tiempos de lote en un procedimiento semicontinuo.
- 10 La composición de la alimentación y la estrategia para la adición serían idénticas a las del procedimiento alimentado por lotes. En la tabla 12, se muestra un resumen de procedimiento para esto.

Punto de consigna	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
Fase por lotes inicial			
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	28-40°C	30-37°C	37°C para CHO
Disminución de temperatura (OPCIONAL)			
• Disminución de temperatura hasta	26-39°C	30-36°C	32°C
• Disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml
DOT	10-100%	20-60%	30%
Recogida			
• Volumen de tanque	10-99%	10-90%	80%
• Volumen de recogida	2-10 días.	5-10 días.	9 días tras el comienzo
Alimentación iniciada	6-0 g/l	3-0 g/l	Cuando la glucosa < 2 g/l
Fases por lotes repetidas			
pH	6-8	6,6-7,6	7,0 para CHO
Temperatura	28-40°C	30-37°C	37°C para CHO
Disminución de temperatura (OPCIONAL)			
- Disminución de temperatura hasta	26-39°C	30-36°C	32°C
- Disminución de temperatura a	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	0,5 - 12,0x10 ⁶ células/ml	2,0 - 10x10 ⁶ células/ml
DOT	10-100%	20-60%	30%
Recogida			
• Volumen de tanque	10-99%	10-90%	80%
• Volumen de recogida	1-7 días.	1-7 días.	5 días tras el comienzo
Alimentación iniciada	6-0 g/l	3-0 g/l	Cuando la glucosa < 2 g/l

Tabla 12

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Aislamiento de la línea celular CHO K1 que expresa el factor VII en condiciones libres de suero y libres de insulina

10 Se cultivó en serie una línea celular 1E9 de ovario de hámster chino (CHO) que se añadió a insulina recombinante humana (insulina r) para el crecimiento celular de la siguiente manera para desarrollar una línea celular capaz de producir FVII en condiciones libres de insulina y libres de suero. La línea celular con crecimiento dependiente de insulina recombinante humana fue CHO rFVIIa BI WCB07002 depositada con el número de registro 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008. El medio usado fue el medio BCS complementado con vitamina K1 (2,5 mg/ml) [Merck] y cantidades diluidas en serie de insulina r [insulina recombinante, NOVOLIN, Novo Nordisk].

15 El medio "libre de insulina" era medio BCS libre de suero que contenía vitamina K1 2,5 mg/l. Para las diluciones en serie, se preparó medio BSC que contenía diluciones en serie de insulina r tal como se describe en la tabla 13, incluyendo 1,25 mg/l, 0,625 mg/l, 0,208 mg/l, 0,069 mg/l, 0,250 mg/l, 0,063 mg/l, 0,031 mg/l y 0,015 mg/l.

Medio, nombre	Descripción	Composición
M/CBL/07/081	Libre de insulina	Medio BCS (ORSFBCS0700102) Vitamina K1 (2,5 mg/ml)
M/CBL/07/083	Insulina r 1,25 mg/l	Medio BCS (ORSFBCS0700102) vitamina K1 (2,5 mg/l) R/CBL/07/023 Insulina r humana (1,25 mg/l): R/CBL/07/021
M/CBL/07/086	Insulina r 0,625 mg/l	½ M/CBL/07/081 ½ M/CBL/07/083
M/CBL/07/090	Insulina r 0,208 mg/l	½ M/CBL/07/081 ½ M/CBL/07/091
M/CBL/07/091	Insulina r 0,625 mg/l	½ M/07/081 ½ M/CBL/07/083
M/CBL/07/095	Insulina r 0,069 mg/l	½ M/CBL/07/081 ½ M/CBL/07/090
M/CBL/07/098	Insulina r 0,25 mg/l	M/CBL/07/081 Insulina r humana (0,250 mg/l)
M/CBL/07/099	Insulina r 0,063 mg/l	½ M/CBL/07/081 ½ M/CBL/07/098
M/CBL/07/100	Insulina r 0,031 mg/l	½ M/CBL/07/081 ½ M/CBL/07/099
M/CBL/07/104	Libre de insulina	Medio BCS (ORSFBCS0700103) Vitamina K1 (2,5 mg/l) (R/CBL/07/023)
M/CBL/07/110	Libre de insulina	Medio BCS (ORSFBCS0700201) Vitamina K1 (2,5 mg/l) (R/CBL/07/023)
M/CBL/07/118	Libre de insulina	Medio BCS (ORSFBCS0700301) Vitamina K1 (2,5 mg/l) (R/CBL/07/023)

Tabla 13

5 Se realizó el protocolo para la adaptación satisfactoria de células 1E9-CHO rFVIIa (insulina r humana 5 mg/l-DMCB #10 (HHú07082) a condiciones libres de suero y libres de insulina mediante pases en serie de las células tal como se describe en la tabla 14. Se realizaron los pases en serie mediante “reducción en gradiente” controlada de la concentración de insulina en el medio hasta que se lograron condiciones libres de suero. Se “pulsaron” las células con medio que contenía insulina gradualmente reducida entre el cultivo de células en medio libre de insulina durante un día. Se realizó la monitorización concurrente del crecimiento y la viabilidad celulares. La figura 1 representa la reducción de la dependencia de las células de la insulina.

ES 2 547 881 T3

etapa de adaptación experimento		día de cultivo	Concentración de insulina/ operación	N.º de medio prot.
1	RE07-099	00	Descongelar, 1,25 mg/l	M/CBL/07/083
		05	Transferir 80 ml de suspensión celular	M/CBL/07/083
2	RE07-100	00	+ 100 ml de medio, libre de insulina (0,555 mg/l)	M/CBL/07/081
		02	Dividir (0,602 mg/l)	M/CBL/07/086
		04	Dividir (0,617 mg/l)	M/CBL/07/086
		06	Dividir (0,622 mg/l)	M/CBL/07/086
		08	Transferir 70 ml de suspensión celular	M/CBL/07/086
		00	+ 140 ml de medio, libre de insulina (0,207 mg/l)	M/CBL/07/081
3	RE07-109	02	Dividir (0,208 mg/l)	M/CBL/07/090
		04	Transferir 70 ml de suspensión celular	M/CBL/07/090
4	RE07-111	00	+ 140 ml de medio, libre de insulina (0,069 mg/l)	M/CBL/07/081
		03	Dividir (0,069 mg/l)	M/CBL/07/095
		05	Dividir (0,069 mg/l)	M/CBL/07/095
		07	Dividir (0,069 mg/l)	M/CBL/07/095
		09	Transferir 70 ml de suspensión celular	M/CBL/07/099
5	HHü07-098	00	+ 140 ml de medio, libre de insulina (0,022 mg/l)	M/CBL/07/081
		02	Dividir (0,028 mg/l)	M/CBL/07/100
		04	Dividir (0,030 mg/l)	M/CBL/07/100
		06	Dividir (0,031 mg/l)	M/CBL/07/100
		08	Dividir (0,031 mg/l)	M/CBL/07/100
		10	Transferir 70 ml de suspensión celular	M/CBL/07/100
		00	+ 140 ml de medio (0,021 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/104
6	HHü07-102	02	Dividir (0,018 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/104
		04	Dividir (0,017 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/104
		06	Dividir (0,016 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/090
		07	Dividir (0,016 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/090
		09	Dividir (0,016 mg/l)	M/CBL/07/100 M/CBL/07/090
		10	Congelar (ECB HH007-117)	-
7	HHü07-112	00	Descongelar (libre de insulina)	M/CBL/07/110
		07	Dividir (libre de insulina)	
		11	Dividir (libre de insulina)	
		17	Dividir (libre de insulina)	
		19	Dividir (libre de insulina)	
		20	Congelar (ECB HH007-117)	
8	HHü07-119	00	Descongelar (libre de insulina)	M/CBL/07/118
		04	Dividir (libre de insulina)	
		06	Dividir (libre de insulina)	
		10	Dividir (libre de insulina)	
		13	Dividir (libre de insulina)	
		15	Dividir (libre de insulina)	
		17	Dividir (libre de insulina)	
		19	Dividir (libre de insulina)	
		21	Dividir (libre de insulina)	
		22	Congelar (PMCB HH007-124)	

Tabla 14

La figura 2 representa un gráfico que muestra los niveles de insulina durante el pulsado de las células para adaptarlas a condiciones libres de suero.

De manera sorprendente, este método de pulsado con medio libre de suero que contiene insulina, que contiene cantidades gradualmente decrecientes de insulina, da como resultado la producción de una línea celular que crece en condiciones libres de suero y libres de insulina, mientras que los pases convencionales en medio con diluciones en serie de insulina no producen una línea celular viable. Tal como se muestra en la figura 3, las células que se hicieron pasar mediante técnicas de dilución en serie convencional de insulina r no sobrevivieron más de tres pases (día 17, insulina 0,156 mg/l).

Ejemplo 2 Condiciones de producción a modo de ejemplo

Se genera el rFVII mediante un clon de células de ovario de hámster chino (CHO) en un procedimiento de fermentación en cultivo en suspensión. El medio de crecimiento es un medio definido químicamente que está libre de sustancias derivadas de animales o humanos y está libre de insulina. Se cultiva la línea celular producida tal como se describió anteriormente en frascos de vidrio y matraces de cultivo tisular disponibles comercialmente (cultivos con agitación) a una temperatura de 37°C. Se mantiene el pH del cultivo mediante la introducción de CO₂ (al 7,5%) y NaHCO₃ derivado del medio líquido.

Se usa un medio libre de suero (BCS) para el cultivo de las células. El medio BCS es una formulación basada en DMEM/F12 de HAM complementada con los siguientes aditivos: i) glutamina; concentración final de 0,9 g/l, ii) sulfato férrico x7H₂O 0,0006 g/l, iv) putrescina, x 2HCl 0,0036 g/l, vi) vitamina K1 0,0025 g/l y vii) Synperonic; concentración final de 1 g/l, rojo de fenol 0,008 g/l, etanolamina 0,00153 g/l, hidrogenocarbonato de Na 2 g/l). Para propósitos de comparación, se hace crecer la línea celular hecha crecer en medio libre de suero, que contiene insulina en el mismo medio pero complementado con insulina 0,005 mg/l. Obsérvese que en este medio puede usarse vitamina K1 o K3.

En la siguiente tabla 15, se resumen los puntos de consigna de parámetros de procedimiento usados para la fermentación:

Parámetro	Punto de consigna
Densidad	1,0 - 3,0 x 10 ⁶ /ml
Temperatura	36,0 +- 2,0°C
pH	6,8 - 7,4
pO ₂	20% - 80% de la saturación del aire
Tiempo de procedimiento total (recogida)	20 - 60 días

Tabla 15

Más específicamente, la densidad celular de las células en el cultivo a gran escala está a 1-3x10⁶/ml, y el cultivo se mantiene a pH 7,1 +-0,3, pO₂ del 10-50%, con una tasa de dilución de 0,25-1,5.

Para la producción a gran escala de factor VIIa recombinante, se usa un sistema de biorreactor de 100 litros para el desarrollo de material preclínico. Se ha confirmado un procedimiento robusto y estable a los niveles de producción a gran escala usando una línea celular (1E9; depositada con el número de registro n.º 08100801, depositada ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008) que crece en presencia de insulina. Se proporciona a continuación un resumen de datos de la campaña de producción preclínica: La velocidad de crecimiento específica de las células es de aproximadamente 0,50 al día. El punto de consigna de la densidad celular a aproximadamente 2 x 10⁶ células por ml. El título de antígeno de factor VII es de aproximadamente 10 µg/. La actividad de FVII (ensayo cromogénico) es de aproximadamente 20 U/ml. La productividad de FVII basada en antígeno es de 3-4 mg/l/día y basada en actividad, es de 7000 - 10000 U/l/día. En la totalidad de los lotes de producción, la estabilidad fue constante a lo largo de un periodo de 40 días. Los inventores han mostrado que las líneas celulares producidas en condiciones libres de insulina (línea celular depositada con el número de registro n.º 08100802, depositada ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008) muestran las mismas características que el banco de células de producción 1E9 original (cultivadas con insulina). No pudieron observarse diferencias en cuanto a la tasa de crecimiento específica, la expresión de rFVII y la estabilidad de las células.

Un método preferido para cultivar las células en medio libre de suero y libre de insulina es el método quimiostático. Este método los conocen bien expertos en la técnica y se ha descrito en, por ejemplo, Werner *et al.* J. Biotechnol. 1992, 22 págs. 51-68. Por ejemplo, puede usarse un biorreactor agitado o un reactor de elevación neumática.

Los parámetros para cultivar las células tales como concentración de O₂, velocidad de perfusión o intercambio de medio, pH, temperatura y técnica de cultivo dependerán de los tipos celulares individuales usados y pueden determinarse por el experto. Por ejemplo, en ejemplos específicos, las condiciones en un método preferido son tales

que la densidad celular de las células en el cultivo a gran escala está a $1-3 \times 10^6$ /ml, y el cultivo se mantiene a pH 7,1 $\pm 0,3$, pO_2 del 10-50%, con una tasa de dilución de 0,25-1,5.

5 La presente tecnología se describe ahora en términos tan completos, claros y concisos que permitan a un experto en la técnica a la que pertenece, poner en práctica la misma. Además, los ejemplos se proporcionan para no ser exhaustivos sino ilustrativos de varias realizaciones que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir factor VII (FVII) humano recombinante, que comprende:
 - a) obtener una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa FVII humano recombinante; y
 - b) cultivar dicha célula CHO en medio libre de suero que carece de insulina,

en el que dicha célula CHO se prepara adaptando una línea celular CHO que expresa FVII humano recombinante modificada para el crecimiento en cultivo libre de suero para crecer en cultivo celular en ausencia de insulina mediante el cultivo en serie de dicha línea celular CHO en cantidades decrecientes de insulina para obtener una línea celular CHO que produce FVII que crece en ausencia de insulina, y

en el que dicho cultivo en serie comprende pulsar pases sucesivos de células CHO con concentraciones decrecientes de insulina.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha línea celular CHO que expresa FVII humano recombinante modificada para el crecimiento en cultivo libre de suero es la línea celular 1E9, línea celular depositada con el número de registro n.º 08100801 ante la Colección Europea de Cultivos Celulares, Porton Down, R.U., el 8 de octubre de 2008.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo celular comprende vitamina K1.
4. Método según la reivindicación 1, en el que una etapa en el pulsado comprende hacer crecer una línea celular CHO hasta el día 14 en medio libre de suero convencional que contiene insulina y en el día 14 transferir dicha línea celular a un medio libre de suero y libre de insulina.
5. Método según la reivindicación 4, que comprende

entonces hacer crecer dichas células en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,2 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 1 a 3 días, y

posteriormente, tras el crecimiento durante de 1 a 3 días en medio que contiene insulina, transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina.
6. Método según la reivindicación 5, que comprende

entonces hacer crecer dichas células en un medio libre de suero y libre de insulina durante preferiblemente 1 día y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,070 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 8 días, y,

tras el crecimiento durante de 3 a 8 días en medio que contiene insulina, transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina.
7. Método según la reivindicación 6, que comprende

entonces hacer crecer dichas células en un medio libre de suero y libre de insulina durante 1 día y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,030 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, y

tras el crecimiento durante de 3 a 9 días en medio que contiene insulina, transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina.
8. Método según la reivindicación 7, que comprende

entonces hacer crecer dichas células en un medio libre de suero y libre de insulina durante 1 día y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,016 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días, y

entonces transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina.
9. Método de adaptación de una línea celular que produce FVII que crece en medio libre de suero a una línea celular que crece en medio libre de suero y libre de insulina, que comprende pulsar pases sucesivos de células CHO con concentraciones decrecientes de insulina, en el que dicho pulsado comprende a) hacer

crecer dicha línea celular durante de 1 a 9 días en medio que contiene insulina seguido por b) crecimiento en medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días y repetir las etapas a) y b), en el que el medio en cada etapa a) sucesiva contiene aproximadamente la mitad de la concentración de insulina que en la etapa a) anterior hasta que el medio no contiene insulina detectable.

- 5
10. Método según la reivindicación 9, en el que dicho método comprende:
- 10
- a) hacer crecer una línea celular CHO hasta el día 14 en medio libre de suero convencional que contiene insulina y en el día 14 transferir dicha línea celular a un medio libre de suero y libre de insulina;
- 15
- b) hacer crecer dichas células de la etapa b) en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 2 días y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,2 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 1 a 3 días;
- 20
- c) tras el crecimiento durante de 1 a 3 días en medio que contiene insulina de la etapa b), transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina;
- 25
- d) hacer crecer dichas células de la etapa c) en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 3 días y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,070 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 8 días;
- 30
- e) tras el crecimiento durante de 3 a 8 días en medio que contiene insulina en la etapa d), transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina;
- 35
- f) hacer crecer dichas células de la etapa e) en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 2 días y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,030 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días;
- 40
- g) tras el crecimiento durante de 3 a 9 días en medio que contiene insulina en la etapa f), transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina;
- 45
- h) hacer crecer dichas células de la etapa g) en un medio libre de suero y libre de insulina durante de 1 a 2 días y entonces transferir dichas células a un medio que contiene insulina que comprende insulina 0,016 mg/ml y hacer crecer dicha línea celular CHO en dicho medio que contiene insulina durante de 3 a 9 días; y
- 50
- i) tras el crecimiento durante de 3 a 9 días en medio que contiene insulina en la etapa h), transferir dicha línea celular CHO a medio libre de suero y libre de insulina, en el que las células en la etapa i) se adaptan para el crecimiento a largo plazo en medio libre de suero y libre de insulina.
- 55
11. Célula CHO que puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 9 o la reivindicación 10.
- 60
12. Célula CHO según la reivindicación 11, en el que la célula CHO puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 9, y en el que la célula CHO es una célula CHO recombinante que expresa FVII humano y se adapta para el crecimiento en un medio libre de insulina que carece de componentes derivados de animales.
- 65
13. Método para la producción a gran escala de un FVII o un polipéptido relacionado con FVII en células CHO, comprendiendo dicho método:
- (a) inocular una célula CHO según la reivindicación 11 en un recipiente de cultivo que contiene medio libre de suero y libre de insulina y propagar dicho cultivo de células de mamífero al menos hasta que las células alcancen una densidad predeterminada;
- (b) transferir dicho cultivo simiente propagado a un recipiente de cultivo a gran escala que contiene medio libre de suero y libre de insulina;
- (c) propagar dicho cultivo a gran escala en medio libre de suero y libre de insulina, al menos hasta que dichas células alcancen una densidad predeterminada;
- (d) mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de suero y libre de insulina, en condiciones apropiadas para la expresión de FVII o la expresión de polipéptido relacionado con FVII; y

- (e) recuperar el FVII o el polipéptido relacionado con FVII del cultivo mantenido.
- 5 14. Método según la reivindicación 13, que comprende además, antes de la etapa (b), repetir la etapa (a) usando recipientes de cultivo de simiente de tamaño progresivamente creciente.
15. Método según la reivindicación 13, que comprende además: mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de suero y libre de insulina mediante la recogida regular del medio de cultivo y la sustitución por nuevo medio.
- 10 16. Método según la reivindicación 13, en el que el método se selecciona del grupo que consiste en:
- A) procedimiento de microportadores;
- 15 B) un procedimiento en suspensión; y
- C) un procedimiento de cultivo quimiostático.
17. Método según la reivindicación 16, en el que el método es un procedimiento de microportadores, y en el que el método es un procedimiento de portadores macroporosos.
- 20 18. Método según la reivindicación 16, en el que el método es un procedimiento de microportadores, y en el que el método se selecciona del grupo que consiste en:
- A) un procedimiento de microportadores convencional; y
- 25 B) un procedimiento de perfusión de microportadores.
19. Método según la reivindicación 16, en el que el método es un procedimiento en suspensión, y en el que el método se selecciona del grupo que consiste en:
- 30 A) un procedimiento de perfusión; y
- B) un procedimiento discontinuo/semicontinuo.
- 35 20. Método según la reivindicación 19, en el que el método es un procedimiento discontinuo/semicontinuo, y en el que el método se selecciona del grupo que consiste en:
- A) un procedimiento discontinuo sencillo;
- 40 B) un procedimiento alimentado por lotes; y
- C) un procedimiento semicontinuo.
- 45 21. Método según la reivindicación 13, en el que dichas células, antes de dicha etapa de inoculación, son capaces de crecer en cultivo en suspensión.
22. Método según la reivindicación 13, en el que dicho FVII o polipéptido relacionado con FVII deseado es FVII humano o un polipéptido relacionado con FVII humano.
- 50 23. Método según la reivindicación 13, en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 1 mg/l/día de cultivo; preferiblemente en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 2,5 mg/l/día de cultivo.
- 55 24. Método según la reivindicación 23, en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 5 mg/l/día de cultivo.
25. Método según la reivindicación 24, en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de al menos aproximadamente 8 mg/l/día de cultivo.
- 60 26. Método según la reivindicación 24, en el que se produce FVII o un polipéptido relacionado con FVII a un nivel de aproximadamente 3-4 mg/l/día.
- 65 27. Método según la reivindicación 24, en el que las unidades de FVII o polipéptido relacionado con FVII producidas son al menos 5000 U/l/día, preferiblemente en el que las unidades de FVII o polipéptido relacionado con FVII producidas son al menos 7000 U/l/día, más preferiblemente en el que las unidades de actividad de FVII o polipéptido relacionado con FVII producidas son aproximadamente 7000-10.000 U/l/día.

28. Método según la reivindicación 13, que comprende además: mantener el cultivo obtenido en la etapa (c) en medio libre de productos animales y libre de insulina mediante la recogida regular de parte del sobrenadante de cultivo tras la sedimentación de los portadores que contienen células y la sustitución por nuevo medio.
- 5
29. Método según la reivindicación 28, que comprende además: enfriar el cultivo hasta una temperatura predeterminada por debajo del punto de consigna del cultivo antes de la sedimentación de portadores, preferiblemente en el que el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 30°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo antes de la sedimentación de portadores, preferiblemente en el que el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 20°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo, preferiblemente en el que el cultivo se enfría hasta una temperatura de desde 5°C hasta 15°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo, preferiblemente en el que el cultivo se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 10°C por debajo del punto de consigna de temperatura del cultivo.
- 10
- 15
30. Método según la reivindicación 1, la reivindicación 9 o la reivindicación 13, en el que dicho medio es una formulación basada en DMEM/F12 de HAM libre de suero complementada con uno o más de los siguientes aditivos i) glutamina; concentración final de 0,9 g/l, ii) sulfato férrico x7H₂O 0,0006 g/l, iv) putrescina, x 2HCl 0,0036 g/l, vi) vitamina K1 0,0025 g/l, vii) Synperonic; concentración final de 1 g/l, rojo de fenol 0,008 g/l, etanolamina 0,00153 g/l e hidrogenocarbonato de Na 2 g/l).
- 20

Fig 1:

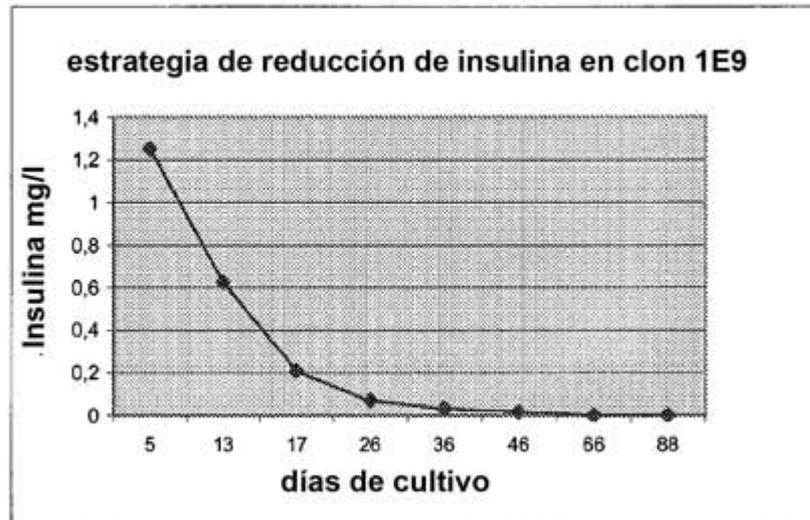


Fig 2:

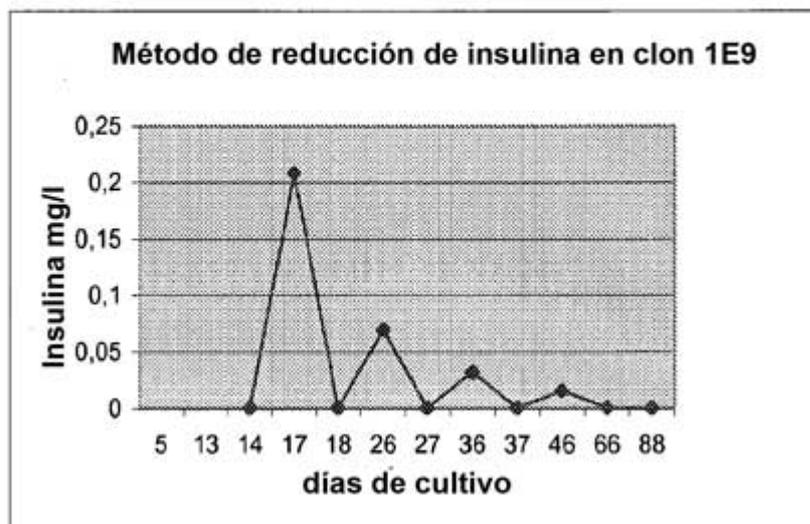


Fig 3:

