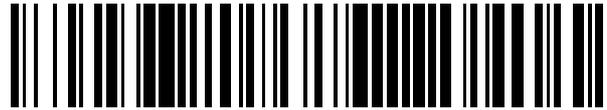


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 077**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2004 E 04762893 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1673452**

54 Título: **Método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas**

30 Prioridad:

10.10.2003 DK 200301495
20.10.2003 US 512672 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

KNUDSEN, IDA MÖLGAARD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 077 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 para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos para producción de polipéptidos interesantes de células eucariotas y a una vasija de reactor útil para estos métodos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Métodos para producción en gran escala de polipéptidos, tales como polipéptidos Factor VII en células eucariotas se conocen en la técnica, véase, v.g., WO 02/29083, WO 02/29084 y WO 03/29442. Aunque muchos de los problemas asociados con la producción en gran escala de polipéptidos, tales como polipéptidos Factor VII, han sido resueltos, quedan todavía por resolver algunos problemas.

15 El mantenimiento del valor de pH del líquido de cultivo dentro de una "ventana" óptima de producción bastante estrecha, v.g. dentro de 0,5 unidades de pH o menos como ocurre actualmente para muchos cultivos de células, es un problema particular. La generación de CO₂ y lactato en el líquido de cultivo causa una disminución de pH, y para la mayoría de los propósitos prácticos, la adición de bases fuerte, v.g. NaOH 1M o Na₂CO₃ 1 M, es necesaria a fin de estabilizar el pH o mantener el pH dentro de un intervalo predeterminado. Sin embargo, la adición de bases fuertes causa problemas con respecto a un aumento de pH espectacular localizado que puede conducir a metabolismo celular anómalo (tasa elevada de consumo de glucosa, tasa elevada de formación de lactato), si no a apoptosis celular, compárese Nienow et al., *Cytotechnology* 22: 87-94, 1996; Langheinrich y Nienow, *Biotechnology and Bioengineering*, 66 (3): 171-179, 1999; Osman et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (1): 63-73, 2001; y Osman et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 79 (4): 398-407, 2002.

20 Así pues, existe necesidad de métodos mejorados para producción en gran escala de polipéptidos a partir de células eucariotas, en particular métodos en los que la necesidad de adición de bases fuertes se reduzca o se elimine.

Mostafa y Gu, *Biotechnol. Prog.*, 2003, 19, 45-51, dan a conocer diversas estrategias para eliminación de CO₂ disuelto de cultivos de alimentación por lotes en gran escala, v.g. utilizando borboteo con aire.

25 Pattison et al., *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16, 768-774, dan a conocer la medida y el control de CO₂ disuelto en procesos de cultivo de células de mamífero utilizando un sensor químico de fibra óptica in situ. El CO₂ disuelto se elimina por borboteo del cultivo con nitrógeno.

Telling & Stone, *Biotech. Bioeng.* Vol. VI, páginas 147-158 (1964) describe un método de control automático del pH de un sistema tampón bicarbonato-CO₂ para el cultivo sumergido de células BHK.

30 Aunque estas referencias mencionan estrategias para controlar el nivel de CO₂ disuelto en vasijas de cultivo de células por medio de borboteo de gas, ninguna de ellas menciona que la necesidad de adición de base puede reducirse o eliminarse totalmente de este modo.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de células de 1-12x10⁶ células/mL, comprendiendo dicho método: monitorizar la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo, y borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo, en donde la velocidad de borboteo del aire se controla en relación con la concentración monitorizada de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo; y en donde el aire se borbotea a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración y en el que no se añade al líquido de cultivo base alguna con un valor de pH superior a 8,5.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de células de 1-12x10⁶ células/mL, comprendiendo dicho método borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración, en el que la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,000-0,070 L/min por L de líquido de cultivo y cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo no dan lugar a un valor localizado de pH superior a 7,5 en dicho líquido de cultivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra una realización de la vasija del reactor de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Métodos

Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo. Una característica de los métodos es que se borbotea aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo para control de CO₂ y pH a fin de reducir o eliminar la necesidad de adición de bases.

Así, en una realización principal, la presente invención proporciona un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de $1-12 \times 10^6$ células/mL, comprendiendo dicho método: monitorizar la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo, y borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo, en el que la velocidad de borboteo del aire se controla en relación con la concentración monitorizada de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo; y en el que el aire se borbotea a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración y en el que no se añade al líquido de cultivo cantidad alguna de base con un valor de pH superior a 8,5.

Por el término "producción en gran escala" se entiende producción que implica una vasija de cultivo de al menos 100 L. En realizaciones preferidas, sin embargo, la escala es típicamente al menos 250 L, tal como al menos 500 L, v.g. al menos 1000 L o incluso 5000 L o más. El término "gran escala" puede utilizarse intercambiamente con los términos "escala industrial" y "escala de producción".

El método para producción en gran escala del polipéptido se realiza típicamente a lo largo de un periodo de al menos 120 horas, v.g. 1-26 semanas.

La presente invención no se limita actualmente a la producción de polipéptido particular alguno o al uso de cualquier célula eucariota particular. Sin embargo, ejemplos ilustrativos de los polipéptidos relevantes y células eucariotas útiles se proporcionan más adelante en esta memoria. No obstante, en algunas de las realizaciones de la invención actualmente más interesantes y preferidas, el polipéptido es un polipéptido Factor VII.

El término "líquido de cultivo" debe entenderse que significa un líquido que comprende un cultivo de las células eucariotas en un medio adecuado. En una realización importante, las células están inmovilizadas por fijación a la superficie de microportadores compactos o por fijación a o atrapamiento físico en el interior de la estructura interna de microportadores macroporosos. Esta realización se explicará con más detalles más adelante en esta memoria.

El método de la invención implica monitorizar la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo y borbotear aire, constante o intermitentemente, a través del líquido de cultivo. La velocidad de borboteo del aire está controlada en relación con la concentración monitorizada de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo.

La monitorización de gases, con inclusión de CO₂, en líquidos se conoce en la técnica, y están disponibles comercialmente varios sensores (véase "Culture Vessel"). Tales sensores de CO₂ proporcionan típicamente una señal eléctrica que transporta datos correspondientes al valor de concentración real. Algunos sensores proporcionan además una lectura del valor real correspondiente a la concentración de CO₂ disuelto. La lectura o señal eléctrica puede utilizarse para controlar la velocidad de borboteo de aire en el líquido de cultivo. Aunque dicho control puede efectuarse manualmente, la realización preferida incluye el empleo de control automático. El control automático se realiza típicamente por un medio de control e implica típicamente un algoritmo predeterminado. Una vasija de cultivo útil para el método anterior se describe adicionalmente más adelante (véase "Culture Vessels").

La velocidad de borboteo se controla en relación con la concentración monitorizada de CO₂ de tal manera que un aumento significativo en la concentración real (monitorizada) de CO₂ disuelto (con relación a un punto de regulación predefinido) sea contrarrestado por un aumento en la velocidad de borboteo del aire, y de tal manera que una disminución significativa en la concentración real (monitorizada) de CO₂ disuelto (con relación a un punto de regulación predefinido) sea contrarrestado por una disminución en la velocidad de borboteo del aire. De este modo, el método hace posible preferiblemente mantener la concentración de CO₂ disuelto dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración.

El punto de regulación se define típicamente por el operador antes de monitorizar la concentración de CO₂ disuelto y es la concentración a la cual el operador considera que la producción del polipéptido en las células eucariotas es óptima. En ciertos casos, el punto de regulación puede ajustarse ligeramente en el curso de la fase de producción a fin de tener en cuenta cualesquiera alteraciones en el líquido de cultivo.

Ejemplos de algoritmos para controlar la velocidad de borboteo en relación con la concentración de CO₂ disuelto incluyen el control "todo-nada", control proporcional (P), control proporcional-derivado (PD), control proporcional-integral (PI) y control proporcional-integral-derivado (PID), de los cuales se prefieren a menudo el control PI y PID. Para más detalles véase, v.g., Michael Barr, "Closed-Loop Control", Embedded Systems Programming, agosto 2002, pp. 55-56. y www.neutrino.com/Publications/Glossary/PID.html.

El intervalo de la concentración de CO₂ disuelto para el cual es factible la producción del polipéptido, y el punto de regulación para el cual se considera óptima la producción, dependen en cierto grado del polipéptido en cuestión, la

célula eucariota seleccionada, y el medio; por tanto, la persona experta podrá determinar este intervalo y esta valor por experimentación estándar.

5 Sin embargo, en muchas realizaciones importantes, el intervalo predeterminado para la concentración de CO₂ disuelto es típicamente 80-200 mmHg, en particular 100-180 mmHg. La concentración del punto de regulación de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo es típicamente un valor comprendido dentro del intervalo de 100-180 mmHg, tal como 120-160 mmHg, v.g., un valor de alrededor de 140 mmHg.

El término "velocidad de borboteo de aire" se expresa en L/min por L de líquido de cultivo (volumen por volumen por minuto (vvm)), y se define como la velocidad a la cual se alimenta aire, normalizado a una temperatura de 25 °C y una presión de 1 atm (101,3 kPa), al líquido de cultivo.

10 El término "constante o intermitentemente" debe entenderse que significa que el borboteo de aire puede conducirse de cualquier manera, v.g., por un flujo sustancialmente ininterrumpido (es decir constante) de aire o un flujo de aire intermitente, etc. La velocidad de borboteo para un flujo intermitente de aire se calcula como la velocidad de flujo media (L/min) a lo largo de un periodo de 3 minutos, es decir el flujo en litros durante los 3 minutos precedentes dividido por 3. Preferiblemente, el borboteo de aire se realiza de modo sustancialmente ininterrumpido. Esto es
15 ventajoso, dado que el borboteo de aire facilita también la mezclado dentro de la vasija de cultivo.

El término "aire" se entiende que abarca gases que comprenden 60-90%, tal como 65-85% (v.g. 75-82%), de nitrógeno, 10-40%, tal como 15-35% (v.g. 18-24%), de oxígeno, y menos de 0,5% (v.g. menos de 0,2%) de CO₂. El "aire" puede obtenerse por mezclado de aire atmosférico con nitrógeno u oxígeno en una ratio adecuada. Un ejemplo preferido de esto es el aire atmosférico, que comprende aproximadamente 78% nitrógeno,
20 aproximadamente 21% oxígeno, y menos de 0,1% CO₂. El uso de aire proporciona la ventaja de suministrar oxígeno al líquido de cultivo eliminando al mismo tiempo CO₂ del líquido de cultivo.

En vista de los resultados obtenidos hasta ahora, la velocidad de borboteo de aire está comprendida preferiblemente dentro del intervalo de 0,000-0,100, tal como 0,000-0,070 L/min por L de líquido de cultivo. En particular, la velocidad de borboteo de aire está comprendida típicamente dentro del intervalo de 0,005-0,020 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación.
25

En realizaciones preferidas, la velocidad de borboteo de aire es: dentro del intervalo de 0,000-0,005, tal como alrededor de 0,0 L/min por L de litro de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación - 5 mmHg; y dentro del intervalo de 0,010-0,100, tal como 0,030-0,070, v.g. alrededor de 0,040-0,060, L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación + 5 mmHg.
30

La presente invención proporciona una manera útil de controlar la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo y controlar también por tanto indirectamente el pH en el líquido de cultivo. La presente invención proporciona por tanto una medida para reducir o eliminar la necesidad de adición de bases.

35 Así, en la presente invención, cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo no dan lugar a un valor localizado de pH superior a 7,5 en dicho líquido de cultivo. Preferiblemente, no se añade al líquido de cultivo base alguna con un valor de pH superior a 8,5.

El término "valor localizado de pH" se refiere al fenómeno que ocurre cuando la adición de, v.g., incluso una cantidad pequeña de una base fuerte (v.g. pH 10) a un líquido de cultivo (v.g. pH aproximadamente 7,0) hace que el valor de pH aumente localmente a, v.g., 9,0 antes de mezclar completamente la base fuerte con el medio de cultivo.
40 En algunos casos, la mezclado puede causar adicionalmente un aumento local de temperatura si el proceso de mezclado es exotérmico. El término "cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo" se refiere a e incluye todos los agentes, medios, soluciones, suspensiones, etc. añadidos al líquido de cultivo durante la producción del polipéptido.

En una variante particular de la invención, se contempla que la monitorización real en línea de la concentración de CO₂ disuelto puede no ser estrictamente obligada. Así, la presente invención proporciona también un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de células de 1-12x10⁹ células/mL, comprendiendo dicho método borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración, en donde la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,000-0,070 L/min por L de líquido de cultivo y cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo no dan lugar a un valor localizado de pH superior a 7,5 en dicho líquido de cultivo. La concentración de CO₂ disuelto puede monitorizarse fuera de línea por análisis de muestras del líquido de cultivo con un equipo convencional de análisis de gases, v.g. un analizador comercial de gases en sangre.
50

55 En la presente invención, la velocidad de borboteo del aire está comprendida típicamente dentro del intervalo de 0,001-0,070, tal como 0,005-0,020 L/min por L de líquido de cultivo. Adicionalmente, la concentración de CO₂

disuelto en el líquido de cultivo se monitoriza preferiblemente a fin de asegurar que la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo se mantiene dentro del intervalo predeterminado. Alternativamente, se monitoriza el pH.

5 En esta realización, la velocidad de borbotado de aire se controla preferiblemente en relación con la concentración monitorizada de CO₂. Alternativamente, la velocidad de borbotado de aire puede controlarse en relación con el pH monitorizado. En particular, la velocidad de borbotado puede controlarse en relación con el pH monitorizado y la concentración monitorizada de lactato.

En particular, la velocidad de borbotado de aire está dentro del intervalo de 0,005-0,020 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación. Adicionalmente, la velocidad de borbotado de aire está típicamente:

10 dentro del intervalo de 0,000-0,005, tal como alrededor de 0,0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación - 5 mmHg; y
dentro del intervalo de 0,010-0,100, tal como 0,030-0,070, v.g. alrededor de 0,040-0,060, L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación + 5 mmHg.

15 *Vasija de Cultivo*

Se describe también en esta memoria una vasija de cultivo particularmente útil para los métodos de la invención.

20 La vasija de cultivo (1) comprende un líquido de cultivo (2), estando adaptada dicha vasija para producción en escala industrial de un polipéptido en una célula eucariota comprendida en el líquido de cultivo (2), comprendiendo adicionalmente dicha vasija primeros medios sensores (3) para monitorización de la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo (2), medios de borbotado de gas (4) para borbotado de un gas (tal como aire) a través del líquido de cultivo (2), y medios de control (5), estando dichos medios de control (5) en comunicación con dichos primeros medios sensores (3), y estando dichos medios de control (5) en comunicación con dichos medios de borbotado de gas (4), en donde los medios de control (5) controlan la velocidad de borbotado del gas por la vía de los medios de borbotado de gas (4) en respuesta al valor de CO₂ disuelto monitorizado por los primeros medios sensores (3).

Una realización de la vasija de cultivo de la invención se ilustra en la Figura 1.

Los primeros medios sensores (3) están adaptados particularmente para monitorizar constante o intermitentemente la concentración de CO₂ disuelto en el medio de cultivo (2). Tales medios sensores están disponibles comercialmente de diversos suministradores comerciales, v.g. el sensor de fibra óptica dCO₂ YSI 8500, de YSI, Inc.

30 Los medios de borbotado de gas (4) pueden, v.g., seleccionarse de válvulas controlables, bombas controlables, etc. y combinaciones de válvulas y bombas. Tales válvulas y/o bombas proporcionan aire, v.g. aire comprimido, al líquido de cultivo a una velocidad controlada por los medios de control (5) basándose en el valor de concentración para CO₂ disuelto en el líquido de cultivo. Tales medios de borbotado de gas están disponibles comercialmente de diversos suministradores comerciales, v.g. Bürkert, HI-TEC, Samson, Emerson.

35 En una realización, la velocidad de borbotado del gas puede controlarse a fin de mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración. En particular, el medio de borbotado de gas está adaptado para proporcionar velocidades de borbotado de 0,000-0,100, tales como 0,000-0,050, L/min por L de líquido de cultivo.

40 El medio de control (5) es típicamente un dispositivo que contiene un microprocesador que es capaz de recibir señales o datos del primer medio sensor (3) y proporcionar señales o datos al medio de borbotado de gas (4). Medios de control están disponibles comercialmente de diversos suministradores comerciales, v.g. Philips, Yokogawa, Honeywell.

Algoritmos adecuados para implementación en los medios de control se han descrito adicionalmente con anterioridad.

45 El término "en comunicación con" significa que señales y datos digitales y/o analógicos pueden intercambiarse entre los respectivos "medios" o de un "medio a otro". La comunicación puede establecerse directamente por conductores eléctricos o, en caso aplicable, por transmisores y transductores de radiación electromagnética, radiación infrarroja, etc.

50 El medio de control (5) comprende típicamente medios de pre-regulación tales que un operador de la vasija de cultivo puede introducir los puntos extremos para el intervalo predeterminado y el punto de regulación predeterminado para la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo. Los puntos extremos para el intervalo y el punto de regulación pueden modificarse opcionalmente en el curso de la operación de la vasija de cultivo, si es necesario o deseable.

Modificaciones del primer medio sensor (3), el medio de borboteo de gas (4), el medio de control (5) y la manera de poner en comunicación unos con otros dichos medios serán evidentes para la persona experta en la técnica.

- Las vasijas de cultivo aplicables en la presente invención pueden estar basadas v.g., en reactores convencionales de tanque agitado (CSTR) en los que la agitación se obtiene por medio de tipos de rotor convencionales o reactores "airlift" en los que la agitación se obtiene por introducción de aire desde el fondo de la vasija. Entre los parámetros adicionales que se controlan típicamente dentro de límites especificados se encuentran el pH, la tensión de oxígeno disuelto (DOT), y la temperatura. La tensión de oxígeno disuelto puede mantenerse por, v.g., borboteo de oxígeno puro. El medio de control de temperatura es típicamente agua, calentado o enfriada en caso necesario. El agua puede hacerse pasar por una camisa que rodea la vasija o por un serpentín de tubos sumergido en el cultivo.
- 10 El término "vasija de cultivo" puede utilizarse intercambiamente con "tanque", "reactor", "fermentador" y "biorreactor".

Polipéptidos para Producción en Gran Escala

- La presente invención se refiere a métodos pertinentes para el cultivo mejorado en gran escala de células eucariotas que expresan una o más proteínas de interés, sea de genes endógenos o subsiguientemente a la introducción en tales células de genes recombinantes que codifican la proteína. Tales proteínas incluyen, sin limitación, polipéptidos Factor VII; Factor VIII; Factor IX; Factor X, Proteína C; Factor tisular; renina; hormona del crecimiento, con inclusión de la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovino; factor liberador de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina, hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador del plasminógeno de orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalina; proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora mulleriana, cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento de los nervios tal como factor de crecimiento NGF- β derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como α -FGF y β -FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, factor de crecimiento I y II semejante a insulina (IGF-I e IGF-II); proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs), v.g. M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (ILs), v.g., IL-1 a IL-10; superóxido-dismutasa; receptores de células T; proteínas de la membrana superficial; factor acelerador de la degradación; antígenos virales tales como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de retorno; adhesina; proteínas reguladoras; anticuerpos; y variantes y fragmentos de secuencia de cualquiera de los polipéptidos anteriores.

En realizaciones preferidas de la invención, el polipéptido es un polipéptido Factor VII.

- 40 En algunas realizaciones de esta memoria, las células utilizadas en la práctica de la invención son células humanas que expresan un gen del Factor VII endógeno. En estas células, el gen endógeno puede estar intacto o puede haber sido modificado in situ, o una secuencia exterior del gen del Factor VII puede haber sido modificada in situ para alterar la expresión del gen del Factor VII endógeno.

En otras realizaciones de esta memoria, células procedentes de cualquier fuente eucariota se modifican por ingeniería genética para expresar Factor VII humano a partir de un gen recombinante.

- 45 El "polipéptido Factor VII" abarca Factor VII de tipo salvaje (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la Patente U.S. N.º 4.784.950), así como variantes Factor VII que exhiben sustancialmente la misma o mejor actividad biológica con relación al Factor VII de tipo salvaje, y variantes Factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente modificada o reducida con relación al Factor VII de tipo salvaje. El término "Factor VII" debe entenderse que abarca polipéptidos Factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como aquéllos que han sido procesados proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse Factor VIIa. Típicamente, el Factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para producir el Factor VIIa. El término "polipéptido Factor VII" abarca también polipéptidos, con inclusión de variantes, en los cuales la actividad biológica del Factor VIIa ha sido sustancialmente modificada o algo reducida con relación a la actividad del Factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, Factor VII o Factor VIIa en los cuales se han introducido alteraciones específicas en la secuencia de aminoácidos que modifican o perturban la bioactividad del polipéptido.

La actividad biológica del Factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad para (i) fijarse al Factor Tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica de Factor IX o Factor X para producir Factor IX o X activado (Factor IXa o Xa, respectivamente).

5 La actividad biológica de los polipéptidos Factor VII ("actividad biológica del Factor VII") puede cuantificarse por medida de la capacidad de una preparación para promover la coagulación de la sangre utilizando plasma deficiente en Factor VII y tromboplastina, como se describe, v.g., en la Patente U.S. N.º 5.997.864 o WO 92/15686. De este modo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación con relación a una muestra de control y se convierte en "unidades Factor VII" por comparación con un estándar de suero humano agrupado que contiene 1 unidad/mL de actividad del Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del Factor VIIa puede
10 cuantificarse por (i) medida de la capacidad Factor VIIa (o el polipéptido Factor VII) para producir Factor X activado (Factor Xa) en un sistema que comprende TF embebido en una membrana lipídica y Factor X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) medida de la hidrólisis de Factor X en un sistema acuoso ("In Vitro Proteolysis Assay", **Ensayo 2** - véase más adelante); (iii) medida de la fijación física Factor VIIa (o el polipéptido Factor VII) a TF utilizando un instrumento basado en resonancia de plasmones de superficie (Persson, FEBS Letts, 15 413:359-363, 1997); (iv) medida de la hidrólisis de un sustrato sintético por Factor VIIa (o un polipéptido Factor VII) ("In Vitro Hydrolysis Assay", **Ensayo 1** - véase más adelante); o (v) medida de la generación de trombina en un sistema in vitro independiente de TF.

Las variantes Factor VII que tienen sustancialmente la misma o mayor actividad biológica con relación al Factor VIIa de tipo salvaje abarcan aquéllas que exhiben al menos aproximadamente 25%, con preferencia al menos
20 aproximadamente 50%, con más preferencia al menos aproximadamente 75% y de modo muy preferible al menos aproximadamente 90% de la actividad específica Factor VIIa que se ha producido en el mismo tipo de célula, cuando se testa en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de fijación de TF arriba descritos. Variantes Factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente reducida con relación al Factor VIIa de tipo salvaje son aquéllas que exhiben menos de aproximadamente 25%, con preferencia menos de
25 aproximadamente 10%, de modo más preferible menos de aproximadamente 5% y de modo muy preferible menos de aproximadamente 1% de la actividad específica Factor VIIa de tipo salvaje que se ha producido en el mismo tipo de célula cuando se testa en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de fijación de TF arriba descrito. Variantes Factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada con relación al Factor VII de tipo salvaje incluyen, sin limitación, variantes Factor VII que exhiben actividad proteolítica de Factor X independiente de TF y aquéllas que fijan TF pero no escinden el Factor X.
30

Variantes Factor VII, tanto si exhiben sustancialmente la misma bioactividad o mayor que el Factor VII de tipo salvaje o, alternativamente, si exhiben bioactividad sustancialmente modificada o reducida con relación al Factor VII de tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia Factor VII de tipo salvaje por inserción, delección, o sustitución de uno o más aminoácidos.

35 Ejemplos no limitantes de variantes Factor VII que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que el Factor VII de tipo salvaje incluyen S52a-FVIIa, S60a-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352:182-192, 1998); variantes Factor VIIa que exhiben estabilidad proteolítica aumentada como se describe en la Patente U.S. No. 5.580.560; Factor VIIa que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes Factor VII como se describe en PCT/DK02/00189; y variantes Factor VII que exhiben estabilidad proteolítica aumentada como se describe en WO 02/38162 (Scripps Research Institute);
40 variantes Factor VII que tienen un dominio Gla modificado y que exhiben una fijación de membrana mejorada como se describe en WO 99/20767 (Universidad de Minnesota); y variantes Factor VII como se describen en WO 01/58935 (Maxygen ApS).

45 Ejemplos no limitantes de variantes Factor VII que tienen actividad biológica aumentada comparados con el Factor VIIa de tipo salvaje incluyen variantes Factor VII como se describen en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes Factor VIIa con actividad mejorada como se describen en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Ejemplos no limitantes de variantes Factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente reducida o modificada con relación al Factor VII de tipo salvaje incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose et al., Biochem 29:3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., J. Biol. Chem. 270:66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15:515-520, 1998), y Factor VIIa que carece del dominio Gla, (Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317:245-249, 1993).

Ejemplos explícitos de polipéptidos Factor VII incluyen, sin limitación, Factor VII de tipo salvaje, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-
60

FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y Factor VII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 233Thr a 240Asn, Factor VII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 304Arg a 329Cys.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido Factor VII es Factor VIIa humano (hFVIIa), con preferencia Factor VIIa que se ha hecho humano recombinantemente (rhFVIIa).

En otras realizaciones, el polipéptido Factor VII es una variante de secuencia Factor VII.

10 En algunas realizaciones, v.g. aquéllas en las que el polipéptido Factor VII es una variante de la secuencia Factor VII, la ratio entre la actividad del polipéptido Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa tipo salvaje) es al menos aproximadamente 1,25, con preferencia al menos aproximadamente 2,0, o al menos aproximadamente 4,0, cuando se testa conforme al "In Vitro Proteolysis Assay" (Ensayo 2) como se describe en la presente memoria descriptiva.

15 En algunas realizaciones, v.g. aquéllas en las cuales el polipéptido Factor VII es una variante de la secuencia Factor VII, la ratio entre la actividad de dicho polipéptido Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa tipo salvaje) es al menos aproximadamente 1,25, con preferencia al menos aproximadamente 2,0, o al menos aproximadamente 4,0, cuando se testa conforme al "In Vitro Hydrolysis Assay" (Ensayo 1) como se describe en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, el polipéptido Factor VII tiene una glicosilación diferente Factor VII humano de tipo salvaje.

Células

20 En la práctica de la presente invención, las células son células eucariotas, más preferiblemente un linaje de células eucariotas establecido, que incluye, sin limitación, linajes de células CHO (v.g., ATCC CCL 61), COS-1 (v.g., ATCC CRL 1650), de riñón de cría de hámster (BHK), y HEK293 (v.g., ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Un linaje de células BHK preferido es el linaje de células BHK tk⁻ ts13 (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982), al que se hace referencia en lo sucesivo como células BHK 570. El linaje de células BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo el número de acceso ATCC CRL 10314. Un linaje de células BHK tk⁻ ts13 está disponible también de la ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Un linaje de células CHO preferido es el linaje de células CHO K1, disponible de ATCC bajo el número de acceso CCL61.

30 Otros linajes de células adecuados 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 (linaje de células CHO) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) (células DUKX a las que se hace referencia también como células DXB11), y DG44 (linaje de células CHO) (Cell, 33: 405, 1983, y Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986). Son útiles también células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En algunas realizaciones, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tales como, v.g., células que expresan un espectro cualitativa o cuantitativamente distinto de enzimas que catalizan la modificación de proteínas posterior a la traducción (v.g., enzimas de glicosilación tales como glicosil-transferasas y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como propéptidos) que el tipo de célula del que se han derivado las mismas. Linajes adecuados de células de insecto incluyen también, sin limitación, linajes de células de Lepidópteros, tales como células de Spodoptera frugiperda o células de Trichoplusia ni (véase, v.g., US 5.077.214).

40 En algunas realizaciones, las células utilizadas en la práctica de la invención son capaces de crecer en cultivos de suspensión. Como se utiliza en esta memoria, células competentes en suspensión son aquéllas que pueden crecer en suspensión sin producir agregados compactos grandes, es decir, células que están monodispersas o crecen en agregados sueltos con sólo unas pocas células por agregado. Células competentes en suspensión incluyen, sin limitación, células que crecen en suspensión sin adaptación o manipulación (tales como, v.g., células hematopoyéticas o células linfoides) y células que se han hecho competentes en suspensión por adaptación gradual de células dependientes de fijación (tales como, v.g., células epiteliales o fibroblastos) al crecimiento en suspensión.

50 Las células utilizadas en la práctica de la invención pueden ser células de adhesión (conocidas también como células dependientes de anclaje o dependientes de fijación). Como se utiliza en esta memoria, las células de adhesión son aquéllas que precisan adherirse o anclarse a una superficie adecuada para propagación y crecimiento. En una realización de la invención, las células utilizadas son células de adhesión. En estas realizaciones, tanto las fases de propagación como la fase de producción incluyen el uso de microportadores. Las células de adhesión utilizadas deberían ser capaces de migrar sobre los portadores (y a la estructura interior de los portadores si se utiliza un portador macroporoso) durante la o las fases de propagación y migrar a nuevos portadores cuando se transfieren al biorreactor de producción. Si las células de adhesión no son suficientemente capaces de migrar a nuevos portadores por sí mismas, las mismas pueden librarse de los portadores por contacto de los microportadores que contienen las células con enzimas proteolíticas o EDTA. El medio utilizado (particularmente cuando está exento de componentes derivados de animales) debería contener además componentes adecuados para soportar las

células de adhesión; medios adecuados para cultivo de células de adhesión están disponibles de suministradores comerciales, tales como, v.g., Sigma.

- 5 Las células pueden ser también células adaptadas a suspensión o competentes en suspensión. Si se utilizan tales células, la propagación de las células puede hacerse en suspensión, por lo que los microportadores se utilizan sólo en la fase de propagación final en la vasija de cultivo de producción propiamente dicha y en la fase de producción. En el caso de células adaptadas en suspensión, los microportadores utilizados son típicamente portadores macroporosos en los cuales las células están fijadas por atrapamiento físico en el interior de la estructura interna de los portadores.

Procedimientos de Cultivo de Células

- 10 Los métodos de la invención se realizan típicamente en una vasija de cultivo agitada, empleándose preferiblemente un tipo de proceso basado en microportadores. En el proceso basado en microportadores, las células han migrado a la estructura interna de los portadores (portadores macroporosos) o se han fijado ellas mismas a la superficie de los portadores (portadores compactos), o ambas cosas. En un proceso basado en microportadores, las células eucariotas, los microportadores y el medio de cultivo se suministran inicialmente a una vasija de cultivo. En los días siguientes, puede alimentarse medio de cultivo adicional si el volumen de cultivo no había llegado al volumen de trabajo final de la vasija desde el principio. Durante el periodo siguiente, se realiza periódicamente la recolección de sobrenadante de cultivo que contiene el producto y el reemplazamiento con medio nuevo, hasta que finalmente se termina el cultivo. Cuando se cosecha el sobrenadante que contiene el producto, la agitación, v.g., el removido del cultivo se detiene y los portadores que contienen las células se dejan sedimentar, después de lo cual se retira parte del medio de cultivo que contiene el producto.

- 20 Para mejorar el resultado global del procedimiento, puede aplicarse preferiblemente un paso de enfriamiento antes de recoger el sobrenadante que contiene el producto, véase, v.g., WO 03/029442. En algunas realizaciones, el líquido de cultivo se enfría a una temperatura comprendida entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 32 °C antes de dejar que se sedimenten los portadores, o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, o entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 28 °C.

Otras variantes aplicables del procedimiento de cultivo de células se describen en WO 02/29084.

Pasos de Propagación

- 30 Antes de alcanzar la fase de producción en la que se realiza la recogida regular del sobrenadante de cultivo que contiene el producto para procesamiento ulterior aguas abajo, las células se propagan según cualquier esquema de rutina que pueda ser adecuado para la célula particular en cuestión. La fase de propagación puede ser un procedimiento de un solo paso o un procedimiento de pasos múltiples. En un procedimiento de propagación de un solo paso, las células se retiran del almacenamiento y se inoculan directamente en la vasija de cultivo que contiene los microportadores en los que va a tener lugar la producción. En un procedimiento de propagación de pasos múltiples, las células se retiran del almacenamiento y se propagan en varias vasijas de cultivo de tamaño gradualmente creciente hasta que alcanzan la vasija de cultivo final que contiene microportadores en los que va a tener lugar la producción. Durante los pasos de propagación, las células se dejan crecer en condiciones que están optimizadas para crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto y análogas, son las que se conocen como óptimas para la célula particular y serán evidentes para la persona experta o profesional en este campo (véase, v.g., *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2.^a edición, Rickwood, D. y Hames, B.D., editores., Oxford University Press, Nueva York (1992)).

En un enfoque, el proceso de cultivo de células se realiza en una sola vasija de cultivo: Las células se inoculan directamente en la vasija de cultivo que contiene microportadores en los que va a tener lugar la producción; las células se propagan hasta que se alcanza una densidad de células adecuada y se inicia la fase de producción.

- 45 En otro enfoque, el proceso de cultivo de células se lleva a cabo en al menos dos vasijas de cultivo distintas: Una o más vasijas de cultivo de células (primer o primeros pasos de propagación) seguidas por la vasija de cultivo de producción (último paso de propagación seguido por la fase de producción). En el primer paso de propagación, las células que expresan el polipéptido deseado se inoculan en una vasija de cultivo de siembra que contiene medio de cultivo y se propagan hasta que las células alcanzan una densidad mínima de siembra cruzada. Subsiguientemente, el cultivo de siembra propagado se transfiere a la vasija de cultivo de producción que contiene (a) medio de cultivo y (b) microportadores. En esta vasija de cultivo se cultivan las células en condiciones en las que las células migran a la superficie de los portadores compactos o las superficies exteriores e interiores de los portadores macroporosos, y aquéllas continúan creciendo en este último paso de propagación hasta que los portadores están totalmente colonizados por las células. Durante este último paso de propagación se realiza el cambio de medio dejando que los microportadores se sedimenten en el fondo de la vasija de cultivo, después de lo cual se retira un porcentaje predeterminado del volumen del tanque y se añade a la vasija un volumen porcentual de tanque correspondiente de medio nuevo. Los microportadores se resuspenden luego en el medio y este proceso de retirada y reemplazamiento del medio se repite a intervalos predeterminados, por ejemplo cada 24 horas. La cantidad de medio reemplazado

depende de la densidad de células y puede ser típicamente de 10% a 95%, preferiblemente de 25% a 80%, del volumen del tanque como se muestra en la Tabla 1 siguiente.

- 5 Se comprenderá que en un proceso en el que la fase de propagación es un procedimiento de pasos múltiples, la propagación puede tener lugar en vasijas de cultivo de tamaño progresivamente creciente hasta que se obtiene un número de células suficiente para entrar en la vasija de cultivo final. Por ejemplo, puede(n) utilizarse secuencialmente una o más vasijas de cultivo de siembra de 5 L, 50 L, 100 L o 500 L. Una vasija de cultivo de siembra tiene una capacidad comprendida entre 5 L y 1000 L. Típicamente, las células se inoculan en una vasija de cultivo de siembra a una densidad inicial de aproximadamente $0,2$ a $0,4 \times 10^6$ células/mL y se propagan hasta que el cultivo alcanza una densidad de células de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL. Típicamente, una densidad mínima de siembra cruzada está comprendida entre aproximadamente $0,8$ y aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/mL.

- 10 Algunos de los productos de regulación que son adecuados para la producción de un polipéptido deseado, v.g. Factor VII, no son necesariamente adecuados para el crecimiento inicial de las células, sea en cultivo de siembra o sobre los microportadores. Por ejemplo, la temperatura, la tensión de oxígeno disuelto, y/o el pH pueden ser diferentes para las dos fases. Los intercambios de medio durante la propagación se realizan para mantener las células vivas y en crecimiento, no para cosechar el sobrenadante de cultivo para procesamiento aguas abajo.

- 15 Condiciones de cultivo posibles para el último paso de propagación en la vasija de cultivo final (que contiene los microportadores) se reseñan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Punto de regulación	Intervalo	Intervalo preferido	Valor más preferido
CO ₂ disuelto	80-200 mmHg	100-180 mmHg	120-160 mmHg
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 diario de medio:			
- % de medio cambiado a	10-35% de medio cambiado a $0,4-1,0 \times 10^6$ células/mL	25 % de medio cambiado a $0,4-1,0 \times 10^6$ células/mL	25% de medio cambiado a $0,5 \times 10^6$ células/mL
- % de medio cambiado a	30-70% de medio cambiado a $0,7-3,0 \times 10^6$ células/mL	50% de medio cambiado a $0,7-3,0 \times 10^6$ células/mL	50% de medio cambiado a $1,0 \times 10^6$ células/mL
- % de medio cambiado a	60-90% de medio cambiado a $1,0-12,0 \times 10^6$ células/mL	80% de medio cambiado a $1,0-12,0 \times 10^6$ células/mL	80% de medio cambiado a $2,0-10 \times 10^6$ células/mL

20 *Fase de Producción*

Los métodos de la presente invención son interesantes fundamentalmente para la fase de producción, aunque los mismos pueden utilizarse para la fase de propagación en caso deseable (véase Tabla 1).

Además de las características y medidas definidas por los métodos de la presente invención, precisan ser tomadas varias otras medidas para la producción a fin de lograr un resultado satisfactorio como se describirá en lo que sigue.

- 25 Cuando la densidad de células alcanza el valor adecuado para comienzo de la fase de producción, es decir para tener un sobrenadante de cultivo que contiene producto procesado agua abajo, se recoge 60-95% del sobrenadante de cultivo cada 24 horas, preferiblemente 80%. Este valor de densidad de células es típicamente $1-12 \times 10^6$ células/mL. Los productos de regulación pueden modificarse en este momento y ajustarse a valores adecuados para producción del polipéptido deseado.

- El intercambio de medio se realiza dejando que los microportadores se sedimenten en el fondo del tanque, después de lo cual se retira el porcentaje seleccionado del volumen del tanque y se añade a la vasija un volumen porcentual de tanque correspondiente de medio nuevo. Típicamente se reemplaza entre 25 y 90% del volumen de tanque; preferiblemente, se reemplaza con medio nuevo 80% del volumen del tanque. Los microportadores se resuspenden luego en el medio y este proceso de retirada y reemplazamiento del medio se repite típicamente cada 10 a 48 horas, preferiblemente cada 24 horas.

Un resumen de este aspecto del proceso se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

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

- 10 Opcionalmente, puede emplearse una caída en el punto de regulación de temperatura del cultivo cuando se entra en la fase de producción, y durante la misma.

Quando se inicia la fase de producción, la temperatura, el pH de operación y la frecuencia de intercambio de medio se cambian típicamente a valores que son óptimos para la producción. Ejemplos de intervalos y valores de temperatura en las fases de crecimiento y producción, respectivamente, pueden verse en las Tablas 1 y 2. Se prefiere una temperatura de aproximadamente 36 °C para un linaje de células CHO durante la fase de producción.

Microportadores

- Como se utiliza en esta memoria, los microportadores son partículas que son suficientemente pequeñas para permitir que las mismas se utilicen en cultivos de suspensión (con una velocidad de agitación que no causa un deterioro significativo a las células por cizalladura). Los microportadores son compactos, porosos, o tienen un núcleo compacto con un recubrimiento poroso en la superficie. Por ejemplo, los microportadores pueden estar basados, sin limitación, en celulosa o dextrano, y sus superficies (superficie exterior e interior en el caso de portadores porosos) pueden estar cargadas positivamente. Detalles adicionales pueden encontrarse en WO 02/29083.

- 25 En una serie de realizaciones, los microportadores tienen un diámetro de partícula global comprendido entre aproximadamente 150 y 350 µm; y tienen una densidad de carga positiva comprendida entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En una serie de realizaciones, el microportador es un microportador compacto. Microportadores compactos útiles incluyen, sin limitación, Cytodex 1TM y Cytodex 2TM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ). Los portadores compactos son particularmente adecuados para células de adhesión (células dependientes de anclaje).

- 30 En otra serie de realizaciones, el microportador es un portador macroporoso. Como se utiliza en esta memoria, los portadores macroporosos son partículas, v.g. basadas en celulosa, que tienen las propiedades siguientes: (a) son suficientemente pequeñas para permitir su utilización en cultivos de suspensión (con una velocidad de agitación que no causa deterioro significativo por cizalladura a las células); y (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente para permitir que las células migren a los espacios interiores de la partícula. En una realización sus superficies (exterior e interior) pueden estar cargadas positivamente. En una serie de realizaciones, los portadores:
- 35 (a) tienen un diámetro global de partícula entre aproximadamente 150 y 350 µm; (b) tienen poros que poseen un diámetro medio de abertura de poro comprendido entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 µm; y (c) tienen una densidad de carga positiva comprendida entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas realizaciones, la carga positiva está proporcionada por grupos DEAE (N,N-dietilaminoetilo). Portadores macroporosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1TM y Cytopore 2TM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ). Son particularmente
- 40 preferidos los portadores Cytopore 1TM, que tienen un diámetro medio de partícula de 230 µm, un diámetro medio de poro de 30 µm, y una densidad de carga positiva de 1,1 meq/g.

Condiciones de Cultivo en Gran Escala

Como se utiliza en esta memoria, una vasija de cultivo en gran escala tiene una capacidad de al menos aproximadamente 100 L, con preferencia al menos aproximadamente 500 L, de modo más preferible al menos aproximadamente 1000 L, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 5000 L. En el caso de que el proceso de cultivo de células se realice en al menos dos vasijas de cultivo distintas, tales como una o más vasija(s) de cultivo de siembra (primer(os) paso(s) de propagación) seguidas por la vasija de cultivo de producción (último paso de propagación seguido por la fase de producción), entonces el proceso implica por lo general transferir aproximadamente 50 L del cultivo de siembra propagado (que tiene aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL) a una vasija de cultivo de 500 L que contiene 150 L de medio de cultivo. El cultivo en gran escala se mantiene en condiciones apropiadas de v.g. temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT), y velocidad de agitación, y el volumen se aumenta gradualmente por adición de medio a la vasija de cultivo. En el caso de un proceso con microportadores, la vasija de cultivo comprende también una cantidad de microportadores correspondiente a una concentración final de microportadores dentro del intervalo de 1 a 10 g/L. Después de la transferencia, las células migran típicamente a la superficie de los portadores o al interior de los portadores dentro de las primeras 24 horas.

15 *Medio*

Los términos "medio de cultivo de células" y "medio de cultivo" (o simplemente "medio") se refieren a una solución de nutrientes utilizada para crecimiento de células eucariotas que proporcionan típicamente al menos un componente de una o más de las categorías siguientes: (1) sales de v.g. sodio, potasio, magnesio, y calcio que contribuyen a la osmolalidad del medio; (2) una fuente de energía, usualmente en la forma de un carbohidrato tal como glucosa; (3) la totalidad de los aminoácidos esenciales, y usualmente el conjunto básico de veinte aminoácidos; (4) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones; y (5) elementos traza, donde los elementos traza se definen como compuestos inorgánicos que se requieren típicamente a concentraciones muy bajas, usualmente en el rango micromolar. La solución de nutrientes puede complementarse opcionalmente con uno o más de los componentes de cualquiera de las categorías siguientes: (a) suero animal; (b) hormonas y otros factores de crecimiento tales como, por ejemplo, insulina, transferrina, y factor de crecimiento epidérmico; y (c) hidrolizados de proteína y tejidos.

La presente invención abarca el cultivo de células eucariotas en un medio que comprende componentes derivados de animales, v.g. suero o componentes de suero, así como medio que carece de componentes derivados de animales. El medio de cultivo de células que comprende componentes derivados de animales (tales como, v.g., suero bovino fetal (FBS)) puede comprender más de 5% de suero o entre 0% y 5% de suero, tal como, por ejemplo, entre 0% y 1% de suero o entre 0% y 0,1% de suero.

Se prefieren medios que carecen de componentes derivados de animales. Como se utiliza en esta memoria, componentes "derivados de animales" son cualesquiera componentes que se producen en un animal intacto (tal como, v.g., proteínas aisladas y purificadas de suero), o producidos por utilización de componentes producidos en un animal intacto (tal como, v.g., un aminoácido producido por utilización de una enzima aislada y purificada a partir de un animal para hidrolizar un material de procedencia vegetal). En contraste, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, que tiene origen genómico en un animal) pero que se produce in vitro en cultivo de células (tal como, v.g., en una levadura o célula bacteriana recombinante o en un linaje establecido continuo de células eucariotas, recombinante o no), en medios que carecen de componentes que se producen en, y se aíslan y purifican a partir de un animal intacto no es un componente "derivado de animal" (tal como, v.g., insulina producida en una levadura o célula bacteriana, o insulina producida en un linaje establecido de células de mamífero, tal como, v.g., células CHO, BHK o HEK, o interferón producido en células Namalwa). Por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de una proteína animal (v.g., tiene un origen genómico en un animal) pero que se produce en una célula recombinante en medios que carecen de componentes derivados de animales (tal como, v.g., insulina producida en una levadura o célula bacteriana) no es un "componente derivado de animal". De acuerdo con ello, un medio de cultivo de células que carece de componentes derivados de animales es uno que puede contener proteínas animales que se producen recombinantemente; dicho medio, sin embargo, no contiene, v.g., suero animal o proteínas u otros productos purificados a partir de suero animal. Dicho medio puede contener, por ejemplo, uno o más componentes derivados de plantas. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo de células, en particular uno que carezca de componentes derivados de animales, que soporte el crecimiento y mantenimiento de células en las condiciones de la invención. Típicamente, el medio contiene agua, un regulador de osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o más factores de crecimiento sintéticos o recombinantes, vitaminas, y cofactores. En una realización, el medio carece de componentes derivados de animales y carece de proteínas ("exento de proteínas"). Medios que carecen de componentes y/o proteínas derivados de animales están disponibles de suministradores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, JRH Biosciences, Gibco y Gemini.

Además de componentes convencionales, un medio adecuado para producción de polipéptidos Factor VII o afines a Factor VII contiene Vitamina K, que se requiere para γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico en el Factor VII, a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 y 50 mg/L, con preferencia entre aproximadamente 0,5 y 25 mg/L, de modo más preferible entre aproximadamente 1 y 10 mg/L y de modo muy preferible aproximadamente 5 mg/L.

Medios adecuados para uso en la presente invención están disponibles de suministradores comerciales tales como, por ejemplo, Gibco, y JRH Biosciences.

En una realización, el medio está compuesto como se muestra en la Tabla 3, complementado opcionalmente con uno o más de los componentes que se muestran en la Tabla 4.

- 5 La tabla siguiente (Tabla 3) es una composición de un medio adecuado para uso en la presente invención. Opcionalmente, se añade(n) al medio de cultivo uno o más de los componentes enumerados en la Tabla 4. Los intervalos preferidos se enumeran en la Tabla 4. En una realización, el medio utilizado es Medio 318-X; en otra realización, se trata del medio CHO-K.

Tabla 3

COMPONENTE	Intervalo (mg/L)	Concentración en CHO-K (mg/L)	Concentración en 318-X (mg/L)
Cloruro de sodio	0-70 000	6122	6996
Cloruro de potasio	0-3118	311,8	311,8
Dihidrógeno-fosfato de sodio monohidratado	0-625	62,5	62,5
Hidrogenocarbonato de sodio	0-27	-	2,7
Hidrogenofosfato disódico anhidro	0-710	71,02	-
Hidrogenofosfato disódico heptahidratado	0-1340	-	134
Cloruro de magnesio anhidro	0-287	28,64	-
Cloruro de magnesio hexahidratado	0-610	-	61
Sulfato de magnesio anhidro	0-488	48,84	-
Sulfato de magnesio heptahidratado	0-1000	-	100
Cloruro de calcio anhidro	0-1166	116,6	116,6
Sulfato de cobre pentahidratado	0-0,014	0,0013	0,0013
Sulfato ferroso heptahidratado	0-4,17	0,147	0,417
Nitrato férrico nonahidratado	0-0,5	0,05	0,05
Citrato férrico	0-123	0,4	12,24
Sulfato de cinc heptahidratado	0-0,44	0,432	0,432
Dextrosa anhidra	0-45 000	4501	4500
Ácido linoleico	0-12	1,189	0,336
Insulina	0-50	5	5
Ácido DL 68 tióctico	0-9	0,473	0,84
L-alanina	0-50	4,45	4,45
Cloruro de L-arginina	0-5500	547,8	447,5
L-asparagina monohidratada	0-6010	407,5	607,5
Ácido L-aspártico	0-1100	6,65	106,65
Hidrocloruro de L-cisteína monohidratado	0-1200	117,65	77,56

ES 2 565 077 T3

Ácido L-glutámico	0-2500	251,35	107,35
Glicina	0-190	18,75	18,75
Hidrocloruro de L-histidina monohidratado	0-2200	211,48	101,48
L-iso-leucina	0-750	54,47	74,47
L-leucina	0-1800	179,05	159,05
Hidrocloruro de L-lisina	0-2400	231,25	131,25
L-metionina	0-1380	137,24	97,24
L-fenilalanina	0-1600	155,48	85,48
L-prolina	0-1150	17,25	117,25
L-serina	0-4300	266,25	426,25
L-treonina	0-1800	173,45	73,45
L-triptófano	0-2100	39,02	209,02
L-tirosina-disódica dihidratada	0-900	55,79	85,79
L-valina	0-1800	177,85	125,85
Dihidrocloruro de L-cistina	0-320	31,29	31,29
Hipoxantina de sodio	0-25	2,39	2,39
Dihidrocloruro de putrescina	0-1	0,081	0,081
Piruvato de sodio	0-2300	220	55
D-biotina	0-3	0,1313	0,259
D-pantotenato de calcio	0-60	4,08	6
Ácido fólico	0-70	4,65	6,65
I-inositol	0-700	39,1	65,6
Nicotinamida	0-50	3,085	4,2
Cloruro de colina	0-450	29,32	42
Hidrocloruro de piridoxina	0-25	0,117	2,2
Riboflavina	0-3	0,219	0,219
Hidrocloruro de tiamina	0-35	2,67	3,17
Timidina	0-4	0,365	0,365
Vitamina B12	0-50	2,68	4,68
Hidrocloruro de piridoxal	0-60	6	2
Glutación	0-50	2,5	5
Selenito de sodio	0-0,5	0,02175	0,0232
Ácido L-ascórbico	0-50	27,5	5
Pluronic F68	0-10 000	1000	1000
Vitamina K	0-50	5	5

ES 2 565 077 T3

Dextrano T70	0-1000	-	100
Hidrolizado de soja (v.g., HY-SOY®)	0-5000	500	-

Componentes opcionales:

Tabla 4

Componente	Intervalo (mg/L)
Hidrolizados vegetales HyPep 4601, 4602, 4605, 5603, 7401	0-5000
Lípidos, ácido oleico	0-15
Factores de crecimiento HGR, IGF, EGF	0-50

5 En otra realización, el medio utilizado tiene la composición siguiente (medio 318-U):

Tabla 5

COMPONENTE	(mg/L)
Cloruro de sodio	6122
Cloruro de potasio	311,8
Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado	62,5
Hidrogenofosfato disódico anhidro	71,02
Cloruro de magnesio anhidro	28,64
Sulfato de magnesio anhidro	48,84
Cloruro de calcio anhidro	116,6
Sulfato de cobre pentahidratado	0,0013
Sulfato ferroso heptahidratado	0,417
Nitrato férrico nonahidratado	0,05
Sulfato de cinc heptahidratado	0,432
Dextrosa anhidra	4501
Ácido linoleico	1,189
Ácido DL-68-tióctico	0,473
L-alanina	4,45
Hidrocloruro de L-arginina	547,5
Monohidrato de L-asparagina	407,5
Ácido L-aspártico	6,65
Monohidrato de hidrocloreuro de L-cisteína	117,65
Ácido L-glutámico	251,35
L-glutamina	365

ES 2 565 077 T3

Glicina	18,75
Monohidrato de hidrocloreuro de L-histidina	211,48
L-iso-leucina	54,47
L-leucina	179,05
Hidrocloreuro de L-lisina	231,25
L-metionina	137,24
L-fenilalanina	155,48
L-prolina	17,25
L-serina	266,25
L-treonina	173,45
L-triptófano	39,02
L-tirosina disódica dihidratada	55,79
L-valina	177,85
Dihidrocloreuro de L-cistina	31,29
Hipoxantina sódica	2,39
Dihidrocloreuro de putrescina	0,081
Piruvato de sodio	220
D-biotina	0,1313
D-pantotenato de calcio	4,08
Ácido fólico	4,65
I-inositol	39,1
Nicotinamida	3,085
Cloruro de colina	29,32
Hidrocloreuro de piridoxina	0,117
Riboflavina	0,219
Hidrocloreuro de tiamina	2,67
Timidina	0,365
Vitamina B12	2,68
Hidrocloreuro de piridoxal	3
Glutati3n	2,5
Selenito de sodio	0,02175
Ácido L-asc3rbico, 3cido libre	27,5
Hidrogenocarbonato de sodio	2440
HySoy (hidrolizado de prote3nas de soja)	500
Etanolamina	1,22

Insulina	5
Dextrano T70	100
Pluronic F68	1000
Vitamina K1	5
COMPONENTE	mL/L
Complejo Fe/citrato (50 mM/1 M)	0,4
Mercaptoetanol	0,0035

El medio es preferiblemente un medio que carece de componentes derivados de animales, o un medio que carece de componentes derivados de animales y que carece de proteínas ("exento de proteínas").

5 En una realización, el medio es un medio CHO disponible comercialmente y exento de proteínas que carece de componentes derivados de animales (JRH Biosciences) y el linaje de células es una célula CHO. En una realización, el medio es Medio 318-X y el linaje de células es un linaje de células BHK; en otra realización, el Medio es medio 318-U y el linaje de células es un linaje de células BHK. En otra realización, el medio es Medio CHO-K y el linaje de células es un linaje de células CHO.

10 En algunas realizaciones, las células utilizadas en la práctica de la presente invención están adaptadas para crecimiento en suspensión en un medio que carece de componentes derivados de animales, tal como, v.g., medio que carece de suero. Tales procedimientos de adaptación se describen, v.g., en Scharfenberg, et al., Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (células BHK y CHO); Cruz, Biotechnol. Tech. 11:117-120, 1997 (células de insecto); Keen, Cytotechnol. 17: 203-211, 1995 (células de mieloma); Berg et al., Biotechniques 14: 972-978, 1993 (células 293 de riñón humano). En una realización particularmente preferida, las células hospedadoras son células BHK 21 o células CHO que han sido modificadas por ingeniería genética para expresar Factor VII humano y que se han adaptado para crecimiento en ausencia de suero o componentes derivados de animales.

Procesamiento Aguas Abajo

20 Una vez que el medio ha sido retirado de la vasija de cultivo, el mismo puede someterse a uno o más pasos de procesamiento para obtener la proteína deseada, que incluyen, sin limitación, centrifugación o filtración para eliminar las células que no estaban inmovilizadas en los portadores; cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión de tamaños; procedimientos electroforéticos (v.g., enfoque isoeléctrico preparativo (IEF), solubilidad diferencial (v.g., precipitación con sulfato de amonio), o extracción y análogos. Véase, generalmente, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

30 La purificación de polipéptidos Factor VII o afines a Factor VII puede implicar, v.g., cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-Factor VII (véase, v.g., Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261: 11097, 1986; y Thim et al., Biochem. 27: 7785, 1988) y activación por escisión proteolítica, utilizando Factor XIIa u otras proteasas que tienen especificidad de tipo tripsina tales como, v.g., Factor IXa, calicreína, Factor Xa, y trombina. Véase, v.g., Osterud et al., Biochem. 11:2853 (1972); Thomas, Patente U.S. N.º 4.456.591; y Hedner et al., J. Clin. Invest. 71:1836 (1983). Alternativamente, el Factor VII puede activarse por paso del mismo a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q® (Farmacia) o análogas.

Los ejemplos que siguen se presentan como ilustraciones no limitantes de la presente invención.

PARTE EXPERIMENTAL

35 *Métodos Generales*

Ensayos adecuados para determinación de la actividad biológica de polipéptidos Factor VII

Los polipéptidos Factor VII útiles según la presente invención pueden seleccionarse por ensayos adecuados que se pueden realizar como tests in vitro simples preliminares. Así, la presente memoria descriptiva da a conocer un test simple (titulado "Ensayo de Hidrólisis in Vitro") para la actividad de polipéptidos Factor VII.

40 **Ensayo de Hidrólisis In Vitro (Ensayo 1)**

Los polipéptidos Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y Factor VII (a los dos cuales se hace referencia en lo sucesivo como "del Factor VIIa") pueden ensayarse respecto a actividades específicas. Los mismos pueden ensayarse

también en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromógeno D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade a Factor VIIa (concentración final 100 nM) en HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM, y 1 mg/mL de seroalbúmina bovina. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE. UU.). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de sustracción de la absorbancia en un pocillo de muestra en blanco que no contiene enzima alguna, se utiliza para calcular la ratio entre las actividades de polipéptido Factor VII y Factor VIIa tipo salvaje:

$$\text{Ratio} = (\text{A405 nm polipéptido Factor VII})/(\text{A405 nm Factor VIIa tipo salvaje}).$$

10 Basándose en ello, pueden identificarse polipéptidos Factor VII con una actividad menor que, comparable a, o mayor que Factor VIIa nativo, tales como, por ejemplo, polipéptidos Factor VII en los cuales la ratio entre la actividad del polipéptido Factor VII y la actividad del Factor VII nativo (FVII tipo salvaje) es aproximadamente 1,0 frente a más de 1,0.

15 La actividad de los polipéptidos Factor VII puede medirse también utilizando un sustrato fisiológico tal como Factor X ("Ensayo de Proteólisis In Vitro"), convenientemente a una concentración de 100-1000 nM, donde el Factor Xa generado se mide después de la adición de un sustrato cromógeno adecuado (v.g., S-2765). Adicionalmente, el ensayo de actividad puede realizarse a temperatura fisiológica.

Ensayo de Proteólisis In Vitro (Ensayo 2)

20 Se ensayan polipéptido Factor VIIa y Factor VII nativo (tipo salvaje) (a los dos cuales se hace referencia en lo sucesivo en esta memoria como "del Factor VIIa") en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Factor VIIa (10 nM) y Factor X (0,8 microM) en 100 µL de HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM, y 1 mg/mL de seroalbúmina bovina, se incuban durante 15 min. La escisión Factor X se interrumpe luego por adición de 50 µL de HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM y 1 mg/mL de seroalbúmina bovina. La cantidad de Factor Xa generada se mide por adición del sustrato cromógeno Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE. UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de sustracción de la absorbancia en un pocillo de muestra en blanco que no contiene cantidad alguna de FVIIa, se utiliza para calcular la ratio entre las actividades proteolíticas del polipéptido Factor VII y Factor VIIa de tipo salvaje:

30
$$\text{Ratio} = (\text{A405 nm polipéptido Factor VII})/(\text{A405 nm Factor VIIa de tipo salvaje}).$$

Basándose en ello, puede identificarse el polipéptido Factor VII con una actividad menor que, comparable a, o mayor que el Factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, polipéptidos Factor VII en los cuales la ratio entre la actividad del polipéptido Factor VII y la actividad del Factor VII nativo (FVII de tipo salvaje) es aproximadamente 1,0 frente a más de 1,0.

35 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción Exenta de Suero Factor VII

Se realizó el experimento siguiente para producir Factor VII en cultivo de escala piloto grande.

Un linaje de células CHO K1 transformado con un plásmido codificante Factor VII se adaptó a crecimiento en cultivo de suspensión en un medio exento de componentes derivados de animales. Se congeló un conjunto de las células adaptadas. Las células del conjunto se propagaron en botellas "spinner" en cultivo de suspensión en medio exento de componentes derivados de animales. A medida que aumentaba el número de células, el volumen se incrementaba gradualmente por adición de medio nuevo. Cuando el volumen hubo alcanzado 4 L, y el número de células había alcanzado $\approx 0,8 \times 10^6/\text{mL}$, los contenidos de las botellas "spinner" se transfirieron a un reactor de tanque agitado de 50 L (reactor de siembra). A medida que aumentaba el número de células en el reactor de 50 L, el volumen se incrementaba gradualmente por adición de medio nuevo. Cuando el volumen hubo alcanzado 50 L, y el número de células hubo alcanzado $\approx 1 \times 10^6/\text{mL}$, los contenidos del reactor 50 L se transfirieron a un reactor de tanque agitado de 500 L (reactor de producción). El reactor de 500 L contenía portadores macroporosos Cytopore 1 (Amersham Biosciences) dentro de los cuales las células llegaron a inmovilizarse en el transcurso de 24 horas después de la inoculación. El volumen en el reactor de 500 L se incrementó gradualmente por adición de medio nuevo a medida que aumentaba el número de células. Cuando el volumen hubo alcanzado 450 L, y el número de células hubo alcanzado $\approx 2 \times 10^6/\text{mL}$, se inició la fase de producción y se realizó un cambio de medio cada 24 horas: Se paró la agitación para permitir la sedimentación de los portadores que contenían células, y se recogió luego el 80% del sobrenadante de cultivo, que se reemplazó con medio nuevo. El sobrenadante de cultivo recogido se filtró para separar las células no atrapadas y los residuos de células, y se transfirió luego para procesamiento ulterior. El reactor de 50 L, así como el biorreactor de 500 L estaban provistos de instrumentos para control de temperatura, oxígeno disuelto (borboteo de oxígeno mediante microborboteador), velocidad de agitación, velocidad de aireación del espacio de cabezas y pH (control descendente por adición de CO₂ gaseoso al espacio de cabezas, sin control

ascendente alguno por adición de base). Adicionalmente, el biorreactor de 500 L estaba provisto de instrumentos para control de CO₂ disuelto. La medida de CO₂ en línea se realizó por medio de un instrumento de CO₂ YSI 8500. El nivel de CO₂ se controló por borboteo de aire atmosférico en el interior del líquido mediante un tubo según la señal de CO₂. La velocidad de borboteo se ajustó a 0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO₂ era igual o menor que el punto de regulación, y a 0,01-0,05 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO₂ era superior al punto de regulación. El punto de regulación para CO₂ disuelto era 160 mmHg. Como se ha mencionado, no se añadió base alguna al biorreactor para controlar el pH hacia arriba. Durante la fase de producción, la densidad de células alcanzó $1-2 \times 10^7$ células/mL, y la concentración de FVII en la cosecha diaria era 10-20 mg/L. La pCO₂ se mantuvo dentro del intervalo de 150-170 mmHg. El pH se mantuvo por encima de 6,70, aunque no se añadió base alguna.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de células de $1-12 \times 10^6$ células/mL, comprendiendo dicho método: monitorizar la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo, y borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo, en donde la velocidad de borboteo del aire se controla en relación con la concentración monitorizada de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo; y en donde el aire se borbotea a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración y
- 5 en donde no se añade al líquido de cultivo cantidad alguna de base con un valor de pH superior a 8,5.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el intervalo predeterminado para la concentración de CO₂ disuelto es 80-200 mmHg, tal como 100-180 mmHg.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la concentración en el punto de regulación de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo es un valor comprendido dentro del intervalo de 100-180 mmHg, tal como 120-160 mmHg.
- 15 4. El método según la reivindicación 3, en el que la concentración del punto de regulación de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo corresponde a un valor de 140 mmHg.
5. El método según la reivindicación 1, en el que la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,000-0,100 L/min por L de líquido de cultivo.
6. El método según la reivindicación 5, en el que la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,005-0,020 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación.
- 20 7. El método según la reivindicación 6, en el que la velocidad de borboteo de aire está:
- dentro del intervalo de 0,000-0,005, tal como alrededor de 0,0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación - 5 mmHg; y
- dentro del intervalo de 0,010-0,100, tal como 0,030-0,070, v.g. alrededor de 0,040-0,060, L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación + 5 mmHg.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo no dan lugar a un valor localizado de pH superior a 7,5 en dicho líquido de cultivo.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido es un polipéptido Factor VII.
10. Un método para producción en gran escala de un polipéptido en células eucariotas contenidas en un líquido de cultivo a una densidad de células de $1-12 \times 10^6$ células/mL, comprendiendo dicho método borbotear aire constante o intermitentemente a través del líquido de cultivo a una velocidad suficiente para mantener la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo dentro de un intervalo predeterminado que comprende un punto de regulación para dicha concentración, en donde la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,000-0,070 L/min por L de líquido de cultivo y cualesquiera sustancias sólidas o líquidas añadidas al líquido de cultivo no dan lugar a un valor localizado de pH superior a 7,5 en dicho líquido de cultivo.
- 35 11. El método según la reivindicación 10, en el que la concentración de CO₂ disuelto en el líquido de cultivo está monitorizada.
- 40 12. El método según la reivindicación 11, en el que la velocidad de borboteo de aire está dentro del intervalo de 0,005-0,020 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación.
13. El método según la reivindicación 12, en el que la velocidad de borboteo de aire está:
- 45 dentro del intervalo de 0,000-0,005, tal como alrededor de 0,0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación - 5 mmHg; y
- dentro del intervalo de 0,010-0,100, tal como 0,030-0,070, v.g. alrededor de 0,040-0,060, L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO₂ disuelto es igual a la concentración del punto de regulación + 5 mmHg.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que el polipéptido es un polipéptido Factor VII.

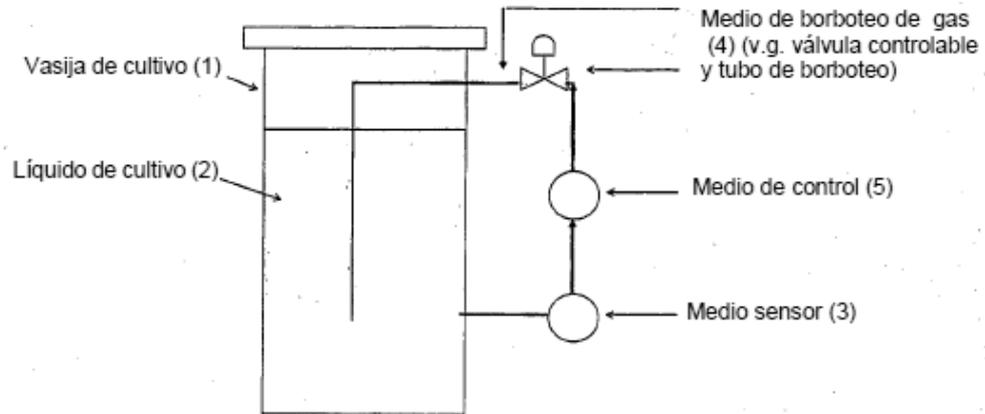


Figura 1