(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 649 094**

(51) Int. CI.:

C12P 21/02 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008 E 12198754 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2574677**

(54) Título: **Procedimientos de cultivo celular**

(30) Prioridad:

27.12.2007 US 9328 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.01.2018

(73) Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Zählerweg 4
6300 Zug, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

(72) Inventor/es:

GIOVAGNOLI, ANDRE;
ROY, SYLVAIN;
DUCROS, VERONIQUE;
CHARLOT, VIRGINIE y
STAUFFER, YVES-OLIVIER

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

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

Procedimientos de cultivo celular

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 61/009.328, presentada el 27 de diciembre de 2007.

Campo de la invención

La invención se refiere a procedimientos para cultivar células de mamífero, particularmente células de mamífero que secretan proteínas heterólogas y/o recombinantes y, más particularmente, células de mamífero que secretan proteínas de la sangre, tales como el factor de coagulación sanguínea VIII (a continuación en el presente documento "factor VIII", o simplemente "FVIII"), ADAMTS-13, furina o factor de coagulación VII (a continuación en el presente documento "factor VII", o simplemente "FVII").

Antecedentes de la invención

El factor de coagulación sanguínea VIII es una glicoproteína plasmática traza que se encuentra en mamíferos y está implicada como cofactor de IXa en la activación del factor X. Una deficiencia heredada del factor VIII da como resultado el trastorno hemorrágico hemofilia A, que puede tratarse satisfactoriamente con factor VIII purificado. El factor VIII puede extraerse del plasma sanguíneo o puede producirse mediante técnicas basadas en ADN recombinante. En el plasma, circula como un complejo con el factor de von Willebrand (vWF).

Puede producirse factor VIII recombinante (rFVIII) mediante células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector que porta una secuencia de ADN que codifica para la molécula de factor VIII. En algunos casos, el factor VIII recombinante se produce conjuntamente con factor de von Willebrand recombinante (rvWF), que estabiliza el factor VIII. Tal producción conjunta puede implicar el cultivo conjunto de líneas celulares respectivas que expresan FVIII y vWF, o la expresión conjunta de las dos proteínas en la misma célula. Véase el documento US 5 250 421 (Genetics Institute) y Kaufman *et al* (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1233-1242.

En un procedimiento típico para preparar factor VIII recombinante, se cultivan células en un medio y secretan factor VIII al medio. Entonces puede purificarse el factor FVIII del medio, opcionalmente como complejo con vWF.

El factor VIII recombinante es caro de producir debido a los rendimientos relativamente bajos obtenidos en los procedimientos conocidos en la técnica. El rendimiento por célula tiene a ser bajo en comparación con el rendimiento que podría obtenerse para otras proteínas recombinantes. Si el medio de cultivo no se complementa con productos animales, tales como suero, el medio puede soportar solamente densidades celulares relativamente bajas. Esto reduce el rendimiento por volumen de medio. Sin embargo, es deseable no complementar el medio de cultivo con productos animales con el fin de reducir el riesgo de contaminación con virus y otros agentes transmisibles. Se conocen medios libres de proteínas animales para la producción de FVIII a partir del documento US 6 936 441 (Baxter AG), por ejemplo.

La presente invención proporciona procedimientos para producir proteínas de la sangre, incluyendo rFVIII, en los que el rendimiento se mejora en comparación con procedimientos conocidos en la técnica.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona un método de cultivo de células de mamíferos que secretan proteínas heterólogas en un sobrenadante de cultivo celular en el que el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una temperatura que se establece a 36 ± 0,9ºC.

Un segundo aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona un método de cultivo de células de mamífero que secretan proteínas heterólogas en un sobrenadante de cultivo celular en el que el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a un pH que se establece a X±0,05 en el que X tiene un valor de desde 7,15 hasta 7,20, con la condición de que el pH se establezca a más de 7,10.

Un tercer aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona un método de cultivo de células de mamífero que secretan proteínas heterólogas en un sobrenadante de cultivo celular en el que el sobrenadante de cultivo celular tiene una concentración de CO_2 del 1-10%.

También se divulga un método de cultivo continuo de células de mamífero que secretan FVIII en un recipiente que comprenden un sobrenadante de cultivo celular en el que la densidad de las células en el sobrenadante de cultivo celular se mide mediante un sensor en línea y el flujo de entrada de medio nuevo en el recipiente se controla de manera automática para mantener la densidad de las células en un intervalo deseado.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

En el procedimiento del primer aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el sobrenadante de cultivo celular en el que se cultivan las células de mamífero se mantiene a una temperatura que se establece a 36±0,9ºC, preferiblemente 36±0,5ºC, más preferiblemente 36±0,2ºC y lo más preferiblemente 36ºC; o 35,1ºC; o 36,5±0,2ºC y lo más preferiblemente 36,5ºC.

El "sobrenadante de cultivo celular" es el medio en el que se cultivan las células de mamífero. Este medio no ha de confundirse con el medio de alimentación que puede añadirse al cultivo, aunque también se añade preferiblemente medio de alimentación al cultivo a la temperatura a la que se establece el sobrenadante de cultivo celular. Por "cultivo" quiere decirse el sobrenadante de cultivo celular y las células de mamífero cultivadas en el mismo. De manera convencional, se cultivan células de mamífero a 37ºC. De manera sorprendente, el solicitante ha encontrado que el cultivo de células de mamífero a una temperatura más baja, tal como 36ºC, aumenta el rendimiento de proteína recombinante.

Por "cultivar a" o "mantener a" una temperatura, se hace referencia a la temperatura a la que los sistemas de control del procedimiento se establecen, es decir, la temperatura deseada objetivo. Claramente, habrá pequeñas variaciones de la temperatura de un cultivo a lo largo del tiempo, y de una ubicación a otra a través del recipiente de cultivo. Cuando se hace referencia a "cultivar a" o "mantener a" una temperatura que se establece a X±YºC, quiere decirse que el punto establecido está en un valor de desde X + YºC hasta X – YºC. De ese modo, por ejemplo, cuando X es 36,0±0,9ºC, el punto establecido se establece a un valor de desde 35,1 hasta 36,9. Para cada uno de los valores preferidos de X, el punto establecido está a un valor dentro del intervalo de X±0,9ºC, ±0,8ºC, ±0,7ºC, ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC o ±0,1ºC. Se prefieren rangos más limitados. Lo más preferido es un punto establecido de X.

Para cualquier punto establecido dado, pueden producirse ligeras variaciones en la temperatura. Normalmente, tal variación puede producirse debido a elementos de calentamiento y enfriamiento que solamente se activan después de que la temperatura se haya desviado algo del punto establecido. En ese caso, el punto establecido es X(±Y) y el elemento de calentamiento o enfriamiento se activa cuando la temperatura varía en ±ZºC, según sea apropiado. Normalmente, el grado de desviación permisible de la temperatura desde el punto establecido antes de que los elementos de calentamiento o enfriamiento se activen, puede programarse en el sistema de control del procedimiento. Puede controlarse la temperatura a los ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC o incluso ±0,1ºC más próximos mediante elementos de calentamiento y enfriamiento controlados por termostatos. También pueden programarse diferenciales mayores de temperatura, tal como ±0,9ºC, ±0,8ºC, ±0,7ºC o ±0,6ºC. La temperatura también puede controlarse mediante inmersión del recipiente de cultivo en un baño de calentamiento a una temperatura particular. De manera concebible, no hay variación del punto establecido porque el calentamiento se aplica continuamente. Surge otra fuente de variación debido a un error de medición en la temperatura del sobrenadante de cultivo celular. Los termómetros típicos usados en el equipo de cultivo celular pueden tener una variabilidad de ±0,3ºC o ±0,2ºC, o incluso ±0,1ºC.

Cuando se establece el punto establecido a un valor dentro del intervalo X±YºC, y la tolerancia de la temperatura es ±ZºC (es decir, se activa un calentador o enfriador cuando la temperatura se desvía en ±ZºC, según sea apropiado) esto también puede expresarse como punto establecido de (X-Y a X+Y) ±ZºC. Para cada valor posible de X, se conciben todas las combinaciones de ±YºC y ±ZºC, tal como se indicó anteriormente, con la condición de que la temperatura se establece a menos de 37ºC.

En un método divulgado, la temperatura se establece a 36±YºC. Por ejemplo, la temperatura se establece a (35,4-36,6) ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,5-36,5) ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,6-36,4) ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,7-36,3) ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,8-36,2) ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,9-36,1) ±0,8ºC, ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o 36 ±0,9ºC ±0,8ºC, ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºCºC.

En métodos divulgados, la temperatura se establece a 35,1±YºC. Por ejemplo, la temperatura se establece a (34,5-35,7) ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (34,6-35,6) ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (34,7-35,5) ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (34,8-35,4) ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (34,9-35,3) ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (35,0-35,2) ±0,8ºC, ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o 35, 160,9ºC ±0,8ºC, ±0,7ºC ±0,6ºC, ±0,5ºC, ±0,4ºC, ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºCºC.

En métodos divulgados, la temperatura se establece a 36,5±YºC. Por ejemplo, la temperatura se establece a (36,1-36,9) ±0; o (36,2-36,8) ±0,1ºC o ±0ºC; o (36,3-36,7) ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o (36,4-36,6) ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC; o 36,5 ±0,4ºC. ±0,3ºC, ±0,2ºC, ±0,1ºC o ±0ºC.

En el procedimiento del segundo aspecto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, el

sobrenadante de cultivo celular se mantiene a un pH que se establece a X±0,05 en el que X tiene un valor de desde 7,15 hasta 7,20, con la condición de que el pH se establezca a más de 7,10. En realizaciones preferidas, el pH se establece a 7,20±0,05, preferiblemente 7,20±0,03, más preferiblemente 7,20±0,01 y lo más preferiblemente a 7,20; o 7,15±0,05, preferiblemente 7,15±0,03, más preferiblemente 7,15±0,01 y lo más preferiblemente a 7,15. En un procedimiento convencional para producir una proteína recombinante, el sobrenadante de cultivo celular se mantiene at pH 7,1. De manera sorprendente, el solicitante ha encontrado que el cultivo de las células de mamífero a un pH más alto, tal como pH 7,2, aumenta el rendimiento de proteína recombinante.

Por “cultivar a” o “mantener a” un pH, se hace referencia al pH al que los sistemas de control del procedimiento se establecen, es decir, el pH deseado objetivo. Cuando se hace referencia a “cultivar a” o “mantener a” un pH que se establece a X±Y, quiere decirse que el punto establecido está a un valor de desde X+Y hasta X-Y. Para cada uno de los valores preferidos de X, el punto establecido está a un valor dentro del intervalo X±0,05, ±0,04, ±0,03, ±0,02 o ±0,01ºC. Se prefieren intervalos más estrechos. Lo más preferido es un punto establecido de X.

Para cualquier punto establecido dado, pueden producirse ligeras variaciones en el pH. Normalmente, tal variación puede producirse debido a que los medios que controlan el pH, por ejemplo, añadiendo ácido o base, o cambiando la velocidad de burbujeo, se activan únicamente después de que el pH se haya desviado algo del punto establecido. Normalmente, el pH se controla a ±0,05, ±0,04, ±0,03, ±0,02 o ±0,01ºC unidades de pH más próximas.

Cuando el punto establecido de pH se establece a un valor dentro del intervalo X±Y, y la tolerancia es ±Z, esto también puede expresarse como punto establecido de (X-Y a X+Y) ±Z. Para cada valor posible de X, se conciben todas las combinaciones de ±Y y ±Z, tal como se indicó anteriormente, con la condición de que el pH se establezca a más de 7,10.

En una realización preferida, el pH se establece a 7,20±Y. Preferiblemente, el pH se establece a (7,15-7,25) ±0; o (7,16-7,24) ±0,1 o ±0ºC; o (7,17-7,23) ±0,2, ±0,1 o ±0ºC; o (7,18-7,22) ±0,3, ±0,2, ±0,1 o ±0ºC; o (7,19-7,21) ±0,4, ±0,3, ±0,2, ±0,1 o ±0ºC; o 7,20±0,5, ±0,4, ±0,3, ±0,2, ±0,1 o ±0ºC.

En otra realización preferida, el pH se establece a 7,15±Y. Preferiblemente, el pH se establece a (7,11-7,19) ±0; o (7,12-7,18) ±0,1 o ±0ºC; o (7,13-7,17) ±0,2, ±0,1 o ±0ºC; o (7,14-7,16) ±0,3, ±0,2, ±0,1 o ±0ºC; o 7,15 ±0,4, ±0,3, ±0,2, ±0,1 o ±0ºC.

En el procedimiento del tercer aspecto de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el sobrenadante de cultivo celular tiene una concentración de CO_2 del 1 al 10%, por ejemplo del 4,0-9,0%, del 5,5-8,5% o aproximadamente del 6-8%. De manera convencional, la concentración de CO_2 es superior a esto debido a que el CO_2 producido por las células no se elimina del sobrenadante de cultivo celular. De manera sorprendente, el solicitante ha encontrado que mantener la concentración de CO_2 al 10% o menos aumenta el rendimiento de proteína recombinante. Ayuda a que se mantenga la dCO_2 baja si el medio de alimentación se desgasifica (por ejemplo, haciendo burbujear aire a través del mismo) así como hacer burbujear el sobrenadante de cultivo celular en el biorreactor.

Preferiblemente, el procedimiento de cada uno de los tres primeros aspectos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, se hace funcionar para incluir la característica particular especificada en relación con el procedimiento de uno o más de los otros aspectos de la invención. Es decir, cuando la concentración de CO_2 se mantiene al 10% o menos, es ventajoso mantener también el pH a X±0,05 en el que X tiene un valor de desde 7,15 hasta 7,20, y/o la temperatura a X±0,9ºC en el que X tiene un valor de desde 35,1 hasta 36,5ºC.

En esta técnica se conocen bien modos para monitorizar los tres parámetros definidos (temperatura, pH y concentración de CO_2) y generalmente se basan en sondas que se insertan en el biorreactor, o se incluyen en bucles a través de los cuales se hace circular el medio de cultivo, o se insertan en muestras extraídas de medio de cultivo. Se describe un sensor de dCO_2 en línea adecuado y su uso en Pattison *et al* (2000) Biotechnol. Prog. 16:769-774. Un sensor de pH en línea adecuado es InPro 3100/125/Pt100 de Mettler Toledo (Mettler-Toledo Ingold, Inc., Bedford, MA). Un sistema fuera de línea adecuado para medir dCO_2, además del pH y pO_2, es el BioProfile pHOx (Nova Biomedical Corporation, Waltham MA). En este sistema, se mide dCO_2 mediante electrodos potenciométricos dentro del intervalo de 3-200 mmHg con una resolución de imprecisión del 5%. Puede medirse el pH en este sistema a una temperatura de 37ºC, que es próxima a la temperatura del sobrenadante de cultivo celular en el biorreactor. También se conocen bien modos de alterar el parámetro especificado con el fin de mantenerlo en el nivel predefinido. Por ejemplo, mantener la temperatura constante implica habitualmente calentar o enfriar el biorreactor o el medio de alimentación (si es un proceso continuo o semicontinuo); mantener el pH constante implica habitualmente elegir y suministrar suficiente cantidad de un tampón adecuado (normalmente bicarbonato) y añadir ácido, tal como ácido clorhídrico, o álcali, tal como hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio o una mezcla de los mismos, al medio de alimentación según sea necesario; y mantener la concentración de CO_2 constante implica habitualmente ajustar la velocidad de burbujeo (véase más adelante), o regular el flujo de CO_2 en el espacio de cabeza. Es posible que la calibración de una sonda de pH en línea pueda divagar a lo largo del tiempo, tal como a lo largo de periodos de días o semanas, durante los cuales se cultivan las células. En ese caso, puede ser beneficioso

reiniciar la sonda en línea usando las mediciones obtenidas de una sonda fuera de línea recientemente calibrada. Una sonda fuera de línea adecuada es la BioProfile pHOx (Nova Biomedical Corporation, Waltham MA).

Los inventores han encontrado que aumentar el pH (por ejemplo, añadiendo NaOH) no es suficiente por sí mismo para lograr el beneficio máximo en cuanto a la producción de proteína activa. En su lugar, es deseable reducir la concentración de CO_2. Normalmente, se mantendrían los otros parámetros del procedimiento constantes. Sin embargo, los inventores han encontrado que es ventajoso reducir la concentración de CO_2 pero permitir que el pH se eleve de 7,1, por ejemplo a 7,15 ó 7,2, preferiblemente sin añadir NaOH.

Los cultivos de células de mamífero necesitan oxígeno para que las células crezcan. Normalmente, esto se proporciona forzando oxígeno en el cultivo a través de orificios de inyección. También es necesario eliminar el CO_2 que se acumula debido a la respiración de las células. Esto se logra "burbujeando", es decir, haciendo pasar un gas a través del biorreactor con el fin de arrastrar y expulsar el CO_2. De manera convencional, esto también puede realizarse usando oxígeno. Sin embargo, los inventores han encontrado que es ventajoso usar aire en su lugar. Se ha encontrado que habitualmente un gas inerte convencional tal como nitrógeno es menos eficaz en el burbujeo de CO_2 que usar aire. Dado que el aire es aproximadamente el 20% de oxígeno, podría pensarse que se usaría cinco veces más de aire. Sin embargo, se ha encontrado que esto inadecuado en cultivos a gran escala, particularmente en cultivos a escala de 2500 l. En un biorreactor de 2500 l, se usa de 7 a 10 veces más de aire, preferiblemente 9 veces más de aire aproximadamente. Por ejemplo, en condiciones convencionales, el biorreactor de 2500 l se burbujea con O_2 a un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 0,02 VVH (volumen de O_2 por volumen de cultivo por hora). Se burbujearía el mismo biorreactor de 2500 l usado según el método de la invención con aire a un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 0,18 VVH.

Por tanto, se ha encontrado que el uso de volúmenes sorprendente altos de aire proporciona un suministro de oxigeno adecuado y elimina el CO_2 no deseado.

Durante la fase de producción, se prefiere eliminar el CO_2 burbujeando aire, tal como se describió anteriormente. Éste es especialmente el caso cuando se usan biorreactores de gran capacidad, en los que el sobrenadante de cultivo celular acumularía de lo contrario CO_2 hasta altos niveles perjudiciales. Sin embargo, al inicio del cultivo, o en un cultivo a pequeña escala, tal como una escala de 1 l o 2,5 l, el espacio de cabeza puede recubrirse con CO_2. En tales condiciones, todavía pueden lograrse niveles bajos de dCO_2. El recubrimiento del espacio de cabeza con CO_2 también podría usarse para reducir el pH al punto establecido, si el pH es demasiado básico.

Las células pueden ser cualquier célula de mamífero que puede cultivarse, preferiblemente en un procedimiento de fabricación (es decir, al menos 1 litro), para producir una proteína deseada tal como FVIII. Los ejemplos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al*., J. Gen Virol., 36:59 [1977]); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR, tales como el subclon DUKX-B11 (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 [1980]); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón de perro (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al*., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferiblemente, la línea celular es una línea celular de roedor, especialmente una línea celular de hámster tal como CHO o BHK.

Un método preferido para preparar clones de células CHO estables que expresan una proteína recombinante es tal y como sigue. Se transfecta una línea celular de CHO deficiente en DHFR, DUKX-BII, con un vector de expresión de DHFR para permitir la expresión de la proteína recombinante relevante, esencialmente tal como se describe en el documento US 5.250.421 (Kaufman *et al*, Genetics Institute, Inc.). Se selecciona transfección con metotrexato. Se logra la amplificación de la región relevante que codifica para la expresión de la proteína recombinante y el gen de DHFR mediante propagación de las células en concentraciones crecientes de metotrexato. Cuando sea adecuado, pueden adaptarse líneas celulares de CHO para el crecimiento en medio libre de proteínas y/o suero, esencialmente tal como se describe en el documento US 6.100.061 (Reiter *et al*, Immuno Aktiengesellschaft).

El medio basal elegido para cultivar la línea celular huésped no es crítico para la presente invención y puede ser uno cualquiera de, o una combinación de, los conocidos en la técnica que son adecuados para cultivar células de mamífero. Medios tales como medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio F-12 de Ham, medio esencial mínimo de Eagle y medio RPMI-1640 y similares están disponibles comercialmente. La adición de factores de crecimiento tales como insulina recombinante es opcional.

Históricamente, se han cultivado células animales en medios que contienen suero animal. Sin embargo, tales medios no están definidos completamente y portan el riesgo de infección. Los expertos en la técnica han diseñado, por tanto, medios "libres de proteínas" que están o bien completamente libres de cualquier proteína o bien al menos

libres de cualquier proteína que no se produzca de manera recombinante. Debido a la naturaleza lábil del factor VIII, la productividad de las células huésped modificadas por ingeniería genética se reduce severamente en condiciones libres de proteínas. La albúmina sérica humana se usa frecuentemente como complemento para el cultivo libre de suero para la producción de proteínas recombinantes. La albúmina por sí misma estabiliza el FVIII y las impurezas presentes en preparaciones de albúminas derivadas de suero también pueden contribuir al efecto estabilizador de la albúmina. Se han identificado factores tales como lipoproteína como reemplazo para la albúmina sérica humana para la producción de factor VIII recombinante en condiciones libres de suero.

Los medios preferidos incluyen los divulgados en los documentos US 6 171 825 (Bayer, Inc) y US 6 936 441 (Baxter AG).

El medio del documento US 6 171 825 consiste en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco y medio F-12 de Ham (50:50, en peso) complementado con insulina recombinante, hierro, un poliol, cobre y opcionalmente otros oligoelementos.

La insulina debe ser recombinante y puede obtenerse como insulina “Nucellin” de Eli Lilly). Puede añadirse a de 0,1 a 20 μg/ml (preferiblemente 5-15 μg/ml, o aproximadamente 10 μg/ml). El hierro está preferiblemente en forma de iones Fe^{2+}, por ejemplo, proporcionado como $FeSO_4$·EDTA, y puede estar presente a 5-100 μM (de manera preferible aproximadamente 50 μm). Los polioles adecuados incluyen copolímeros de bloque no iónicos de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno) que tienen pesos moleculares que oscilan entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 16.000. Un poliol particularmente preferido es Pluronic F-68 (BASF Wyandotte), que tiene un peso molecular promedio de 8400 y consiste en un bloque central de poli(oxipropileno) (el 20% en peso) y boques de poli(oxietileno) en ambos extremos. También está disponible como Synperonic F-68 de Unichema Chemie BV. Otros incluyen los Pluronic F-61, F-71 y F-108. Puede añadirse cobre (Cu^{2+}) en una cantidad equivalente a $CuSO_4$ 50-800 nM, preferiblemente 100-400 nM, de manera conveniente aproximadamente 250 nM. La inclusión de un panel de oligoelementos tales como manganeso, molibdeno, silicio, litio y cromo puede conducir a aumentos adicionales en la producción de factor VIII. Las células BHK crecen bien en este medio basal libre de proteínas.

El medio del documento US 6 936 441 también se basa en una mezcla 50/50 de DMEM y F12 de Ham pero incluye peptona de soja o extracto de levadura a entre 0,1 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l. Como realización particularmente preferida, puede usarse extracto de soja, por ejemplo peptona de soja. El peso molecular de la peptona de soja puede ser menor de 50 kD, preferiblemente menor de 10 kD. La adición de peptona de soja ultrafiltrada que tiene un peso molecular promedio de 350 Dalton ha demostrado ser particularmente ventajosa para la productividad de las líneas celulares recombinantes. Es un aislado de soja que tiene un contenido en nitrógeno total de aproximadamente el 9,5% y un contenido en aminoácidos libres de aproximadamente el 13%, o aproximadamente el 7-10%.

Un medio particularmente preferido tiene la siguiente composición: medio mínimo sintético (por ejemplo, 50/50 de DMEM/F12 de Ham) de 1 a 25 g/l; peptona de soja de 0,5 a 50 g/l; L-glutamina de 0,05 a 1 g/l; $NaHCO_3$ de 0,1 a 10 g/l; ácido ascórbico de 0,0005 a 0,05 g/l; etanolamina de 0,0005 a 0,05; y selenito de sodio de 1 a 15 μg/l. Opcionalmente, puede añadirse un agente tensioactivo no iónico tal como un polipropilenglicol (por ejemplo, Pluronic F-61, Pluronic F-68, Pluronic F-71 o Pluronic F-108) al medio como agente desespumante. Este agente se aplica generalmente para proteger las células de los efectos negativos de la aireación (“burbujeo”), puesto que sin la adición de un agente tensioactivo la elevación y explosión de las burbujas de aire pueden dañar las células que están en la superficie de las burbujas de aire.

La cantidad de agente tensioactivo no iónico puede oscilar entre 0,05 y 10 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 5 g/l. Además, el medio también puede contener ciclodextrina o un derivado de la misma. Preferiblemente, el medio libre de proteínas y suero contiene un inhibidor de proteasas, tal como un inhibidor de la serina proteasa, que es adecuado para cultivo tisular y que es de origen sintético o vegetal.

En otra realización preferida, se añade adicionalmente la siguiente mezcla de aminoácidos al medio mencionado anteriormente: L-asparagina (de 0,001 a 1 g/l; preferiblemente de 0,01 a 0,05 g/l; particularmente de manera preferible de 0,015 a 0,03 g/l), L-cisteína (de 0,001 a 1 g/l; preferiblemente de 0,005 a 0,05 g/l; particularmente de manera preferible de 0,01 a 0,03 g/l), L-cistina (de 0,001 a 1 g/l; preferiblemente de 0,01 a 0,05 g/l; particularmente de manera preferible de 0,015 a 0,03 g/l), L-prolina (de 0,001 a 1,5 g/l; preferiblemente de 0,01 a 0,07 g/l; particularmente de manera preferible de 0,02 a 0,05 g/l), L-triptófano (de 0,001 a 1 g/l; preferiblemente de 0,01 a 0,05 g/l; particularmente de manera preferible de 0,015 a 0,03 g/l) y L-glutamina (de 0,05 a 10 g/l; preferiblemente de 0,1 a 1 g/l). Estos aminoácidos pueden añadirse al medio de manera individual o en combinación. La adición combinada de la mezcla de aminoácidos que contiene todos los aminoácidos mencionados anteriormente se prefiere particularmente.

En una realización particular, se usa adicionalmente un medio libre de proteínas y suero que contiene una combinación de las mezclas de aminoácidos mencionadas anteriormente y peptona de soja purificada y ultrafiltrada.

El medio del documento US 6 936 441 es particularmente muy adecuado para el cultivo de células CHO pero puede

usarse también con otras células.

Un medio adecuado adicional es el medio libre de oligopéptidos divulgado en el documento US 2007/0212770 (Grillberger *et al*; Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.)

Preferiblemente, el medio de cultivo se tampona mediante el uso de iones bicarbonato, suministrados normalmente como bicarbonato de sodio.

De manera adecuada, el medio de cultivo tiene una osmolalidad de entre 210 y 650 mOsm, preferiblemente de 270 a 450 mOsm, más preferiblemente de 310 a 350 mOsm y lo más preferiblemente de 320 mOsm. Preferiblemente, la osmolalidad del sobrenadante se mantiene dentro de uno o más de estos intervalos a lo largo de todo el método de la invención.

El cultivo es un cultivo continuo. Los cultivos continuos adecuados incluían cultivo discontinuo repetido, en quimiostato, turbidostato o perfusión.

Un cultivo discontinuo empieza con todos los nutrientes y células que se necesitan, y el cultivo continúa hasta la finalización, es decir hasta que los nutrientes se agotan o el cultivo se detiene por algún motivo.

Un cultivo semicontinuo es un proceso discontinuo en el sentido de que empieza con las células y nutrientes pero luego se le alimenta con nutrientes adicionales de manera controlada con el fin de limitar el crecimiento de las células. La estrategia semicontinua se usa normalmente en procedimientos bioindustriales para alcanzar una alta densidad celular en el biorreactor. La disolución de alimentación está habitualmente altamente concentrada para evitar la dilución del biorreactor. La adición controlada del nutriente afecta directamente a la tasa de crecimiento del cultivo y permite evitar que el metabolismo se desborde (formación de subproductos metabólicos) y la limitación de oxígeno (anaerobiosis). En la mayoría de los casos, el nutriente que limita el crecimiento es glucosa que se alimenta al cultivo como jarabe de glucosa altamente concentrado (por ejemplo, 600-850 g/l).

Pueden usarse diferentes estrategias para controlar el crecimiento en un proceso semicontinuo. Por ejemplo, cualquiera de tensión de oxígeno disuelto (DOT, pO_2), velocidad de captación de oxígeno (OUR), concentración de glucosa, concentración de lactato, pH y concentración amoniaco puede usarse para monitorizar y controlar el crecimiento del cultivo manteniendo ese parámetro constante. En un cultivo continuo, se añaden nutrientes y, normalmente, se extrae el medio con el fin de eliminar subproductos no deseados y mantener un estado estacionario. Métodos de cultivo continuo adecuado son cultivo discontinuo repetido, cultivo en quimiostato, turbidostato y perfusión.

Pueden cultivarse células CHO, por ejemplo, en un tanque con agitación o un tanque aéreo que está perfundido con un medio adecuado a una velocidad de perfusión de desde 2 hasta 10 intercambios de volumen por día y a una concentración de oxígeno de entre el 40% y el 60%, preferiblemente de aproximadamente el 50%. Además, las células pueden cultivarse por medio del método de quimiostato, usando el valor de pH preferido facilitado anteriormente, una concentración de oxígeno de entre el 10% y el 60% (preferiblemente de aproximadamente el 20%) y una velocidad de dilución D de 0,25 a 1,0, preferiblemente de aproximadamente 0,5.

En un cultivo discontinuo repetido, también conocido como subcultivo en serie, las células se sitúan en un medio de cultivo y se hacer crecer hasta una densidad celular deseada. Para evitar el inicio de una fase de declive y muerte celular, el cultivo se diluye con medio de crecimiento completo antes de que las células alcancen su concentración máxima. La cantidad y frecuencia de dilución varían ampliamente y dependen de las características de crecimiento de la línea celular y conveniencia del procedimiento de cultivo. El procedimiento puede repetirse tantas veces como se requiera y, a menos que se desechen las células y el medio en el subcultivo, el volumen de cultivo aumentará de manera gradual con cada dilución que se realice. El volumen creciente puede manejarse teniendo un reactor de tamaño suficiente para permitir diluciones dentro del recipiente o dividiendo el cultivo dividido en varios recipientes. La justificación de este tipo de cultivo es mantener las células en un estado de crecimiento exponencial. El subcultivo en serie se caracteriza porque el volumen de cultivo siempre aumenta de manera gradual, puede haber múltiples cosechan, las células continúan creciendo y el procedimiento puede continuar tanto como se desee.

En los métodos de quimiostato y turbidostato, el medio extraído contiene células. Por tanto, las células que permanecen en el recipiente de cultivo celular deben crecer para mantener un estado estacionario. En el método de quimiostato, la tasa de crecimiento se controla normalmente controlando la velocidad de dilución, es decir, la velocidad a la que se añade el medio nuevo. Las células se cultivan a una tasa de crecimiento submáxima, que se logra restringiendo la velocidad de dilución. La tasa de crecimiento es normalmente alta. En cambio, en el método de turbidostato, se establece la velocidad de dilución para permitir la velocidad de crecimiento máxima que las células pueden lograr a las condiciones de funcionamiento dadas, tales como pH y temperatura.

En un cultivo de perfusión, el medio extraído se empobrece en células porque la mayoría de las células se retienen en el recipiente de cultivo, por ejemplo, al retenerse sobre una membrana a través de la cual fluye el medio extraído. Sin embargo, normalmente una membrana de este tipo no retiene el 100% de las células, y por tanto se elimina una

proporción cuando se extrae el medio. Puede no ser crucial hacer funcionar cultivos de perfusión a tasas de crecimiento muy altas, puesto que la mayoría de las células se retienen en el recipiente de cultivo.

Cultivos continuos, particularmente cultivos discontinuos repetidos, de quimiostato y turbidostatos se hacen funcionar normalmente a tasas de crecimiento muy altas. Según la práctica común, es típico que se busque mantener las tasas de crecimientos al máximo, o cerca del máximo, en un esfuerzo por obtener una productividad volumétrica máxima. La productividad volumétrica se mide en unidades de cantidad o actividad de proteína por volumen de cultivo por intervalo de tiempo. Un crecimiento celular más alto se equipara con un mayor volumen de cultivo que está produciéndose al día y, por tanto, se considera de manera convencional que refleja una productividad volumétrica mayor. Los presentes inventores han encontrado de manera inesperada que, en determinadas realizaciones, la productividad volumétrica máxima no se alcanza a la tasa de crecimiento máxima de la célula. Tal como se describe en los ejemplos, se observó una tasa de crecimiento máxima de un clon de células CHO que expresaba furina en un cultivo de quimiostato a una temperatura de 36,5ºC, pero la productividad volumétrica máxima se observó a 35,1ºC. A pesar de los menores volúmenes de cosecha obtenidos, que surgen de una tasa de crecimiento menor a la temperatura menor, la cantidad de proteína recombinante producida fue mucho mayor, de manera que el cultivo a temperatura menor fue, en general, el más productivo.

De manera adecuada, en cualquiera de los aspectos primero, segundo o tercero de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una temperatura que se establece a una temperatura que es menor que la temperatura a la que se observa la tasa de crecimiento máxima en al menos 0,5ºC, preferiblemente al menos 1,0ºC. En esta realización, se prefiere que el cultivo sea un cultivo continuo, particularmente un cultivo discontinuo repetido, de quimiostato o turbidostato.

Se cultivan generalmente células de mamífero tales como CHO y BHK como cultivos en suspensión. Es decir, las células se suspenden en el medio, en vez de adherirse a un soporte sólido. Las células pueden alternativamente inmovilizarse sobre un portador, en particular sobre un microportador. Portadores porosos, tales como Cytoline®, Cytopore® o Cytodex®, pueden ser particularmente adecuados.

La densidad celular se monitoriza frecuentemente en cultivos celulares. En principio, una alta densidad celular se consideraría deseable puesto que, siempre que la productividad por célula se mantenga, esto conduciría a una mayor productividad por volumen de biorreactor. Sin embargo, aumentar la densidad celular puede ser en realidad perjudicial para las células, y se reduce la productividad por célula. Existe por tanto la necesidad de monitorizar la densidad celular. Hasta la fecha, en procedimientos de cultivo de células de mamífero, esto se ha realizado extrayendo muestras del cultivo y analizándolas bajo un microscopio o usando un dispositivo de recuento de células tal como el dispositivo CASY TT comercializado por Schärfe System GmbH, Reutlingen, Alemania. Ahora se ha encontrado que es ventajoso analizar la densidad celular por medio de una sonda adecuada introducida en el propio biorreactor (o en un bucle a través del cual el medio y las células en suspensión se hacen pasar y luego se devuelven al biorreactor). Tales sondas están disponibles comercialmente de Aber Instruments, por ejemplo el monitor de biomasa 220, 210 220 ó 230. Las células en el cultivo actúan como capacitadores diminutos bajo la influencia de un campo eléctrico, puesto que la membrana celular no conductora permite una acumulación de la carga. La capacitancia resultante puede medirse, es dependiente del tipo de célula y es directamente proporcional a la concentración de células viables. Una sonda de 10 a 25 mm de diámetro usa dos electrodos para aplicar un campo de radiofrecuencia a la biomasa y un segundo par de electrodos para medir la capacitancia resultante de las células polarizadas. El procesamiento electrónico de la señal resultante produce una salida que es una medición precisa de la concentración de células viables. El sistema no es sensible a células con membranas permeables, el medio, burbujas de aire y residuos.

Normalmente, la densidad celular es de desde $1,0x10^6$ hasta $5,0x10^6$ células/ml, de manera adecuada de $1,0x10^6$ a $3,5x10^6$ células/ml, de manera adecuada de $1,4x10^6$ a $2,8x10^6$ células/ml, preferiblemente de $1,6x10^6$ a $2,6x10^6$ células/ml, lo más preferiblemente de $1,8x10^6$ a $2,4x10^6$ células/ml. Aumentar la concentración de células hacia el extremo superior de los intervalos preferidos puede mejorar la productividad volumétrica. No obstante, se conciben intervalos de densidad celular que incluyen cualquiera de los valores puntuales anteriores como extremos inferiores o superiores de un intervalo.

El cultivo se lleva a cabo normalmente en un biorreactor, que es habitualmente un recipiente de acero inoxidable, vidrio o plástico de 1 (uno) a 10000 (diez mil) litros de capacidad, por ejemplo 5, 10, 50, 100, 1000, 2500, 5000 u 8000 litros. El recipiente es habitualmente rígido pero pueden usarse bolsas de plástico flexibles, particularmente para volúmenes más pequeños. Estas son generalmente del tipo de “un único uso”.

La proteína heteróloga o recombinante producida por el método de cualquiera de los tres primeros aspectos de la invención tal como se definen en las reivindicaciones es preferiblemente una proteína de la sangre. Por “proteína de la sangre” se incluye cualquier proteína que está o puede estar presente en la sangre de un humano o animal, incluyendo proteínas que se modifican por ingeniería genética para uso intravenoso. Las proteínas de la sangre adecuadas incluyen albúmina sérica, factores de la coagulación I, II, III, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII, furina, factor de von Willebrand, activador del plasminógeno tisular, interleucinas, interferones, metaloproteasas tales como ADAMTS proteasas (por ejemplo ADAMTS-13), inmunoglobulinas tales como IgG, IgM, IgA o IgE y fragmentos de

inmunoglobulina. Los fragmentos de anticuerpo o inmunoglobulina adecuados incluyen moléculas de tipo Fab (Better *et al* (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra *et al* (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv de cadena sencilla (ScFv) en las que los dominios de pareja de V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible (Bird *et al* (1988) Science 242, 423; Huston *et al* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de un único dominio (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward *et al* (1989) Nature 341, 544). Las inmunoglobulinas y sus fragmentos pueden "humanizarse". Es decir, pueden fusionarse dominios variables de origen de roedor con dominios constantes de origen humano de manera que el anticuerpo resultante conserva la especificidad antigénica del anticuerpo original de roedor (Morrison *et al* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

En una realización preferida, el cultivo celular se usa para producir el factor VIII, opcionalmente junto con el factor de von Willebrand (vWF). El vWF puede añadirse por separado al medio de cultivo y es preferiblemente recombinante. Alternativamente, el vWF puede producirse conjuntamente incluyendo células que secretan vWF en el cultivo, así como las células que secretan FVIII. Preferiblemente, sin embargo, el FVIII y vWF se expresan conjuntamente, es decir, cada célula secreta tanto FVIII como vWF. Puede obtenerse vWF recombinante como en Schlokat, *et al.* (1995), "Large Scale Production of Recombinant von Willebrand Factor", Thrombosis and Haemostasis 78, 1160 o el documento US 6 114 146 (Baxter AG). Esta última patente también divulga células que pueden usarse para producir conjurantemente vWF con células que secretan FVIII. Las células que expresan conjuntamente ambas proteínas se divulgan en el documento US 5 250 421 (Genetics Institute) y Kaufman *et al* (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1233-1242.

El término factor VIII se usa en el presente documento para indicar cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que tiene actividad de factor de coagulación VIII. El factor VIII activado funciona como cofactor en la conversión del factor X en factor Xa por el factor IXa activado en presencia de fosfolípidos e iones de calcio. De manera conveniente, la cantidad de factor VIII activo puede estimarse a partir del grado en el que promueve la conversión del factor X en el factor Xa en un ensayo adecuado. En un ensayo típico, el factor Xa hidroliza un sustrato cromogénico específico, liberando así un cromóforo, cuya cantidad de se determina de manera espectrofotométrica. Los kits de ensayo disponibles comercialmente incluyen el kit de ensayo cromogénico del factor VIII (Dade Behring, Suiza; documento US 6.100.050); y el kit de factor VIII Coatest (Chromogenix, Suecia). La concentración del factor VIII en humanos se define como 1 UI/ml de sangre. El kit de factor VIII Coatest puede determinar una actividad de FVIII equivalente a al menos 0,01 UI/ml de sangre. Para considerarse como factor VIII tal como se definió anteriormente, un polipéptido o complejo de polipéptidos debe tener al menos el 1% de la actividad del factor VIII nativo de manera que, cuando está presente en la sangre en la misma concentración nanomolar que el factor VIII nativo, su actividad es detectable por el ensayo del factor VIII Coatest.

Un FVIII adecuado para producción mediante el método de la invención es FVII nativo de longitud completa. Puede producirse FVIII porcino según la invención pero el FVIII es más preferiblemente humano. Como alternativa al FVIII nativo, pueden producirse variantes y análogos. Muchos se conocen en esta técnica, por ejemplo las variantes y derivados de deleción descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 5 422 260, 4 749 780, 4 868 112, 4 877 614 y 5 171 844. El término "derivado de deleción de factor VIII recombinante" se define como una o más cadenas de polipéptido que tienen actividad de factor VIII, derivadas de polipéptido de factor VIII de longitud completa delecionando uno o más aminoácidos. Preferiblemente, dicho derivado de deleción está desprovisto de la mayoría del dominio B, pero conserva partes de las secuencias aminoterminales y carboxiterminales del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario para dar dos cadenas de polipéptido. La producción de un derivado de deleción de factor VIII de este tipo, identificado "r-VIII SQ", se describe en el documento WO 91/09122. El término "r-VIII SQ" se define como una cadena de polipéptido derivada de factor VIII de longitud completa y que carece de los aminoácidos 743 a 1636. En el documento US 6 358 703 se describen variantes de FVIII adicionales que carecen de todo o parte del dominio B.

Se divulgan vectores adecuados para transformar células CHO y 293S en el documento US 5 854 021. Pueden prepararse células BHK que expresan FVIII tal como se divulga en Wood *et al* (1984) Nature 312, 330-337 u obtenerse de la ATCC como cultivo CRL-8544. Se describen células CHO que expresan variantes de FVIII con dominio B delecionado en Lind *et al* (1995) Eur. J. Biochem. 232, 19-27 y en el documento US 5 661 008. Tres tipos de célula se este tipo se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen como DSM 6415, DSM 6417 y DSM 6416.

Cuando FVIII y vWF se producen conjuntamente, el complejo entre ellos puede purificarse centrifugando el medio para eliminar las células y luego exponiendo el líquido resultante a un soporte sólido inmovilizado que contiene un anticuerpo para o bien FVIII o bien vWF, o un péptido que se unirá específicamente a FVIII o vWF, en condiciones que no provocarán que el complejo se disocie. Se enseñan métodos adecuados en los documentos US 6 307 032 (Baxter AG) y US 5 200 510 (ZymoGenetics).

El FVIII (opcionalmente en complejo con vWF) puede entonces formularse y usarse de modos conocidos. Por ejemplo, FVIII, que se ha producido en un cultivo libre de proteínas animales, se formula preferiblemente en una composición libre de proteínas, tal como se divulga, por ejemplo, en los documentos US 6 586 573 (Baxter International), WO 94/07510 o US 6 599 724, y se usa para tratar pacientes con hemofilia A.

Cuando se usa el método de la invención tal como se define en las reivindicaciones para producir FVIII, se prefiere

que el sobrenadante de cultivo celular se mantenga a una temperatura que se establece a 36±0,9ºC, preferiblemente 36±0,5ºC, más preferiblemente 36±0,2ºC y lo más preferiblemente 36ºC y/o el pH se establezca a 7,20±0,05, preferiblemente 7,20±0,03, más preferiblemente 7,20±0,01, lo más preferiblemente 7,20; y/o el sobrenadante de cultivo celular tenga una concentración de CO_2 disuelto del 1 al 10%, preferiblemente del 4,0 al 9,0%, más preferiblemente del 5,5 al 8,5%. Preferiblemente, al menos dos de estos parámetros se encuentran dentro de los límites preferidos, concretamente temperatura y pH, temperatura y dCO_2, o pH y dCO_2. Lo más preferiblemente, los tres parámetros se establecen dentro de los límites preferidos.

Tal como se muestra en los ejemplos, es ventajoso incluir cobre en el sobrenadante de cultivo celular cuando se usa la invención para producir FVIII. Normalmente, se cultivan células en un sobrenadante de cultivo celular que comprende 4 ppb de Cu^{2+}. Ventajosamente, la concentración de la concentración de Cu^{2+} en el sobrenadante de cultivo celular es de al menos 5 ppb, y preferiblemente de al menos 7, 10, 15 ó 25 ppb.

En una realización alternativa preferida, el cultivo celular se usa para producir ADAMTS-13.

ADAMTS-13, también conocida como proteasa de escisión del factor de von Willebrand (VWF-cp) es un elemento de la familia de metaloproteasas. Tiene la capacidad de metabolizar grandes multímeros de VWF para dar formas más pequeñas, escindiendo el enlace peptídico entre los residuos Tyr-842 y Met-843 de VWF. Esta metaloproteasa se activa por Ca^2_/Ba^2, y no se inhibe por inhibidores de serina o cisteína proteasas. La degradación de factor de von Willebrand (VWF) deficiente se ha asociado con púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). En la TTP hereditaria, ADAMTS-13 está ausente o es funcionalmente defectuosa, mientras que en la forma adquirida, no familiar de TTP, se encuentra transitoriamente en la mayoría de los pacientes un autoanticuerpo que inhibe la actividad de ADAMTS-13.

La clonación y expresión del gen de ADAMTS-13 humano se describe en Plaimauer *et al*, 2002, Blood. 15; 100(10):3626-32. La clonación y expresión del gen de ADAMTS-13 humano, junto con la secuencia completa del ADNc, también se divulgan en el documento US 2005/0266528 A1 (Laemmle *et al*). Una ADAMTS-13 para la producción mediante el método de la invención es ADAMTS-13 de longitud completa, nativa, preferiblemente ADAMTS-13 humana. Como alternativa a FVIII nativa, pueden producirse variantes y análogos.

El término ADAMTS-13 se usa en el presente documento para indicar cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que tenga actividad de ADAMTS-13, particularmente la capacidad de escindir el enlace peptídico entre los residuos Tyr-842 y Met-843 de VWF. De manera conveniente, la cantidad de ADAMTS-13 activa puede determinarse mediante ensayos funcionales, tales como ensayos funcionales que emplean péptidos de factor de von Willebrand modificados como sustrato para ADAMTS-13 (Tripodi *et al* J Thromb Haemost. Septiembre de 2008; 6(9):1534-41). Un método preferido de determinación de la actividad de ADAMTS13 r-hu se divulga en Gerritsen *et al*. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Thromb Haemost 1999; 82:1386-1389. En este ensayo, 1 U se corresponde al nivel de actividad de ADAMTS-13 en plasma humano normal reunido. Para considerarse como ADAMTS-13 tal como se definió anteriormente, un polipéptido o complejo de polipéptidos debe tener al menos el 1% de la actividad de ADAMTS-13 nativa. La cantidad de ADAMTS-13 también puede determinarse mediante la medición de antígeno de ADAMTS-13 usando, por ejemplo, el método de ELISA divulgado en Rieger *et al*, 2006, Thromb Haemost. 2006 95(2):212-20.

Puede prepararse ADAMTS-13 recombinante proteolíticamente activa mediante expresión en cultivos de células de mamíferos, tal como se describe en Plaimauer *et al*, 2002, citado anteriormente y en el documento US 2005/0266528 A1. Se divulgan métodos de cultivo recombinante de células que expresan ADAMTS-13 en Plaimauer B, Scheiflinger F.Semin Hematol. Enero de 2004; 41(1):24-33. Los tipos de células preferidos para la expresión de ADAMTS-13 incluyen células HEK-293 y células CHO.

El documento US 2005/0266528 A1 y Zheng *et al*, 2001, Blood, 98:1662-1666 divulgan métodos de purificación de ADAMTS-13. Puede formularse ADAMTS-13 purificada según métodos convencionales y usarse terapéuticamente, por ejemplo, para tratar TTP.

Cuando el método de la invención tal como se define en las reivindicaciones se usa para producir ADAMTS-13, se prefiere que el sobrenadante de cultivo celular se mantenga a una temperatura que se establece a 36,0±0,9ºC, preferiblemente 36,0±0,5ºC, más preferiblemente 36,0±0,2ºC y lo más preferiblemente 36,0ºC y/o el pH se establezca a 7,15±0,05, preferiblemente 7,15±0,03, más preferiblemente 7,15±0,01, lo más preferiblemente 7,15; y/o el sobrenadante de cultivo celular tenga un concentración de CO_2 disuelto del 1 al 10%, preferiblemente del 4,0 al 9,0%, más preferiblemente del 5,5 al 8,5%. Preferiblemente, al menos dos de estos parámetros están dentro de los límites preferidos, concretamente temperatura y pH, temperatura dCO_2, o pH y dCO_2. Lo más preferiblemente, los tres parámetros se establecen dentro de los límites preferidos.

En una realización alternativa preferida, el cultivo celular se usa para producir furina.

La furina, también denominada PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos apareados), pertenece al grupo de las serina proteasas de tipo subtilisina, que desempeñan un papel importante en la escisión de proproteínas, especialmente en síntesis secretora (Van de Ven *et al*., Crit. Rev. Oncogen., 4:115-136, 1993). Es una serina endoproteasa dependiente de calcio dispuesta estructuralmente en varios dominios, concretamente un péptido señal, propéptido, dominio catalítico, dominio homo-B o P, el dominio rico en cisteína ubicado en el extremo C-terminal, dominio transmembrana y cola citoplasmática. El sitio de escisión de proteasas comprende una secuencia de reconocimiento que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Arg-X-Lys/Arg-Arg. La proteasa furina escinde proproteínas específicamente tras esta secuencia consenso (Hosaka *et al*., 1991, J. Biol. Chem. 266:12127-12130).

Se incorpora furina intacta en el sistema de membranas del aparato de Golgi y allí es funcionalmente activa (Bresnahan *et al*, J Cell Biol. 1990; 111:2851-9). Tras el tránsito del precursor de furina recién sintetizado desde el retículo endoplasmático hasta el compartimento de Golgi, el propéptido se elimina de manera autocatalítica en un acontecimiento de procesamiento en dos etapas (Anderson *et al*, EMBO J. 1997; 16: 1508-18). La furina también experimenta ciclos entre la red de trans-Golgi y la superficie celular por medio de vesículas endosomales, procesando de ese modo tanto proteínas precursoras durante su transporte a través de la ruta secretora constitutiva así como moléculas que entran en la ruta endocítica. La distribución celular de furina a los compartimentos de procesamiento está dirigida por características estructurales definidas dentro de su cola citoplasmática (Teuchert *et al*, J Biol Chem. 1999; 274:8199-07).

Puesto que una sobreexpresión de la furina proteasa nativa afecta negativamente al crecimiento de cultivos celulares en crecimiento continuo, se han buscado soluciones para reducir la influencia tóxica de la furina sobre las células. Se ha encontrado que los dominios C-terminales son prescindibles para la actividad funcional de la furina y pudo detectarse una forma truncada de la furina nativa sobreexpresada de 75-80 kD en el sobrenadante celular como proteína secretada (Wise *et al*, PNAS. 1990; 87:9378-82). Esta furina truncada secretada de manera natural también se conoce como “furina desprendida” (Vidricaire *et al*, Biochem Biophys Res Comm. 1993; 195:1011-8; Plaimauer *et al*, Biochem J. 2001; 354:689-95) y se escinde de manera N-terminal de la parte transmembrana (Vey *et al*, J Cell Biol. 1994; 127: 1829-42).

Se han descrito proteínas de furina truncadas mediante ingeniería genética, en las que la parte codificante de los dominios transmembrana y citoplasmático se han delecionado, por ejemplo para los aminoácidos Δ714-794 (Leduc *et al*, J Biol Chem. 1992; 267: 14304-8; Molloy *et al*, J Biol Chem. 1992; 267:16396-402) y para los aminoácidos Δ716-794 (“Sol-PACE”, Wasley *et al*., J Biol Chem. 1993; 268:8458-65; Rehemtulla y Kaufman, Blood. 1992; 79:2349-55) y para los aminoácidos Δ705-794 (Hatsuzawa *et al*, J Biol Chem. 1992; 267:16094-9). También se han descrito mutantes de furina que comprenden adicionalmente una deleción de la región rica en cisteína (Hatsuzawa *et al*, J Biochem. 1992; 101:296-301; Creemers *et al*, J Biol Chem. 1993; 268:21826-34).

El documento WO 2008/141824 (Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.) divulga una furina humana truncada que carece de los aminoácidos 578 a 794, es decir Δ578-794.

El término “furina” se usa en el presente documento para indicar cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que tiene actividad proteolítica de furina.

La evaluación de la actividad proteolítica de una furina, furina truncada o derivado de furina puede realizarse mediante cualquier prueba adecuada, por ejemplo usando sustratos fluorogénicos que están compuestos por un sitio de escisión dibásico para el que la furina es específica (Schlokat *et al*, Biotechnol Appl Biochem. 1996; 24:257-67). Con dicho ensayo, se define 1 unidad como la cantidad de furina que liberará 1 pmol de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) del sustrato fluorogénico Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC en 1 minuto a 30ºC. El límite de cuantificación para esta prueba es normalmente de 0,625 U/ml. Alternativamente, la actividad proteolítica también puede medirse incubando furina con proproteínas, por ejemplo pro-rvWF, durante un tiempo suficiente. El grado de procesamiento de pro-rvWF puede analizarse por ejemplo mediante inmunotransferencia de tipo Western. La cantidad de antígeno de furina puede medirse mediante una prueba de ELISA. Una prueba de ELISA adecuada es la DuoSet de furina humana disponible de R&D Systems, MN (n.º de cat. DY1503) en la que se usa anticuerpo de ratón anti-furina humana como anticuerpo de captura, y se usa anticuerpo de cabra biotinilado anti-furina humana como anticuerpo de detección.

Una furina adecuada para la producción mediante el método de la invención es furina nativa, de longitud completa, preferiblemente furina humana. Como alternativa a la furina nativa, pueden producirse variantes y análogos, incluyendo los descritos anteriormente.

En el documento WO 2008/141824 se describen vectores adecuados para transformar células de mamífero, particularmente células CHO, con furina o variantes de furina (Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.), junto con métodos para purificar la furina así producida. El documento WO 91/06314 (Holland Biotechnology) describe vectores de expresión de furina, un método de expresión de furina en células de mamífero, particularmente células COS-1, y la purificación de furina producida de manera recombinante. El documento WO 92/09698 (Genetics Institute y Chiron Corp) describe la expresión de furina en células CHO, o bien sola, o bien en combinación con vWF

o factor IX.

Se procesa pro-rVWF para dar su forma madura durante el cultivo celular mediante furina producida de manera endógena, que se expresa a niveles relativamente bajos en muchos tipos de células (Wise *et al*, 1990, PNAS 87:9378-9382). El procesamiento de pro-rVWF puede realizarse más eficazmente mediante coexpresión de furina heteróloga con el pro-rVWF. Alternativamente, el documento WO 2008/141824 sugiere que una furina purificada puede ser adecuada para su uso como reactivo para promover el procesamiento de rVWF.

Cuando el método de la invención tal como se define en las reivindicaciones se usa para producir furina, se prefiere que el sobrenadante de cultivo celular se mantenga a una temperatura que se establece a 35,1±0,9ºC, preferiblemente 35,1±0,5ºC, más preferiblemente 35,1±0,2ºC y lo más preferiblemente 35,1ºC y/o el pH se establezca a 7,15±0,05, preferiblemente 7,15±0,03, más preferiblemente 7,15±0,01, lo más preferiblemente 7,15; y/o el sobrenadante de cultivo celular tenga una concentración de CO_2 disuelto del 1 al 10%, preferiblemente del 4,0 al 9,0%, más preferiblemente del 5,5 al 8,5%. Preferiblemente, al menos dos de estos parámetros están dentro de los límites preferidos, concretamente temperatura y pH, temperatura y dCO_2, o pH y dCO_2. Lo más preferiblemente, los tres parámetros se establecen dentro de los límites preferidos.

En una realización alternativa preferida, el cultivo celular se usa para producir factor VII.

"Polipéptido de factor VII" abarca factor VII de tipo natural (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos divulgada en la patente estadounidense n.º 4.784.950), así como variantes de factor VII que presentan una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada en relación con factor VII de tipo natural, y variantes de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada o reducida en relación con factor VII de tipo natural. El término "factor VII" pretende abarcar polipéptidos de factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como los que se han procesado proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden designarse factor VIIa. Normalmente, el factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para producir factor VIIa. El término "polipéptido de factor VII" también abarca polipéptidos, incluyendo variantes, en los que la actividad biológica del factor VIIa se ha modificado sustancialmente o reducido algo en relación con la actividad de factor VIIa de tipo natural. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, factor VII o factor VIIa en el que se han introducido alternaciones específicas en la secuencia de aminoácidos que modifican o alteran la bioactividad del polipéptido.

La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación sanguínea se deriva de su capacidad para (i) unirse a 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). La actividad biológica de polipéptidos de factor VII ("actividad biológica de factor VII") 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 o el documento WO 92/15686. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación en relación con una muestra control y se convierte en "unidades de factor VII" mediante comparación con un patrón de suero humano reunido que contiene una actividad de factor VII de 1 unidad/ml. Alternativamente, la actividad biológica de factor VIIa puede cuantificarse (i) midiendo la capacidad del factor VIIa (o el polipéptido de factor VII) para producir factor X activado (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) midiendo la hidrólisis de factor X en un sistema acuoso; (iii) midiendo la unión física de factor VIIa (o el polipéptido de factor VII) a TF usando un instrumento basado en resonancia de plasmón superficial (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997); (iv) midiendo la hidrólisis *in vitro* de un sustrato sintético mediante factor VIIa (o un polipéptido de factor VII); o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema *in vitro* independiente de TF. Alternativamente, puede determinarse el antígeno de FVII mediante ELISA. Un ELISA adecuado es el kit de ELISA de factor VII humano (FVII) AssayMax disponible de Assay Pro (St Charles, MO), n.º de cat. EF1007-1, que usa un anticuerpo monoclonal anti-FVII humano como anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal biotinilado anti-FVII humano como anticuerpo de detección.

Un ensayo de proteólisis *in vitro* preferido para factor VIIa nativo (de tipo natural) y/o variante de factor VIIa se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca), tal como se describe en el documento US 2007/0219135 (Novo Nordisk HealthCare A/G). Se incuban durante 15 min factor VIIa (10 nM) y factor X (0,8 μM) en 100 μl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 5 mM y albúmina sérica bovina 1 mg/ml. Entonces se detiene la escisión de factor X mediante la adición de 50 μl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM y albúmina sérica bovina 1 mg/ml. La cantidad de factor Xa generado se mide mediante adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final de 0,5 mM. Se mide la absorbancia a 405 nm de manera continua en una placa SpectraMax™ 340. La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, tras la resta de la absorbancia de un pocillo de blanco que no contiene FVIIa, puede usarse para calcular la razón entre las actividades proteolíticas de factor VIIa de tipo natural y variante:

Razón = ($A_{405\ nm}$ factor VII variante)/($A_{405\ nm}$ factor VIIa de tipo natural)

En una variación de este ensayo, se determina FVII. Se incluye una tromboplastina. FVII en la muestra forma un complejo con iones Ca^{2+} y factor tisular que genera pequeñas cantidades de FXa. El FXa activa FVII para dar FVIIa.

Un ensayo de actividad de FVII disponible comercialmente es el kit de reactivo de FVII HEMOCLOT, disponible de Aniara (Mason, OH), n.º de cat. ACK081K en el que se mide la coagulación se desencadenada mediante una tromboplastina cálcica.

Las variantes de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada en relación con el factor VIIa de tipo natural abarcan las 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 de factor VIIa que se ha producido en el mismo tipo de célula, 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 de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida en relación con el factor VIIa de tipo natural son las 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 de factor VIIa de tipo natural que se ha producido en el mismo tipo de célula 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 de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada en relación con factor VII de tipo natural incluyen, sin limitación, variantes de factor VII que presentan actividad proteolítica de factor X independiente de TF y las que se unen a TF pero no escinden el factor X. Las variantes de factor VII, ya presenten una bioactividad sustancialmente igual o mejor que el factor VII de tipo natural, o, alternativamente, presenten una bioactividad sustancialmente modificada o reducida en relación con el factor VII de tipo natural, incluyen, sin limitación, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de factor VII de tipo natural por inserción, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos.

Los ejemplos no limitativos de variantes de factor VII que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que el factor VII de tipo natural incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al*., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de factor VIIa que presentan estabilidad proteolítica aumentada tal como se divulga en la patente estadounidense n.º 5.580.560; factor VIIa que se ha 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 de factor VIIa (Kornfelt *et al*., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de factor VII tal como se divulga en el documento PCT/DK02/00189; y variantes de factor VII que presentan estabilidad proteolítica aumentada tal como se divulga en el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de factor VII que tienen un dominio Gla modificado y que presentan una unión a la membrana potenciada tal como se divulga en el documento WO 99/20767 (University of Minnesota); y variantes de factor VII tal como se divulga en el documento WO 01/58935 (Maxygen ApS).

Los ejemplos no limitativos de variantes de factor VII que tienen una actividad biológica aumentada en comparación en comparación con factor VIIa de tipo natural incluyen variantes de factor VII tal como se divulga en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de factor VIIa con actividad potenciada tal como se divulga en el documento JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.). Los ejemplos no limitativos de variantes de factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida o modificada en relación con el factor VII de tipo natural incluyen RI 52E-FVIIa (Wild-goose *et al*., Biochem 29:3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama *et al*, J. Biol. Chem. 270:66-72, 1995), FFR-FVIIa (Hoist *et al*, Eur. J. Vase. Endovasc. Surg. 15:515-520, 1998) y factor VIIa que carece del dominio Gla, (Nicolaisen *et al*, FEBS Letts. 317:245-249, 1993).

Tras la producción de FVII, el polipéptido puede purificarse del medio. La purificación de polipéptidos de factor VII puede implicar, por ejemplo, cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpo anti-factor VII (véase, 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 factor Xlla u otras proteasas que tienen especificidad de tipo tripsina, tales como, por ejemplo, factor IXa, calicreína, factor Xa y trombina. Véase, 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.

El factor VII o factor VII activado puede formularse y usarse de modos conocidos. Por ejemplo, puede usarse en el tratamiento de hemorragias en hemofílicos.

Cuando el método de la invención tal como se define en las reivindicaciones se usa para producir factor VII, se prefiere que el sobrenadante de cultivo celular se mantenga a una temperatura que se establece a 36,5±0,9ºC, preferiblemente 36,5±0,5ºC, más preferiblemente 36,5±0,2ºC y lo más preferiblemente 36,5ºC y/o el pH se establezca a 7,20±0,05, preferiblemente 7,20±0,03, más preferiblemente 7,29±0,01, lo más preferiblemente 7,29; y/o el sobrenadante de cultivo celular tenga una concentración de CO_2 disuelto del 1 al 10%, preferiblemente del 4,0 al 9,0%, más preferiblemente del 5,5 al 8,5%. Preferiblemente, al menos dos de estos parámetros están dentro de los límites preferidos, concretamente temperatura y pH, temperatura y dCO_2, o pH y dCO_2. Lo más preferiblemente, los tres parámetros se establecen dentro de los límites preferidos.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación en la misma.

Ejemplo 1: Cultivo celular básico

Producción de FVIII

Se establecieron cultivos típicos en biorreactores, usando un subclón de la línea de células CHO 10A1C6 transformada para que coexpresara factor VIII y factor de von Willebrand descrito en Kaufman *et al* (1989) Mol. Cell. Biol. 9:1233-1242 y el documento US 5.250.421. Se obtuvo el subclón particular mediante adaptación a un medio convencional que no contiene productos derivados de animales, y subclonación en una microplaca.

El medio de cultivo convencional es:

DMEM/F12 de Ham 50/50	11,76 g/kg
al que se le añadieron:	
L-glutamina	0,6 g/kg
Etanolamina	1,53 mg/kg
Synperonic F68	0,25 g/kg
$NaHCO_3$	2 g/kg
Peptona de soja	4 g/kg
$CuSO_4.5H_2O$	17,02 mg/kg

El medio DMEM/F12 de Ham 50/50 basal contiene Cu^{2+} 1,3 mg/kg suficiente para que el medio completo contenga 4,3 ppb de Cu^{2+}.

Producción de ADAMTS-13

Se transfectaron células CHO DUKX-B11 usando el método de coprecipitación con fosfato de calcio, para introducir el gen de ADAMTS-13. Se cultivaron las células en condiciones de selección con neomicina y se seleccionaron tras el tratamiento con metotrexato y G418. Tras la adaptación libre de suero, se subclonaron las células y se eligió el subclón 640-2 como clon de producción.

El medio de cultivo convencional es un medio libre de suero, de insulina y de oligopéptidos basado en el medio divulgado en el documento US 2007/0212770 (Grillberger *et al;* Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.).

Producción de furina

Se transfectaron células CHO DUKX-B11 usando el método de coprecipitación con fosfato de calcio, para introducir el gen de furina. Se seleccionaron las células con medio DHFR sin hipoxantina, timidina y glicina. Se identificó el clon de producción 488-3 mediante subclonación y selección en medio que contenía metotrexato 100 nM, seguido por adaptación libre de suero.

El medio de cultivo convencional es un medio libre de suero, de insulina y de oligopéptidos basado en el medio divulgado en el documento US 2007/0212770 (Grillberger *et al;* Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.).

Producción de FVII

Se transfectaron células CHO DUKX-B11 con un vector bicistrónico para permitir la coexpression de FVII y VKORC (complejo de vitamina K epóxido reductasa). La expresión génica está dirigida por el promotor de CMV, y un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) está ubicado entre el gen de FVII y el gen de VKORC. Se transfectaron las células usando el método de precipitación con fosfato de calcio. El medio de selección contenía higromicina B 200 μg/ml. Se subclonaron las células en condiciones libres de suero y se eligió el subclón de alta expresión 1E9 como clon de producción. Se seleccionó 1E9 ya que tenía propiedades ventajosas con respecto al crecimiento, la productividad y la estabilidad en condiciones de cultivo continuo. Se evaluó la estabilidad durante un periodo de dos meses en modo de quimiostato.

El medio de cultivo convencional se basa en el medio de cultivo divulgado en el documento US 6.936.441 (Baxter AG), y contiene, entre otros, peptona de soja 2,5 g/l e insulina 5 mg/l (Nucellin®; Eli Lilly o Novolin®, Novo Nordisk).

Procedimientos convencionales usados para la producción de FVIII

Cultivo continuo de 5 l

Se preacondiciona el medio durante varias horas en un incubador de CO_2 (el 5-15% de CO_2) a 37ºC. Para establecer el cultivo, se descongela al menos un vial de 1 ml (10^7 células CHO/ml) y se diluyen las células en 60 ml

de medio preacondicionado en frascos Roux (200 ml) y se cultivan en el incubador de CO_2 a 37ºC. Tras aproximadamente 3 días, se añade el cultivo de 60 ml a 140 ml de medio nuevo en 1 frasco rotativo (1,8 l). Se burbujea el frasco rotativo con el 15% de CO_2 y se cultiva a 37ºC con rotación. Tras dos días, se dividen las células 1/3 y se cultivan en 2 frascos rotativos en medio nuevo (200 ml de medio + 100 ml de cultivo = 300 ml por frasco rotativo). Tras dos o tres días adicionales, se dividen las células de nuevo 1/3 y se cultivan en un total de 6 frascos rotativos en medio nuevo tal como se describió anteriormente. Una vez que se alcanza la densidad celular requerida de aproximadamente 1 x 10^6 células/ml, se inocula el inóculo de 1800 ml en 3,2 l de medio que se había preacondicionado tal como se describió anteriormente, y se cultiva en el biorreactor de 5 l. En condiciones convencionales, se hace funcionar el biorreactor de 5 l a pH 7,2, una densidad celular de 1,4 x 10^6 células/ml y una temperatura de 37ºC. En condiciones convencionales, se burbujea el cultivo con O_2 que tiene un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 0,25 VVH (volumen de O_2 por volumen de cultivo por hora).

Acumulación de inóculo en el biorreactor de 40 l

Se obtiene un conjunto de inóculo esencialmente tal como se describió anteriormente en relación con el cultivo continuo de 5 l. Sin embargo, el conjunto es de aproximadamente 5 l, y se obtiene a partir de 18 en vez de 6 frascos rotativos. Se limpia el biorreactor BR-40 y se esteriliza antes de la operación, y se transfieren aproximadamente 8 l de medio al BR-40 antes de la inoculación. Se transfiere el conjunto de inóculo de aproximadamente 5 l desde el tanque de reunión hasta el biorreactor por medio de una línea de transferencia hasta alcanzar un volumen de cultivo total de aproximadamente 13 l. Una vez que la densidad celular alcanza ≥ 9x10^5 células/ml, se diluye el cultivo (1:3) con medio. Tras de 1 a 3 días más, la concentración celular alcanza de nuevo ≥ 9x10^5 células/ml, y se lleva a cabo la transferencia del inóculo al biorreactor de 320 l.

Expansión en el biorreactor de 320 l

Se limpia el biorreactor BR-320 y se esteriliza antes de la operación, y se transfieren aproximadamente 80 l de medio al BR-320 antes de la inoculación. Se transfiere el inóculo de aproximadamente 40 l desde el biorreactor BR-40 hasta el biorreactor BR-320 por medio de una línea de transferencia hasta alcanzar un volumen de cultivo inicial de aproximadamente 120 l. Una vez que la densidad celular alcanza ≥ 9x10^5 células/ml, se diluye el cultivo (1:3) con medio. Tras de 3 a 6 días (tiempo total), la concentración celular alcanza de nuevo ≥ 9x10^5 células/ml, y se lleva a cabo la transferencia del inóculo al biorreactor de 2500 l.

Biorreactor de 2500 l

Acumulación

El inóculo de aproximadamente 320 l se transfiere desde el biorreactor BR-320 hasta el BR1 por medio de una línea de transferencia que ya contenía aproximadamente 630 l de medio hasta alcanzar un volumen de cultivo inicial de aproximadamente 950 l. Una vez que la densidad celular alcanza ≥ 9x10^5 células/ml, se diluye el cultivo (~1:3) con medio hasta un volumen final de aproximadamente 2500 l. Tras de 4 a 7 días (tiempo total), la concentración celular alcanza de nuevo ≥ 9x10^5 células/ml, y se transfieren aproximadamente 1150 l del inóculo desde el biorreactor BR1 hasta el BR2 que contiene aproximadamente 1350 l de medio. Tras la transferencia, se añaden aproximadamente 1150 l de medio al biorreactor BR1, hasta alcanzar un volumen de cultivo final de aproximadamente 2500 l.

Quimiostato

El modo de cultivo en “quimiostato” se inicia en cuanto la concentración celular en cada biorreactor alcanza ≥ 1,2x10^6 células/ml. Se añaden aproximadamente 1250 l de medio al día en un modo continuo a cada biorreactor. La concentración celular es de entre 9x10^5 - 1,6x10^6 células/ml en cada biorreactor de 2500 l. Se almacenan múltiples cosechas de aproximadamente 1250 l/día/biorreactor en bolsas estériles a 2 - 8ºC. El cultivo se mantiene durante aproximadamente 50-57 días en el modo de quimiostato. En condiciones convencionales, se establece el pH a 7,2, se establece la temperatura a 37ºC y se burbujea el cultivo con O_2 que tiene un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 0,02 VVH (volumen de O_2 por volumen de cultivo por hora).

También pueden aplicarse métodos de cultivo similares al cultivo de células CHO que expresan ADAMTS-13, furina o FVII.

Ejemplo 2: Efectos del cambio de diversos parámetros sobre la productividad de FVIII

Se determinó la productividad de FVIII del clon de células CHO que expresaba FVIII y vWF descrito en el ejemplo 1 en diversas condiciones de cultivo.

En experimentos separados, se hicieron variar el pH, la densidad celular y la temperatura en cultivo continuo a escala de 5 l. En cada caso, el experimento control usó pH 7,1, una densidad celular de 1,4 x10^6 células/ml y 37ºC.

Cuando se aumentó la densidad celular, la productividad volumétrica de FVIII (UI por litro por día), en relación con el valor para una densidad celular de 1,2 x10^6 células/ml, aumentó tal como sigue:

Densidad celular (x10^6 células/ml)	Porcentaje de aumento de la densidad celular	Aumento de la productividad (%)
1,2	-	-
1,4	17	43
1,6	33	51
1,8	50	65
2,0	67	73
2,2	83	74
2,4	100	76
2,6	117	49

Por tanto, pudo lograrse un aumento sustancial en la productividad aumentando la densidad celular. Esto no podría haberse predicho, puesto que el aumento de la densidad celular puede reducir la productividad por célula. Además, a determinadas densidades celulares, se encontró que el aumento en la productividad era mayor que el aumento en la densidad celular, lo que es incluso más sorprendente.

Se aumentó el pH hasta 7,2 alterando los parámetros de burbujeo. En el recipiente de control a pH 7,1, se burbujeó el cultivo con O_2 que tenía un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 0,25 VVH (volumen de O_2 por volumen de cultivo por hora). En el recipiente de prueba a pH 7,2, se burbujeó el cultivo con aire que tenía un tamaño de burbuja de 10 μm a una velocidad de 1,25 VVH (volumen de aire por volumen de cultivo por hora). Al aumentar el pH desde 7,1 hasta 7,2, la productividad pudo aumentarse en aproximadamente el 16%.

Al disminuir la temperatura desde 37ºC hasta 36ºC, la productividad aumentó en aproximadamente el 22%.

Ejemplo 3: Influencia de la densidad celular y la concentración de cobre sobre la productividad de FVIII

Se determinó la productividad de FVIII del clon de células CHO que expresaba FVIII y vWF descrito en el ejemplo 1 en diversas condiciones de cultivo.

Se utilizó un cultivo control a pH 7,1, 37ºC, 4 ppb de Cu^{2+} y una densidad celular de 1,4x10^6 células/ml.

Se ejecutaron cultivos comparativos a pH 7,2 y 36ºC. En un cultivo se aumentó la densidad celular hasta 1,6x10^6 células/ml y en otro se aumentó hasta 2,0x10^6 células/ml. En un tercer cultivo, la densidad celular era de 2,0x10^6 células/ml y se aumentó la concentración de cobre desde 4 ppb hasta 6 ppb.

Resultados: Al reducir la temperatura, aumentar el pH y aumentar la densidad celular hasta 1,6 x10^6 células/ml (un aumento del 14%), la productividad de FVIII aumentó en un 41-50%. Un aumento adicional de la densidad celular hasta 2,0x10^6 células/ml (43%) dio un aumento de la productividad (en comparación con el cultivo control) del 39-77%. Cuando el cobre en un cultivo de 2,0x10^6 células/ml se aumentó hasta 6 ppb, la productividad (en comparación con el cultivo de control) aumentó en un 48-98%.

Por tanto, al elevar el pH ligeramente, disminuir la temperatura ligeramente, aumentar la densidad celular en sólo un 43% y aumentar la concentración de cobre en un 50%, la productividad de FVIII puede casi duplicarse.

Ejemplo 4: Influencia de la densidad celular y la concentración de cobre sobre la productividad de vWF

Se repitió el ejemplo 3 pero se midió la productividad volumétrica de vWF. A 1,6 x10^6 células/ml y 4 ppb de cobre (36ºC, pH 7,2), la productividad era del 124% del control. A 2,0 x10^6 células/ml y 6 ppb de cobre, la productividad era del 182%.

Por tanto, de nuevo pueden lograrse aumentos sustanciales en la productividad realizando cambios aparentemente pequeños en los parámetros del proceso.

Ejemplo 5: Influencia de la densidad celular, pH y dCO_2

Se determinó la productividad de FVIII del clon de células CHO que expresaba FVIII y vWF descrito en el ejemplo 1 en diversas condiciones de cultivo.

En este experimento, la densidad celular se aumentó desde 1,41x10^6 células/ml hasta 2,03x10^6 células/ml, el pH se aumentó desde 7,1 hasta 7,2 y la concentración de dCO_2 se redujo desde el 9,5% hasta el 6,2%.

La productividad volumétrica de FVIII (UI por litro por día) aumentó en un 98% y la productividad específica de FVIII

(IU por millón de células por día) aumentó en un 36%.

Ejemplo 6: Influencia del pH y la temperatura sobre la producción de furina

Se cultivaron células CHO que expresaban furina en biorreactores de 2,5 l en modo quimiostático. Se mantuvo la densidad celular a un promedio de entre $1,52x10^6$ y $1,78x10^6$ células/ml para cultivos individuales a lo largo de 5 días de cultivo. Se controló el oxígeno disuelto en todos los experimentos a un punto establecido del 20% de saturación del aire. Se mantuvo la concentración de CO_2 disuelto entre el 5%-6% recubriendo el espacio de cabeza de los biorreactores con CO_2.

Por medio del "método de diseño de experimentos", se combinaron diferentes temperaturas con diferentes valores de pH para determinar las condiciones que daban como resultado una productividad volumétrica máxima de furina. Se combinaron cinco temperaturas con tres valores de pH según la "matriz Doehlert", dando como resultado siete combinaciones de temperatura y pH tal como sigue:

Lote de fermentación	Temp. (ºC)	pH
1	35,1	7,20
2	35,8	7,10
3	35,8	7,30
4	36,5	7,20
5	36,5	7,20
6	37,2	7,10
7	37,2	7,30
8	37,9	7,20

Se eligió la combinación de 36,5ºC y pH 7,20 como punto central, que se aplicó a dos lotes de fermentación (4 y 5 en la tabla anterior).

Los datos, incluyendo la productividad volumétrica y específica, y la tasa de crecimiento, se analizaron estadísticamente con la metodología de superficie de respuesta (RSM), usando el software "Minitab".

La temperatura, pero no el pH, influyó significativamente sobre la tasa de crecimiento, produciéndose un máximo para la tasa de crecimiento a 36,5ºC. Al disminuir la temperatura desde 37ºC hasta 35,1ºC, la productividad volumétrica pudo elevarse en aproximadamente 2,7 veces. Se observó una tendencia similar para la productividad específica. Esto es un resultado sorprendente, ya que podría haberse esperado que la productividad volumétrica máxima se observase a la temperatura a la que la tasa de crecimiento era máxima. La influencia del pH para la productividad volumétrica y específica era minoritaria en el intervalo investigado de 7,20 +/- 0,1. Se observó una productividad ligeramente superior en el intervalo de pH inferior de 7,15 +/-0,05 (o entre 7,10 y 7,20), por tanto se seleccionó pH 7,15 como punto establecido para la producción de furina.

Ejemplo 7: Influencia de dCO_2 sobre la producción de furina

Se llevaron a cabo dos rondas de fermentación en paralelo en el modo de quimiostato en biorreactores de 2,5 l, una ronda con una concentración de CO_2 de aproximadamente el 7,5% y la otra con una concentración de CO_2 de aproximadamente el 12%. Se ajustó la concentración de CO_2 variando la fracción de CO_2 en el flujo de espacio de cabeza. Se llevaron a cabo las fermentaciones a 37ºC, a un pH de 7,15 y con una pO_2 del 20%. El recuento celular era de aproximadamente $1,07x10^6$ células/ml a lo largo de 12 días en el cultivo con alta concentración de CO_2, y de $1,49x10^6$ células/ml en el cultivo con baja concentración de CO_2.

La reducción de la concentración de CO_2 desde el 12% hasta el 7,5% tuvo el efecto de aumentar la productividad volumétrica en aproximadamente 2,78 veces y la productividad específica en 2 veces. La tasa de crecimiento celular también era más alta en el cultivo con baja concentración de CO_2.

Ejemplo 8: Influencia del pH y la temperatura sobre la producción de FVII

Se cultivaron células CHO que expresaban FVII en biorreactores de 2,5 l en modo quimiostático, en los que se mantuvo la densidad celular a un promedio de aproximadamente $2,5x10^6$ células/ml (entre 2×10^6 y 3×10^6 células/ml) para cultivos individuales a lo largo de 4 semanas de cultivo. Se controló el oxígeno disuelto en todos los experimentos a un punto establecido del 20% de saturación del aire. Se mantuvo la concentración de CO_2 disuelto entre el 4%-7% recubriendo el espacio de cabeza de los biorreactores con CO_2.

Por medio del "método de diseño de experimentos", se combinaron diferentes temperaturas con diferentes valores de pH para determinar las condiciones que dan como resultado una productividad volumétrica máxima de FVII. Se combinaron tres temperaturas con tres valores de pH según la "matriz Doehlert", dando como resultado cinco combinaciones de temperatura y pH tal como sigue:

Lote de fermentación	Temp. (ºC)	pH
1	36,0	7,15
2	36,0	7,25
3	36,5	7,20
4	37,0	7,15
5	37,0	7,25

La productividad cinética volumétrica máxima media se logró a 36,5ºC y un punto establecido del pH de 7,20. Hubo una interacción positiva de los parámetros, de manera que el resultado de la optimización de ambos parámetros fue mayor que los efectos combinados de la optimización de cada parámetro individualmente.

Ejemplo 9: Influencia de dCO_2 sobre la producción de FVII

Se sometió a prueba el efecto de cuatro concentraciones de CO_2 diferentes (el 5,0, el 6,3, el 7,6 y el 8,9%) sobre la productividad de FVII en cultivo continuo a pequeña escala.

Se cultivaron las células hasta el día ocho de quimiostato, y luego se transfirieron a biorreactores Rushton de 2,5 l y se cultivaron en condiciones continuas a pH 7,20 y 36,5ºC durante casi cuatro semanas. Se analizaron los datos de sólo las últimas tres semanas debido al equilibrado necesario a las diferentes concentraciones de CO_2 durante la primera semana. Se controlaron los niveles de CO_2 mediante medición fuera de línea y adición de CO_2 al espacio de cabeza de los biorreactores.

Las densidades celulares registradas variaron desde $2{,}36 \times 10^6$ células/ml a un nivel de CO_2 del 8,9% hasta $2{,}87 \times 10^6$ células/ml al 5,0%. Las tasas de crecimiento para el mismo intervalo son de 0,42 d^{-1} y 0,49 d^{-1}. El aumento de las tasas de crecimiento específicas a un bajo nivel de CO_2 se correlacionaba con productividades específicas aumentadas. Los efectos combinados del CO_2 sobre la tasa de crecimiento y la productividad específica dieron como resultado un efecto sustancial sobre la productividad volumétrica.

Una disminución en la concentración de CO_2 desde el 8,9% hasta el 5% aumenta la tasa de crecimiento específica en un 17%, la productividad específica en un 10% y la productividad cinética volumétrica en un 35%.

Ejemplo 10: Influencia de la temperatura y el pH sobre la producción de ADAMTS-13

Se cultivaron células CHO transfectadas que expresaban ADAMTS-13 recombinante en cultivos en quimiostato en biorreactores de 1,5 l.

En un primer experimento, se establecieron el pH y la temperatura a diferentes puntos establecido en el intervalo de 36ºC a 38ºC y pH de 7,10 a 7,30. Se analizaron muestras del estado estacionario para determinar el recuento celular y la expresión de ADAMTS-13 mediante ELISA, y se midieron las tasas de dilución a partir de los cultivos en quimiostato para calcular la tasa de crecimiento y la expresión volumétrica de ADAMTS-13. Una vez que se encontró que el óptimo estaba en el intervalo externo del espacio de diseño, se estableció un segundo experimento con un intervalo de temperatura de desde 35º hasta 37ºC y pH de 7,05 a 7,15, y se analizaron los datos del estado estacionario. Las densidades celulares oscilaban entre 1,17-1,71 x 10^6 células/ml. Se controló el CO_2 recubriendo el espacio de cabeza con CO_2 hasta alcanzar una concentración de CO_2 disuelto del 4-6%.

Se normalizaron los datos de ambos experimentos y se analizaron usando el software estadístico Minitab.

Se encontró que la tasa de crecimiento específica tenía su óptimo a pH 7,13 y 36,0ºC usando un modelo cuadrático para el pH y la temperatura. El efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento era débil.

Se encontró que la productividad volumétrica tenía su óptimo a pH 7,15 y 36,0ºC. A pesar del efecto débil de la temperatura sobre la tasa de crecimiento, hubo un efecto relativamente fuerte de la temperatura sobre la productividad volumétrica.

Suponiendo una temperatura constante de 37ºC, el efecto de la elevación del pH desde 7,10 hasta 7,15 era un aumento de la productividad volumétrica en un 10%. Suponiendo un pH constante de 7,10, el efecto de la disminución de la temperatura desde 37ºC hasta 36ºC era un aumento de la productividad volumétrica en un 14%. El efecto global del cambio de las condiciones desde pH 7,10 y temperatura de 37ºC hasta pH 7,15 y temperatura de 36ºC era un aumento de la productividad volumétrica en un 24%.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo de células de mamíferos que secretan proteínas heterólogas en un sobrenadante de cultivo celular, en el que el sobrenadante de cultivo celular tiene una concentración de CO_2 disuelto del 1 al 10%, en el que el cultivo celular es un cultivo continuo mantenido a una densidad de desde $1,4x10^6$ hasta $2,8x10^6$ células/ml.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la concentración de CO_2 es o bien del 4,0 al 9,0% o bien del 5,5% al 8,5%.

3. El método según la reivindicación 1, en el que el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una temperatura que se establece a 36±0,9ºC.

4. El método según la reivindicación 1 ó 3, en el que el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a un pH que se establece a X±0,05 en el que X tiene un valor de desde 7,15 hasta 7,20, con la condición de que el pH se establezca a más de 7,10.

5. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que el sobrenadante de cultivo celular se tampona con bicarbonato

6. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que el sobrenadante se burbujea con aire.

7. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína heteróloga es una proteína de la sangre.

8. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína heteróloga es el factor VIII.

9. El método según la reivindicación 8, en el que el factor VIII se expresa conjuntamente con el factor de von Willebrand.

10. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de Cu^{2+} en el sobrenadante de cultivo celular es de al menos 5, 7, 10, 15 ó 25 ppb.

11. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína heteróloga es ADAMTS-13, furina o factor VII.

12. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que la célula de mamífero es una célula de roedor, tal como una célula CHO o una célula BHK.

13. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que el cultivo continuo es un cultivo en quimiostato o turbidostato.