



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 297 676**

(51) Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05715356 .1**

(86) Fecha de presentación : **16.02.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1716225**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la obtención de proteínas recombinantes en células huésped eucarióticas.**

(30) Prioridad: **17.02.2004 DE 10 2004 007 658**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **Biocentrals Arzneimittel AG.**
Stadastrasse 2-18
61118 Bad Vilbel, DE

(72) Inventor/es: **Hakemeyer, Christian;**
Lütkemeyer, Dirk y
Lehmann, Jürgen

(74) Agente: **Gallego Jiménez, José Fernando**

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

Procedimiento para la obtención de proteínas recombinantes en células huésped eucarióticas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de proteínas recombinantes en una línea de células huésped eucarióticas, caracterizado porque el cultivo de las células huésped se realiza bajo el aporte continuo de sustancias nutrientes, aumentando la velocidad del aporte en dependencia directa con la duración del aporte de nutrientes.

10 La preparación de proteínas recombinantes en células huésped ha adquirido una importancia creciente en los últimos años, ya que con ello se hace posible la obtención de proteínas terapéuticas a gran escala y con una elevada seguridad biológica. Para obtener proteínas recombinantes pueden utilizarse lo mismo bacterias como *E. coli* que levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, lo mismo que células de eucariotas superiores tales como insectos o mamíferos.

15 Las bacterias y las levaduras tienen la ventaja de que se multiplican con rapidez y que plantean escasas exigencias en cuanto al medio de cultivo. Sin embargo, una gran desventaja de estos organismos huésped es que no están en condiciones de glicosilar y sialilar correctamente proteínas. Pero ya que un modelo correcto de glicosilación es un requisito imprescindible para la funcionalidad de muchas proteínas, a menudo las proteínas obtenidas en bacterias o levaduras no son biológicamente activas y no pueden utilizarse en terapias. Para la actividad de muchas proteínas, como por ejemplo la eritropoyetina o el interferón beta, resulta decisivo además el grado de sililación, es decir, el contenido de ácidos sialínicos ligados a la proteína. Las proteínas con un grado de sialilación presentan en general una actividad específica más elevada.

20 Con el fin de obtener proteínas glicosiladas y/o sialiladas es necesario, por consiguiente, obtener en cultivos animales las proteínas cuya actividad es dependiente de la glicosilación y/o de la sialilación, como por ejemplo la eritropoyetina, el t-PA (activador del plasminógeno tisular) o el factor de coagulación sanguínea VIII. Sin embargo, en la producción de medicamentos en células animales los costes de producción pueden ser muy elevados debido, entre otras cosas, a la composición de los medios de cultivo mucho más complejos en comparación con el cultivo de microorganismos. Por consiguiente, el desarrollo de procedimientos de producción más eficientes gana cada vez más en importancia.

Cabe distinguir fundamentalmente tres tipos principales de modos de procedimiento para el cultivo de células huésped destinadas a la producción de proteínas recombinantes.

35 En el caso de un proceso por lotes (Batch), se disponen el medio y las células en el biorreactor al comienzo del cultivo. Hasta el final del cultivo no se añaden sustancias nutrientes ni se retiran células del fermentador. Únicamente se suministra oxígeno. Cuando se necesitan uno o más sustratos, se finaliza el proceso y se recolectan los productos. Una variación de este proceso por lotes es el llamado proceso de "repeated Batch" en el que al final de la fermentación se deja en el biorreactor una parte del cultivo como inóculo y se rellena con medio nuevo.

40 La mayor ventaja del proceso por lotes está en la sencillez de su realización. Sin embargo, resulta desventajoso que en general no se aproveche totalmente la capacidad de las células para la producción de proteínas recombinantes ya que se alcanza sólo una baja densidad celular, con lo cual por regla general también es baja la concentración del producto. Otra desventaja del proceso por lotes radica en la proporción desfavorable entre el tiempo de producción y el tiempo total del ciclo, que se compone del tiempo para el montaje, la limpieza y la esterilización del biorreactor.

45 El segundo procedimiento de cultivo es el procedimiento continuo en el que se añade constantemente medio de cultivo fresco y se retira en igual medida contenido del fermentador. Se produce así un suministro permanente de sustancias nutrientes, diluyéndose al mismo tiempo las sustancias inhibidoras del crecimiento tales como amoníaco y lactato.

50 Por lo tanto, con esta estrategia se alcanzan altas densidades celulares y se mantiene durante un período relativamente largo. Un caso especial de los procesos continuos son los reactores de diálisis, en los que se retienen en el fermentador sustancias de alto peso molecular como las proteínas mientras que pueden aportarse sustancias de bajo peso molecular, tales como sustratos, o retirarse del sistema los productos residuales como el amoníaco y el lactato.

55 Las desventajas del proceso continuo radican, por un lado, en un elevado esfuerzo en aparatos mientras que, por otro lado, hay que tener preparadas grandes cantidades de medio estéril y tratar grandes cantidades de salientes del cultivo. Ya que hay que cambiar continuamente el contenido del fermentador, cuando se utiliza un reactor de diálisis no se puede acumular el producto en altas concentraciones, lo cual dificulta de manera adicional el tratamiento.

60 El tercer procedimiento posible, por último, es la fermentación Fed-Batch en la que se inicia el cultivo con una porción del volumen total del fermentador e inmediatamente, o después de una breve fase de crecimiento, se añade sustrato fresco. Con ello son posibles densidades celulares más altas y tiempos de proceso más largos que en el procedimiento por lotes. Una ventaja de este procedimiento es que se puede influir sobre el metabolismo de las células

controlando el aporte de nutrientes, lo cual puede conducir a una menor producción de sustancias residuales. Frente al proceso continuo, la ventaja radica en que el producto de las células puede acumularse en el fermentador durante un período más prolongado y por lo tanto pueden alcanzarse concentraciones de producto más elevadas, con lo cual se facilita el procesamiento posterior. Sin embargo, esto presupone que el producto de las células es lo suficientemente estable como para que no se degrade enzimáticamente en caso de un tiempo de permanencia en el fermentador de varios días. Una desventaja de este procedimiento es que las relaciones fisiológicas en el biorreactor pueden experimentar grandes variaciones a causa del aporte de soluciones de sustrato concentradas.

Un problema principal en el cultivo de células animales, independientemente del procedimiento elegido, es proporcionar a las células suficientes sustancias nutrientes sin que los productos de degradación de los nutrientes se acumulen más allá de un nivel crítico para la fisiología celular. Como fuentes de energía principales de las células animales sirven la glucosa y la glutamina, cuyos productos de degradación principales, el lactato y el amonio, en concentraciones elevadas inhiben el crecimiento y el metabolismo de las células y conducen a la muerte de las mismas (Hassell *et al.* (1991) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 30: 29-41). Por lo tanto, en el cultivo de células animales, en caso de un aporte suficiente de nutrientes es necesario reducir la acumulación de lactato y amonio para poder conseguir de este modo densidades celulares elevadas y un mayor rendimiento del producto.

Una posibilidad de reducir la producción de productos residuales consiste en la adición controlada de sustrato, que también se denomina "catabolic control". Pudo demostrarse que un aporte limitado de glutamina y glucosa da lugar a una notable reducción en la producción de amonio y lactato en las células de hibridoma (Ljunggren & Häggström (1994) *Biotechnology and Bioengineering* 44: 808-818).

En los cultivos de tipo Fed-Batch, en los que se adapta la concentración de glucosa después de medir el consumo de oxígeno de las células por medio de la adición controlada de medio de cultivo concentrado, pudo observarse al cabo de un cierto tiempo un cambio en el metabolismo celular, que también recibe el nombre "metabolic shift". Esta "metabolic shift" se desencadena con la limitación de la concentración de glucosa y de glutamina en el medio a lo largo de varios días, y da lugar a que las células absorban y metabolicen menos nutrientes. A consecuencia de ello aumenta el contenido de glucosa y glutamina en el medio de cultivo, mientras que retrocede notablemente la producción de las sustancias residuales lactato y amonio debido a la disminución en el consumo (Zhou *et al.* (1995) *Biotechnology and Bioengineering* 46: 579-587). La "metabolic shift" no sólo se ha observado en células de hibridoma, sino también en líneas celulares tales como SPO, HEK-293, BHK y CHO.

Mediante la "metabolic shift" pueden alcanzarse altas densidades celulares de más de 1×10^7 células por milímetro y tiempos de proceso largos, ya que los productos de desecho lactato y amonio no se acumulan en concentraciones que inhiben el crecimiento celular. Sin embargo, es importante que la solución de nutrientes se adapte a las necesidades de las células para garantizar que se alcanza la "metabolic shift" y evitar tanto el agotamiento como también una acumulación excesiva de determinados nutrientes y, con ello, un aumento fuerte de la osmolalidad (Xie y Wang, 1994, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1775 - 1189 y 1996, *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 725 - 729). Es también importante poner a disposición de las células suficiente glucosa como sustrato para la glicosilación de las proteínas recombinantes.

Para que las concentraciones de nutrientes aportados puedan adaptarse al consumo de las células, por lo general se utilizan procedimientos complejos a fin de determinar el consumo momentáneo de las células, para que se pueda adaptar la velocidad de aporte de nutrientes y pueda llevarse a cabo un aporte acorde a las necesidades. Esto incluye, entre otras cosas, la medición de la concentración de glucosa mediante análisis de inyección continua o la medición del consumo de oxígeno de las células.

Así, en US 6,180,401 B1 da a conocer un procedimiento de cultivo celular en el que se mide continuamente la concentración de glucosa y se mantiene en el medio de cultivo dentro de unos determinados intervalos, adaptando el aporte de nutrientes en función de los valores de medida. También en US 2002/0099183 A1 la concentración de glucosa determina la velocidad de aporte de glucosa, con lo cual la concentración de glucosa en el medio de cultivo puede mantenerse dentro de un intervalo determinado.

Un aporte de nutrientes a tenor de las necesidades que sea dependiente de la concentración de glutamina en el medio de cultivo se describe en el documento EP-A-1 036 179.

WO 97/33973 da a conocer un procedimiento de cultivo en el que se mide la producción de un producto metabólico cargado eléctricamente basándose en la conductibilidad del medio, y a tenor de ello se adapta el ritmo de aporte de nutrientes.

US 5,912,113 describe un procedimiento de fermentación para microorganismos en el que se aportan nutrientes cuando se ha consumido la fuente de carbono del medio y con ello se mide en el mismo un valor del pH más alto o un aumento de la concentración de oxígeno disuelto.

No obstante, los procedimientos anteriormente descritos son muy costosos y albergan un riesgo para la esterilidad del biorreactor, ya que requieren la medición de uno o más parámetros del cultivo con ayuda de aparatos de medición apropiados.

El objetivo de la presente invención es, por consiguiente, facilitar un procedimiento con el que puedan obtenerse proteínas recombinantes en elevada concentración y con un alto grado de glicosilación y/o sialilación, impidiéndose la acumulación de sustancias de desecho, y la consiguiente inhibición del crecimiento celular, mediante una adición controlada de sustancias nutrientes y la consecución de la “metabolic shift”, y prescindiéndose de complejos procedimientos de medición del metabolismo celular y de un aporte de nutrientes acorde a las necesidades.

Este y otros objetivos se alcanza mediante el objeto de la reivindicación principal. En las subreivindicaciones se definen formas de realización preferidas de la presente invención.

Los objetivos de la presente invención se alcanzan mediante la disposición de un procedimiento para la obtención de proteínas recombinantes en una línea de células huésped eucarióticas, en el que el cultivo de las células huésped se realiza mediante el aporte continuo de sustancias nutrientes y aumentando la velocidad de aporte en dependencia lineal con la duración del aporte de nutrientes.

Se encontró sorprendentemente que mediante el aporte continuo de sustancias nutrientes, dependiendo de la duración del aporte, las células huésped pueden alcanzar la “metabolic shift” y permanecer en ésta durante un período prolongado, es decir, por regla general durante 3 días, preferentemente más de 4 días y de manera especialmente preferente como mínimo 6 días. Para ello no sólo se adapta el aporte de medio al consumo de las células, sino que se suministran sustancias nutrientes a las células de tal manera que ellas adaptan su consumo al suministro limitado de sustancias nutrientes. A diferencia del estado actual de la técnica, no tiene lugar una adaptación del aporte de medio basándose en las concentraciones existentes de sustrato o a la actividad metabólica sino que el aporte de medio se produce únicamente dependiendo de la duración del aporte. Mediante este procedimiento pueden evitarse concentraciones elevadas de proteínas recombinantes con un alto grado de glicosilación y/o sialilación y, al mismo tiempo, complejos procedimientos de medición.

El aporte de nutrientes se realiza especialmente según la función

$$F = F_0 + F_1 \times t$$

siendo de libre elección los parámetros F_0 y F_1 , basándose en los índices de consumo de las células que se han medido una vez, y representando F la velocidad de flujo del aporte de nutriente (en ml/h) y t la duración del aporte (en h).

Al emplear esta función de aporte no se produce una acumulación ni una limitación de otros aminoácidos tales como glutamina, cuyo aporte se limitará lo mismo que el de la glucosa. La producción de las sustancias residuales lactato y amonio se reduce continuamente y acaba por desaparecer. Se alcanza la “metabolic drift”, con lo cual disminuye el consumo de glucosa y glutamina.

Una vez alcanzada la “metabolic drift”, las concentraciones de glucosa y de todos los aminoácidos en el medio de cultivo vuelven a aumentar fuertemente porque aumenta la velocidad de aporte, conforme a la función anteriormente indicada, mientras que disminuyen la absorción y el consumo de glucosa y de glutamina. Las elevadas concentraciones de sustancias nutrientes, en especial de la glucosa, conducen a la deseada glicosilación y un elevado grado de sialilación de la proteína recombinante obtenida en la línea de células huésped. El metabolismo de las células permanece en el estado de la “metabolic shift”, la velocidad de crecimiento de las células es menor.

Mediante este proceso pueden cultivarse las células durante un largo período, lo cual conduce a una alta densidad celular y a un elevado rendimiento del producto. Con un aporte de nutrientes en función del tiempo puede evitarse la compleja regulación de la concentración de sustancias nutrientes, que depende de parámetros específicos de las células y que constituye un riesgo para la esterilidad.

En una forma de realización especial, el cultivo de las células huésped tiene lugar en un procedimiento de tipo Fed-Batch.

Igualmente de manera preferida, para el aporte se utiliza un medio distinto al de partida, mostrando el medio de partida una concentración de glucosa y de glutamina inferior a la del medio utilizado para el aporte de nutrientes, lo cual conduce a una limitación del suministro de glucosa y glutamina. De manera especialmente preferida, para el aporte de nutrientes se utiliza un concentrado de nutrientes.

Igualmente de manera preferente, el aporte de nutrientes no comienza al mismo tiempo que la inoculación, de manera especialmente preferida el aporte de nutrientes comienza de 16 a 22 horas después de la inoculación, y de manera muy especialmente preferida el aporte de nutrientes comienza de 17 a 18 horas después de la inoculación.

De manera especialmente preferida, antes del cultivo de las células huésped en el procedimiento según la inversión se determina su tasa de consumo de sustancias nutrientes en relación a la glucosa y sobre esta base se calcula la cantidad de componentes del medio (excepto glucosa y glutamina) que hay que añadir al concentrado de nutrientes. De manera más especialmente preferida, esta determinación de las tasas de consumo tiene lugar en un procedimiento por lotes sin limitación de la concentración de glucosa y glutamina.

El concepto de “célula huésped” designa una línea celular que está transformada de manera estable con al menos una molécula heteróloga de ácido nucleico, llevando esta molécula de ácido nucleico el gen para la proteína recombinante que hay que construir. Este gen será expresado por la célula, es decir, será transcrito y traducido. Opcionalmente, la línea de células huésped secreta el producto génico. Las moléculas heterólogas de ácido nucleico, que permiten la expresión de proteínas recombinantes en líneas de células huésped, son conocidas en el estado actual de la técnica y pueden prepararse, entre otros, según los métodos descritos en Sambrook and Russell, *Molecular Cloning - A laboratory manual*, 3a. edición 2001. Explícitamente, “transformado” no significa aquí la inmortalización de células mediante oncogenes, virus oncogénicos y similares. Igualmente es posible activar el gen para la proteína que debe obtenerse, que está presente en la línea de células huésped humanas pero que no se ha expresado, lo cual puede hacerse, p. ej., mediante recombinación homóloga, tal como se da a conocer en los documentos WO 91/09955 y WO 93/09222.

La línea de células huésped puede ser cualquier célula de mamíferos, aunque se trata preferentemente de células de primates o de roedores. De manera especialmente preferida se utilizan células derivadas de hámster tales como CHO (chinese hamster ovary cells) o BHK (baby hamster kidney), o bien células humanas tales como células HeLa o HEK292. De manera más especialmente preferida se utilizan células CHO. La línea de células huésped puede modificarse de tal manera que sea deficiente para un gen metabólico como p. ej. de dihidrofolatoreductasa (DHFR), de tal manera que tras la introducción en la célula de este gen metabólico, junto con la secuencia que codifica para el gen recombinante, ejerciendo una presión de selección y aprovechando las propiedades del metabolismo se llegue a la amplificación de ambos genes. Esto tiene como consecuencia un aumento de la expresión génica.

El cultivo de las células puede realizarse fundamentalmente del modo que se elija. Sin embargo, se prefiere el cultivo como suspensión, p. ej. en botellas con agitador o en botellas rodantes, que son apropiadas para el cultivo de tipo Fed-Batch.

Se prefiere además que los medios utilizados para el cultivo presenten sólo un contenido bajo en suero, p. ej. del 1% (v/v) como máximo; de manera especialmente preferida, los medios carecerán de suero. Ejemplos de medios de cultivo apropiados son medios basales tales como RPMI 1640, DMEM, F12 o eRDF, que pueden mezclarse entre sí y que según las necesidades de las células pueden mezclarse con aditivos en las cantidades convenientes. Especialmente preferida es la utilización de DMEM/F12 en una proporción de mezcla de 1:1 como medio de cultivo. En la forma de realización más especialmente preferida, la concentración de los iones fosfato en el medio se aumenta mediante la adición de sales fosfato adicionales. Sales fosfato apropiadas son las sales fosfato contenidas en la composición de base.

Junto a glucosa y aminoácidos, aditivos apropiados para el medio son quelatos tales como ácido aurtinrícarboxílico (ATA), sales inorgánicas tales como sales conteniendo fosfatos, poliaminas y sus etapas previas tales como putrescina, hormonas tales como insulina, antioxidantes tales como ácido ascórbico y mezclas de vitaminas, precursores de lípidos tales como etanolamina y sustancias citoprotectoras tales como Pluronic F68.

Con el concepto de “sustancias nutrientes” en el sentido de la invención se designan las sustancias que son necesarias para la obtención de energía y para la síntesis de la sustancia celular en la célula. Se trata preferentemente de como mínimo un carbohidrato y como mínimo un aminoácido y de manera especialmente preferente de glutamina y glucosa.

Bajo el concepto de “proteína recombinante” se entienden proteínas que una molécula de ácido nucleico heteróloga expresa, es decir, transcribe y traduce, en la línea de células huésped. Se prefieren proteínas recombinantes de origen humano. Igualmente, se trata preferentemente en estas proteínas recombinantes de proteínas glicosiladas tales como linfoquinas, citoquinas, inmunoglobulinas y hormonas, como p. ej. eritropoyetina, t-PA, factores de coagulación sanguínea, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, interferonas e interleucinas.

Bajo el concepto de “proteína glicosilada” se entienden proteínas que tienen uno o más restos azúcar unidos covalentemente a los restos aminoácido de la proteína. Los carbohidratos pueden estar unidos a la asparagina (enlace N-glicosídico) o bien a serina o treonina (enlace O-glicosídico). A través del enlace O-glicosídico o N-glicosídico puede haber oligosacáridos de distintas composiciones de azúcares unidos a la proteína. Entre los carbohidratos que están presentes a menudo en las proteínas glicosiladas como restos azúcar están mucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y manosa. Las estructuras de carbohidrato unidas pueden analizarse cromatográficamente mediante HPAEC-PAD (High pH Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection) tras la disociación enzimática de los carbohidratos con glucosidasa, tal como se describe por ejemplo en el documento EP 1 036 179.

De manera especialmente preferente, con las proteínas recombinantes que se obtienen por el procedimiento según la invención se trata de proteínas en las que un elevado grado de sialilación va correlacionado con una alta actividad específica, ya que con el procedimiento según la invención puede alcanzarse en especial un alto grado de sialilación, y de manera más preferente con las proteínas recombinantes se trata de eritropoyetina.

Bajo “sialilación” se entiende la fijación de restos de ácido sialínico, que a menudo tiene lugar en los restos azúcar terminales de las glucoproteínas. Los ácidos sialínicos son N-acil derivados del ácido neurámico como por ejemplo ácido N-acetilneurámico o ácido N-glicolilneurámico.

El grado de sialilación se obtiene a partir de la proporción entre la porción de cantidad de sustancia medida del ácido sialínico y la porción de sustancia teóricamente posible de ácido sialínico. A las moléculas de proteínas con la misma o muy similar secuencia de aminoácidos pero con distinto grado de sialilación y diferentes puntos isoeléctricos en el enfoque isoeléctrico, se les designa a menudo también como “isoformas”.

Bajo el concepto de “alto grado de sialilación” se entiende en el sentido de la presente invención que las proteínas recombinantes obtenidas según el procedimiento de la invención presentan un grado de sialilación medio de cómo mínimo el 70%, preferentemente de cómo mínimo el 80%, de manera especialmente preferente de cómo mínimo el 85% y de manera más preferente de cómo mínimo el 90%. En el caso de la eritropoyetina, un grado de sialilación de por ejemplo cómo mínimo el 70% significa que de un máximo de 14 sitios de fijación terminales del ácido sialínico en una molécula de eritropoyetina hay como mínimo 10 sitios de fijación ocupados con ácido sialínico.

En un medio de cultivo que contiene una mezcla de isoformas, la porción de isoformas con un elevado grado de sialilación, referido a la cantidad total de proteína recombinante obtenida en el medio de cultivo, vale como mínimo el 40%, preferentemente como mínimo el 50%, de manera especialmente preferente de cómo mínimo el 60%, en especial preferentemente de cómo mínimo el 70% y lo más preferentemente de cómo mínimo el 80%.

El grado de sialilación medio puede determinarse por ejemplo cromatográficamente mediante HPAEC-PAD (High pH Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection) tras la disociación enzimática de los ácidos sialínicos con neuraminidasa, tal como se describe por ejemplo en los documentos EP 1 036 179 o EP 1 037 921. Mediante electroforesis capilar en zona (CZE), que se basa en la carga de la proteína, pueden determinarse tanto el grado de sialilación media como también la porción de isómeros con un alto grado de sialilación en la cantidad total de la proteína recombinante obtenida (véase European Pharmacopoeia, 4a. edición 2002, 01/2002:1316). Para la comparación cualitativa de muestras con distintos grados de sialilación resulta también adecuado el enfoque isoeléctrico, en el que el modelo de bandas se desplaza fuertemente hacia la zona ácida cuando hay más restos de ácido sialínico en la proteína (véase European Pharmacopoeia, 4a. edición 2002, pág. 73-75).

Por “cultivo de las células” se entiende que las células son mantenidas *in vitro* en condiciones que permiten la proliferación, un metabolismo normal de las células y la formación de la proteína recombinante, es decir, que a las células se les suministran todas las sustancias nutrientes y elementos constituyentes, así como oxígeno.

“Sobranate de cultivo” designa el medio de cultivo que durante un determinado espacio de tiempo estuvo en contacto con las células y que después se separó de éstas. El sobranate de cultivo contiene la proteína recombinante producida por las células. La separación de las células se realiza por medio de técnicas de separación habituales tales como p. ej. filtración, centrifugación.

Por “aporte de nutrientes” en el sentido de la presente invención se entiende que a una cantidad inicial del medio (medio de partida) se le añade más medio o un concentrado, no debiendo tener el medio o concentrado adicionales la misma composición que el medio ya existente (medio de partida).

Por “aporte continuo de nutrientes” se entiende dentro del marco de la presente invención que a una cantidad inicial de medio se le añade más medio sin interrupciones.

El concepto de “concentrado de nutrientes” designa una solución de nutrientes que contiene una cantidad de nutrientes mayor que el medio de partida y que se utiliza para aportar nutrientes.

Por “inoculación” se entiende en el marco de la presente invención que un determinado número de células que deben cultivarse conforme al procedimiento según la invención, se ponen en contacto con el medio en recipientes de cultivo y se estimula su crecimiento.

“Procedimiento de tipo Fed-Batch” en el sentido de la presente invención designa un procedimiento de cultivo en el que al comienzo del cultivo hay una pequeña cantidad de medio de partida en el biorreactor y que en el curso del cultivo se aporta más medio o concentrado, sin retirar medio de cultivo.

Por “medio de partida” en el sentido de la presente invención se entiende el medio en el que se inoculan y cultivan las células en el fermentador antes de que comience el aporte de nutrientes. Este medio de partida contiene una menor concentración de glucosa y glutamina que el medio o el concentrado de nutrientes, con lo cual se limita el suministro de glucosa y glutamina.

El medio de partida contiene de 5 a 500 mg/l, preferentemente de 200 a 400 mg/l y de manera especialmente preferente 250 mg/l de glucosa. El medio de partida contiene además de 5 a 100 mg/l, preferentemente de 20 a 80 mg/l y de manera especialmente preferente 50 mg/l de glutamina.

El medio o concentrado de nutrientes contiene como mínimo 5 g/l, preferentemente como mínimo 10 g/l, de manera especialmente preferente como mínimo 20 g/l y de manera más preferente como mínimo 30 g/l de glucosa. El medio o concentrado de nutrientes contiene además como mínimo 1 g/l, preferentemente como mínimo 2 g/l y de manera especialmente preferente como mínimo 2,5 g/l de glutamina.

Por “tasas de consumo de nutrientes” se entiende dentro del marco de la presente invención la variación de la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo en un determinado intervalo de tiempo, dependiendo de la densidad de células.

5 Por “medio de cultivo” en el sentido de la presente invención se entiende el medio que en un determinado instante está presente en el biorreactor. Durante el aporte de nutrientes se trata de una mezcla de medio de partida y medio o concentrado de nutrientes, mientras que antes del aporte de nutrientes el medio de cultivo está compuesto exclusivamente por el medio de partida.

10 “Procedimiento por lotes” en el sentido de la presente invención designa un procedimiento de cultivo en el que durante el cultivo no se añade ni se retira medio.

Dentro del marco de la invención, la línea de células huésped se cultiva como mínimo durante seis días, preferentemente durante más de ocho, de manera especialmente preferente durante más de diez y de manera más preferente durante aproximadamente doce días. La duración del cultivo se calcula partiendo de la inoculación y depende de la viabilidad de las células. La “metabolic shift” anteriormente descrita, durante la cual se reducen el consumo de glucosa y glutamina y la formación de lactato y amonio, tiene lugar por regla general después de 4 a 8 días, preferentemente después de 5 a 7 días y de manera especialmente preferente después de 6 días, calculado a partir de la inoculación.

20 El procedimiento de la presente invención permite alcanzar densidades celulares de más de 10^7 células por milímetro de medio de cultivo, preferentemente se alcanzan densidades celulares de más de $1,3 \times 10^7$ células por milímetro de medio de cultivo, y de manera especialmente preferente se alcanza densidades celulares de más de $1,6 \times 10^7$ células por milímetro de medio de cultivo.

25 Otra ventaja del presente procedimiento es que se alcanzan altas concentraciones de la proteína recombinante en el medio de cultivo. Se alcanza una concentración de más de 60 mg/l de medio de cultivo, preferentemente de más de 80 mg/l de medio de cultivo, de manera especialmente preferente de más de 100 mg/l de medio de cultivo y lo más preferentemente de más de 140 mg/l de medio de cultivo.

30 Al cabo de aproximadamente 12 días de cultivo en medio de cultivo se alcanza preferentemente una concentración de la proteína recombinante de 100 a 160 mg/l de medio de cultivo, de manera especialmente preferente de 110 a 150 mg/l de medio de cultivo y lo más preferentemente de 120 a 150 mg/l de medio de cultivo.

35 Referido al número de células en el medio de cultivo, el rendimiento después de doce días de cultivo es como mínimo de $0,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células, preferentemente como mínimo de $0,7 \mu\text{g}$ por 10^5 células, en especial preferentemente como mínimo de $1,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células, de manera especialmente preferente de como mínimo $2,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células y lo más preferentemente como mínimo de $3,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células. Al cabo de doce días de cultivo se alcanza un rendimiento de $0,5$ a $4 \mu\text{g}$ por 10^5 células, el rendimiento es preferentemente de 1 a $3,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células y lo más preferentemente el rendimiento es de 2 a $3,5 \mu\text{g}$ por 10^5 células.

40 La proteína recombinante con un elevado grado de sialilación puede purificarse desde el medio de cultivo y separarse de las proteínas con un menor grado de sialilación realizando uno o más pasos de purificación. Procedimientos de purificación apropiados para la eritropoyetina se describen por ejemplo en los documentos EP 0 830 376, EP 0 228 452 y WO 03/045 995.

45 La presente invención se explicará en los ejemplos siguientes, que sólo sirven para ilustrar la invención y en modo alguno deben entenderse como una limitación. Los ejemplos se ocupan representativamente de la obtención de eritropoyetina en células CHO.

50 Descripción de las ilustraciones

Fig. 1: representación esquemática del biorreactor

55 a) para el funcionamiento por lotes

b) para el funcionamiento de tipo Fed-Batch

Fig. 2: relación de las tasas de consumo específicas de los aminoácidos en comparación con las tasas de consumo específicas de glucosa en el cultivo por lotes de la línea de células huésped

60 Fig. 3: desarrollo temporal de la densidad de células vivas y total así como de la señal de ajuste de oxígeno durante el cultivo de la línea de células huésped conforme al procedimiento según la invención

Fig. 4: desarrollo temporal de las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y amonio durante el cultivo de la línea de células huésped conforme al procedimiento según la invención

65 Fig. 5: desarrollo temporal de la concentración, la cantidad y la productividad de proteína durante el cultivo de la línea de células huésped conforme al procedimiento según la invención

ES 2 297 676 T3

Fig. 6: enfoque isoeléctrico de la glucoproteína obtenida conforme al procedimiento según la invención. La banda 1 muestra el estándar BRP (European Pharmacopoeia (2002), 4a. edición), la banda 2 muestra la eritropoyetina, las restantes bandas muestras eluados de diferentes pasos de la depuración.

TABLA 1

Composición del medio para el cultivo por lotes

DMEM/F12 (sin NaHCO ₃) +	
NaHCO ₃	3 g/l
glucosa	900 mg/l
glutamina	292 mg/l
prolina	20 mg/l
ácido asparagínico	20 mg/l
asparagina	20 mg/l
leucina	50 mg/l
isoleucina	50 mg/l
ácido ascórbico	25 mg/l
sulfato de hierro	2 mg/l
putrescina	0,32 mg/l
ácido aurintricarboxílico	1,06 mg/l
Pluronic F68	1 g/l
insulina	10 mg/l

TABLA 2

Composición del medio de partida para el cultivo conforme al procedimiento según la invención

DMEM/F12 (sin NaHCO ₃ , glutamina y glucosa) +	
NaHCO ₃	3 g/l
glucosa	250 mg/l
glutamina	50 mg/l
prolina	20 mg/l
ácido asparagínico	20 mg/l
asparagina	20 mg/l
leucina	50 mg/l
isoleucina	50 mg/l
ácido ascórbico	25 mg/l
sulfato de hierro	2 mg/l
putrescina	0,32 mg/l
ácido aurintricarboxílico	1,06 mg/l
Pluronic F68	1 g/l
insulina	10 mg/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	124,2 mg/l

TABLA 3

Composición del concentrado de nutrientes para el cultivo conforme al procedimiento según la invención

DMEM/F12 (sin NaHCO₃ y NaCl) (en concentración doble) +	
NaHCO₃	3 g/l
glucosa	33,5 mg/l
ácido asparagínico	146 mg/l
asparagina	2100 mg/l
serina	920 mg/l
glutamina	2700 mg/l
histidina	364 mg/l
glicina	22 mg/l
treonina	313 mg/l
arginina	858 mg/l
tirosina	335 mg/l
metionina	257 mg/l
valina	520 mg/l
triptófano	494 mg/l
fenilalanina	64 mg/l
isoleucina	746 mg/l
leucina	552 mg/l
lisina	384 mg/l
prolina	1000 mg/l
cisteína	1500 mg/l
ácido ascórbico	250 mg/l
sulfato de hierro	20 mg/l
putrescina	3,2 mg/l
ácido aurintricarboxílico	10,6 mg/l
Pluronic F68	1 g/l
insulina	50 mg/l
NaH₂PO₄ x H₂O	248,4 mg/l

Ejemplos

1. Determinación de la concentración de glucosa y lactato en el sobranate de cultivo libre de células

La medición simultánea de las concentraciones de glucosa y de lactato en el sobranate de cultivo libre de células se realizó mediante el analizador YSI 2700 S (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, E.UU.). El principio de medición se basa en la conversión enzimática de glucosa y lactato en glucono- δ -lactona o piruvato y peróxido de hidrógeno, que se detecta amperimétricamente. A partir de la cámara de muestras, en la que se mezclan 30 μ l de la muestra con el tampón YSI, se ramifican dos trayectos de medición separados para glucosa y para lactato. Tres membranas separan la muestra de los electrodos. La primera membrana retiene las partículas. En la segunda membrana se produce la oxidación de glucosa o lactato mediante enzimas inmovilizadas en la membrana (glucosidasa

o lactatoxidasas). La tercera membrana con un límite de exclusión de 200 Dalton, no permite el paso de sustancias reducidas anódicamente mayores que el peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 producido en la reacción enzimática, por el contrario, puede atravesar la membrana y se oxida en el ánodo de platino que hay detrás. El flujo de corriente medido en comparación con un sistema de referencia de Ag/AgCl es proporcional a la concentración de glucosa o lactato. La medición en el aparato se produce automáticamente y dura aproximadamente un minuto.

2. Determinación de la concentración de aminoácidos en el sobran te de cultivo libre de células

La determinación de la concentración de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC en fase inversa (Lim, 1987). En medio alcalino el grupo amino de los aminoácidos reacciona con un reactivo de derivación (50 mg de orto-ftaldehído (OPA) en 1 ml de metanol + 100 μ l de ácido 3-mercaptopropiónico + 9 ml de tampón borato, pH 10,4) para dar un derivado de isoindol con capacidad de fluorescencia, que puede detectarse a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. La separación de los derivados de aminoácido se realizó con una columna RP-18 (Kromasil C18, 5 μ m, longitud: 150 mm, diámetro: 4 mm, VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH, Montabaur) debido a interacciones hidrófobas. La fase móvil consistía en un sistema tampón binario con un gradiente desde tampón polar hasta apolar (Büntemeyer (1988) (Desarrollo de un sistema de perfusión para el cultivo continuo de células animales en suspensión, tesis doctoral, Universidad de Hannover). La evaluación se hizo mediante el cálculo de las superficies pico a través de una comparación con un estándar de aminoácidos y el estándar interno.

Para la precipitación de la proteína se mezclaron 50 μ l del sobran te libre de células con 50 μ l de un ácido perclórico al 5% (mezclado con 300 μ M de ácido delta-aminovaleriánico como estándar interno). Tras la centrifugación, se pipetea y mezclan con el vórtex en un recipiente de reacción Eppendorf 50 μ l del sobran te con 100 μ l de tampón de borato potásico (0,4 M, pH 9,5). Tras una nueva centrifugación se llenan 20 μ l del sobran te en un tubo de HPLC y se introduce en el automuestreador del sistema de HPLC (VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH).

La prolina, como amina secundaria, no puede derivarse mediante el método anteriormente descrito. El marcado con fluorescencia de la muestra libre de células se realizó con OPA y 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD). Para ello se mezclaron 20 μ l de estándar interno con 20 μ l de muestra libre de células y se añadieron 50 μ l del reactivo OPA. Al cabo de 1 min se añadieron 100 μ l de solución NBD (10 mg/ml en metanol) y se incubó la muestra durante 3 min a 80°C en termomezcladora. Se pipetearon 100 μ l en un tubo de HPLC y se colocó en la automuestreadora del sistema de HPLC (VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH). La cuantificación se realizó mediante HPLC de fase inversa.

3. Determinación de la concentración de amonio en el sobran te de cultivo libre de células

El principio de medición de la determinación del amonio se basa, de manera similar a como la del análisis de aminoácidos, en la derivación del amonio en medio alcalino para dar un producto con capacidad de fluorescencia. A valores altos del pH casi todo el amonio de desprotoniza para dar amoniaco, que reacciona con orto-ftaldehído (OPA) y ácido tioglicólico para dar un derivado de isoindol y que puede detectarse fluorométricamente.

En una microcubeta de cuarzo se mezclaron 20 μ l del sobran te libre de células con 1,3 ml del reactivo de derivación (250 mg OPA + 500 mg de tioglicolato + 2 ml de metanol p.a. + 100 ml de tampón borato-Na 0,4 M, pH 10,4). Esta muestra preparada se midió en el espectrómetro de fluorescencia (RF-551, Shimadzu, Kyoto, Japón) a 415 nm de longitud de onda de excitación y 485 nm de longitud de onda de emisión. La emisión máxima se alcanzó al cabo de aprox. 1 min. La evaluación se realizó mediante el calibrado de dos puntos con un estándar de amonio (100 mg/l).

4. Determinación de la densidad celular y viabilidad

La determinación del número de célula se hizo mediante un hemocitómetro (Neubauer-Zählkammer).

La determinación de la viabilidad se realizó por el método de exclusión. Para este fin, antes del análisis en el microscopio se mezcló la suspensión celular en la proporción 1:1 (con densidades celulares altas también 1:3) con una solución de azul tripán (Sigma, Deisenhofen).

5. Determinación de la concentración de producto en el sobran te de cultivo libre de células

La determinación de la concentración de producto y la comprobación de la pureza se realizó mediante HPLC en fase inversa, tal como se describe en el estado actual de la técnica (p. ej. los documentos WO 99/28346 y WO 03/45995).

6. Cultivo a tandas de la línea de células huésped para la determinación del consumo de nutrientes

Como línea de células huésped se utilizó una línea de células CHO que es deficitaria para el gen de dihidrofolato-reductasa y se describe en Urlaub und Chasin, 1980, PNAS 77:4216-4220. Estas células están depositadas en ATCC con el número ATCC CRL-9096. Se hizo una transformación estable de las células con un vector de expresión que controla la expresión de la eritropoyetina humana bajo el control del promotor CMV.

Primero se cultivaron estas células en un biorreactor para el cultivo por lotes, tal como se representa en la Fig. 1), a una temperatura de 37°C, un contenido de oxígeno del 40% de saturación en el aire y un pH de 7,2.

El medio utilizado para el cultivo se basaba en una mezcla 1:1 de DMEM y F12 (Invitrogen, Karlsruhe) con una concentración elevada en algunos aminoácidos y distintos aditivos, que se indican en la Tabla 1, y una concentración no limitante de glucosa y glutamina. Las células se cultivaron en un volumen de 2 l. Para la inoculación se tomaron durante la fase de crecimiento exponencial las células procedentes de un cultivo previo. La densidad de células de inoculación era aproximadamente de 2×10^5 células por milímetro. El cultivo se interrumpió cuando el contenido de oxígeno en el medio no se podía ya adaptar a un valor teórico mediante un aporte de oxígeno externo, y con ello se indicaba una limitación del cultivo y un final de la fase de crecimiento. Tras finalizar el cultivo se determinó la concentración de glucosa, lactato, amonio y aminoácidos en el medio de cultivo (v. Ejemplos 1-3).

7. Determinación del consumo de nutrientes para la obtención del concentrado de nutrientes

Para calcular la composición de aminoácidos del concentrado de nutrientes, se calcularon las tasas de consumo de sustrato específicas para los distintos aminoácidos durante la fase de crecimiento con el cultivo en el procedimiento por lotes. Las tasas de consumo de sustrato específicas se calculan en el proceso por lotes a partir de la ecuación siguiente:

$$qs = - \frac{S_1 - S_0}{t_1 - t_0} \cdot \frac{2}{X_0 + X_1}$$

Aquí t designa la duración del cultivo, x la densidad celular, s la concentración del sustrato y qs la tasa de consumo de sustrato específica. El sufijo 1 designa un valor en un determinado instante durante el cultivo, el sufijo 0 designa el valor en el momento inicial.

A continuación se dividen las tasas de consumo molares de los aminoácidos entre las tasas de consumo molares de la glucosa, con lo cual se obtiene una proporción que indica cuántos moles de cada aminoácido por mol de glucosa toman las células (vease Fig. 2). La porción pesada de los aminoácidos para los concentrados de nutrientes de las fermentaciones de tipo Fed-Batch se orientó a este perfil de consumo a partir de los cultivos por lotes y se representa en la Tabla 3.

8. Cultivo de células y obtención de proteínas recombinantes mediante el procedimiento según la invención en el método de Fed-Batch

Para el cultivo de tipo Fed-Batch se utilizó un biorreactor, tal como se representa en la Fig. 1b). Además se montó un radiador de salida (B. Braun) en la tapa del biorreactor. El enfriamiento se realiza mediante la conexión de un criostato externo (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach), cuya temperatura del agua se ajustó a 4°C. Una bomba peristáltica (Schlauchdosierpumpe Modulsystem 1000, Petrogas KG, Berlín) permitió el suministro controlado y dependiente del tiempo del concentrado de nutrientes. La bomba fue controlada por un ordenador mediante una señal analógica con una tensión de entre 0 V y 10 V. El programa correspondiente permitió la función de aporte de nutrientes representada en la ecuación 1.

$$F = F_0 + F_1 \times t \quad \text{Ecuación 1}$$

F_0 y F_1 son parámetros de libre elección, t el tiempo en horas desde la activación del aporte de nutrientes y F la tasa de flujo en milímetros por hora. F_0 se eligió de tal manera que al comienzo del aporte de nutrientes se cubrió el consumo. F_1 se eligió de tal manera que la tasa de flujo del aporte de nutrientes se había duplicado después de 24 horas tras el comienzo del aporte.

El cultivo de tipo Fed-Batch se inició con un volumen inicial de aprox. 1.000 ml y una densidad celular de entre 2×10^5 y 4×10^5 células por milímetro a partir de los cultivos previos. A diferencia del cultivo por lotes, antes de la inoculación se centrifugaron las células durante cinco minutos a 800 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus, Osterode) y después se volvieron a suspender en medio de partida fresco de Fed-Batch. Tras una breve fase de crecimiento (por regla general entre 16 y 22 horas) en el medio de partida, se inició el aporte de nutrientes con el concentrado, siendo por lo general la velocidad de aporte inicial correspondiente al consumo actual (determinado tal como se describe en el Ejemplo 7) y duplicándose en el plazo de un día. Las fermentaciones se finalizaron cuando la viabilidad de las células descendía por debajo del 90%.

El medio de partida para el cultivo de tipo Fed-Batch se correspondía con el medio para el cultivo por lotes, aunque contenía una menor concentración de glucosa y glutamina. Por lo tanto, se utilizó para la obtención de medio DMEM/F12 libre de glucosa y glutamina (fabricación especial, Applichem, Darmstadt), al que se añadieron pequeñas cantidades de estos dos sustratos. La concentración de glucosa en el medio de partida valía, por lo tanto, sólo 250 mg/l, la concentración de glutamina 50 mg/l. Sobre la composición del medio de partida, véase la Tabla 2.

Para el aporte de nutrientes se utilizó un medio que, referido a la cantidad de glucosa, estaba concentrado diez veces más frente al medio normal y que por lo tanto se designó como concentrado de nutrientes décuple. Para la obtención

de este concentrado de nutrientes se disolvió medio DMEM/F12 libre de NaCl (fabricación especial, Applichem, Darmstadt) en concentración doble. La concentración final de glucosa, que se compone de la glucosa contenida en el medio DMEM/F12 y la añadida, era de 40 g/l. Los aminoácidos se pesaron en proporción a la glucosa de manera correspondiente al consumo de las células previamente determinado. Otros aditivos tales como sulfato de hierro, etanolamina, putrescina y ácido aurincarboxílico se pesaron también conforme al factor de concentración del medio. La composición del medio se representa en la Tabla 3.

Para poder disolver completamente los concentrados de nutrientes, se dispuso primero una cantidad correspondiente de agua pura (aprox. 80% del volumen final) y con HCl 1 M se ajustó a un valor del pH inferior a pH 3. Agitando, se añadieron paso a paso los aminoácidos, después el medio DMEM/F12 libre de sal común y por último los restantes aditivos. Para disolver completamente todos los aminoácidos ácidos se aumentó después el valor del pH con NaOH 1 M hasta un pH 10,5. El precipitado blanco formado volvió a disolverse después de un ajuste final del valor del pH a un pH 7,5. Por último, se rellenó con agua pura hasta el volumen final deseado. Se realizó además la adición de una solución de vitamina (MEM-Vitamine, Biochrom KG, Berlín), de tal manera que se aumentó cinco veces la concentración de las vitaminas añadidas frente al medio estándar.

El aporte de nutrientes comenzó 17 horas después de la inoculación. Los parámetros valían primero $F_0 = 0,4$ l/h y $F_1 = 0,022$ ml/h². Sin embargo, para evitar un exceso de aporte de nutrientes a las células, el parámetro F_0 se corrigió a un valor de 0 ml/h 2,1 días después de iniciarse el aporte de nutrientes. Durante todo el curso del cultivo (12 días) se determinaron las concentraciones de células vivas y del total de células, la señal de oxígeno (señal de ajuste no normalizada para el medidor de flujo de masa de oxígeno) y las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, amonio y proteína recombinante, aunque no se usaron para adaptar el aporte de nutrientes al consumo. Los resultados de estas mediciones se representan en las Figuras 3-5.

Las Figuras muestran que con el aporte de medio dependiente del tiempo, la “metabolic shift” se alcanza aproximadamente seis días después de la inoculación ya que en ese momento la concentración de amonio y de lactato ya no aumenta, sino que más bien disminuye. No obstante, la concentración de proteína recombinante y el número de células vivas aumentan durante todo el desarrollo del cultivo.

9. Enfoque isoeléctrico

El enfoque isoeléctrico se llevó a cabo según se describe en la European Pharmacopoeia, 4a. edición 2002, pág. 73 y siguientes, después de haber purificado el medio de cultivo según el procedimiento que se describe en el estado actual de la técnica. El resultado del enfoque isoeléctrico se representa en la Figura 6.

10. Electroforesis capilar en zona (CZE)

La electroforesis capilar en zona para determinar la porción de eritropoyetina con un elevado grado de sialilación en el contenido total de eritropoyetina se realizó del modo descrito en la European Pharmacopoeia, 4ª edición 2002, 01/2002:1316.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de proteínas recombinantes en una línea de células huésped eucarióticas, produciéndose el cultivo de las células huésped bajo el aporte continuo de nutrientes, **caracterizado** porque la velocidad de flujo del aporte de nutrientes se aumenta en dependencia lineal con la duración del aporte de nutrientes.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se trata de un procedimiento de tipo Fed-Batch.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, utilizándose en el aporte de nutrientes un medio distinto al medio de partida, presentando el medio de partida una concentración de glucosa y glutamina menor que el medio utilizado para el aporte de nutrientes.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, utilizándose para el aporte de nutrientes un concentrado de nutrientes.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el aporte de nutrientes no comienza al mismo tiempo que la inoculación.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que antes del cultivo de las células se determina las tasas de consumo de nutrientes.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la determinación de las tasas de consumo se realiza en un procedimiento por lotes.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que durante el cultivo no se determinan las tasas de consumo de los nutrientes.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las células son células de mamífero.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que las células de mamífero son células de primates o de roedores.

11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 ó 10, en el que las células son células CHO.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las células huésped se cultivan durante un período de más de seis días.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que al final del cultivo la densidad celular es $\geq 10^7$ células por ml de medio de cultivo.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que se alcanza una concentración de proteína recombinante ≥ 60 mg/l de medio de cultivo.

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la proteína recombinante es una proteína glicosilada.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la proteína recombinante presenta un elevado grado de sialilación.

17. Procedimiento según las reivindicaciones 15 ó 16, en el que la proteína recombinante es eritropoyetina.

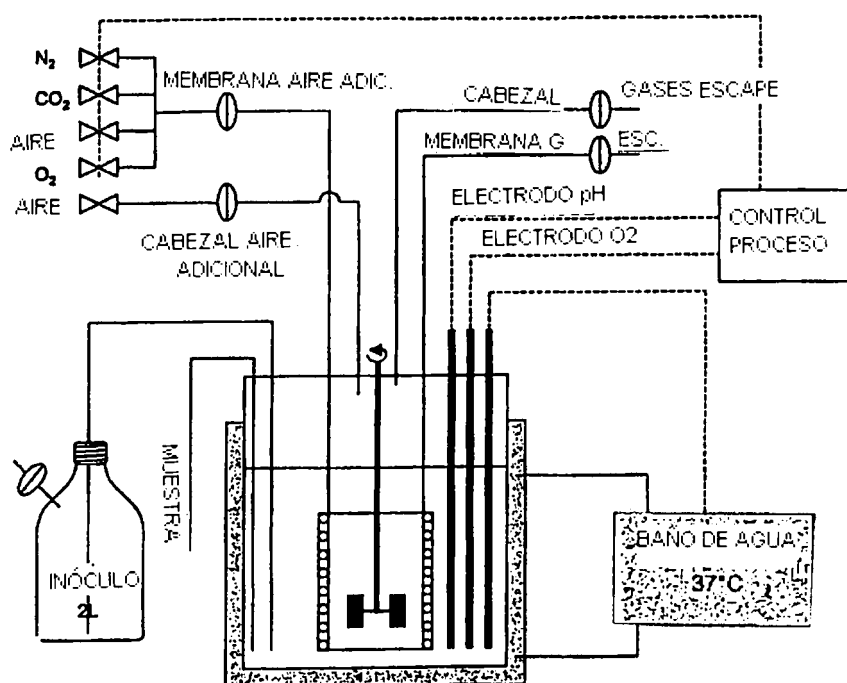


Fig . 1 a)

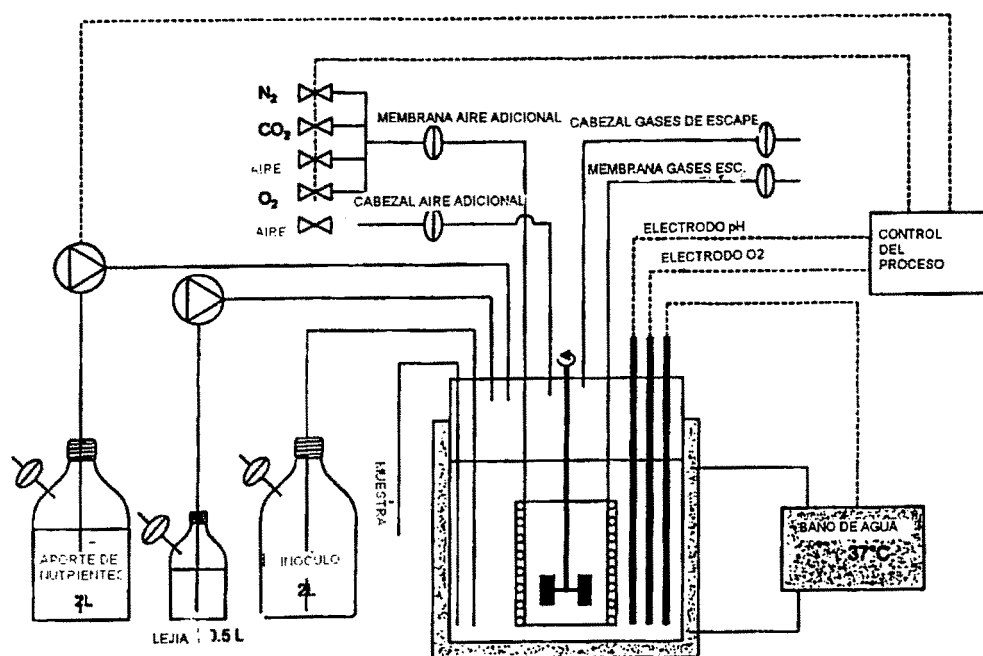


FIG. 1 b)

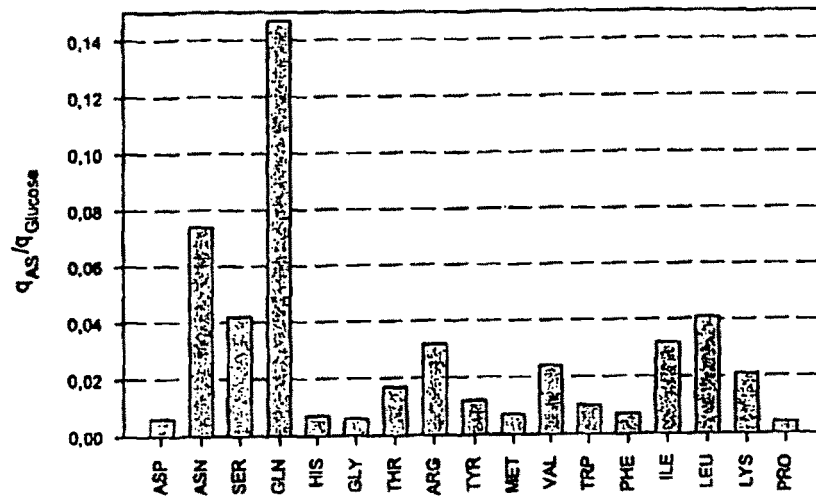


Fig. 2

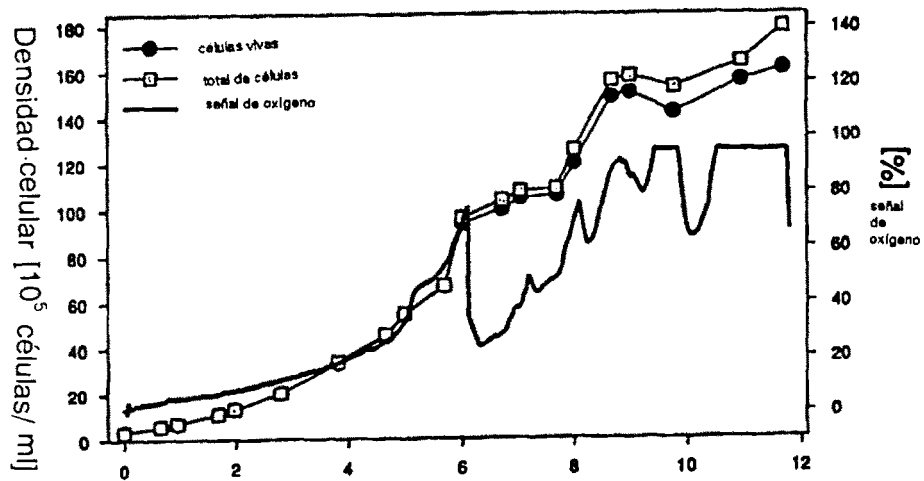


FIG. 3

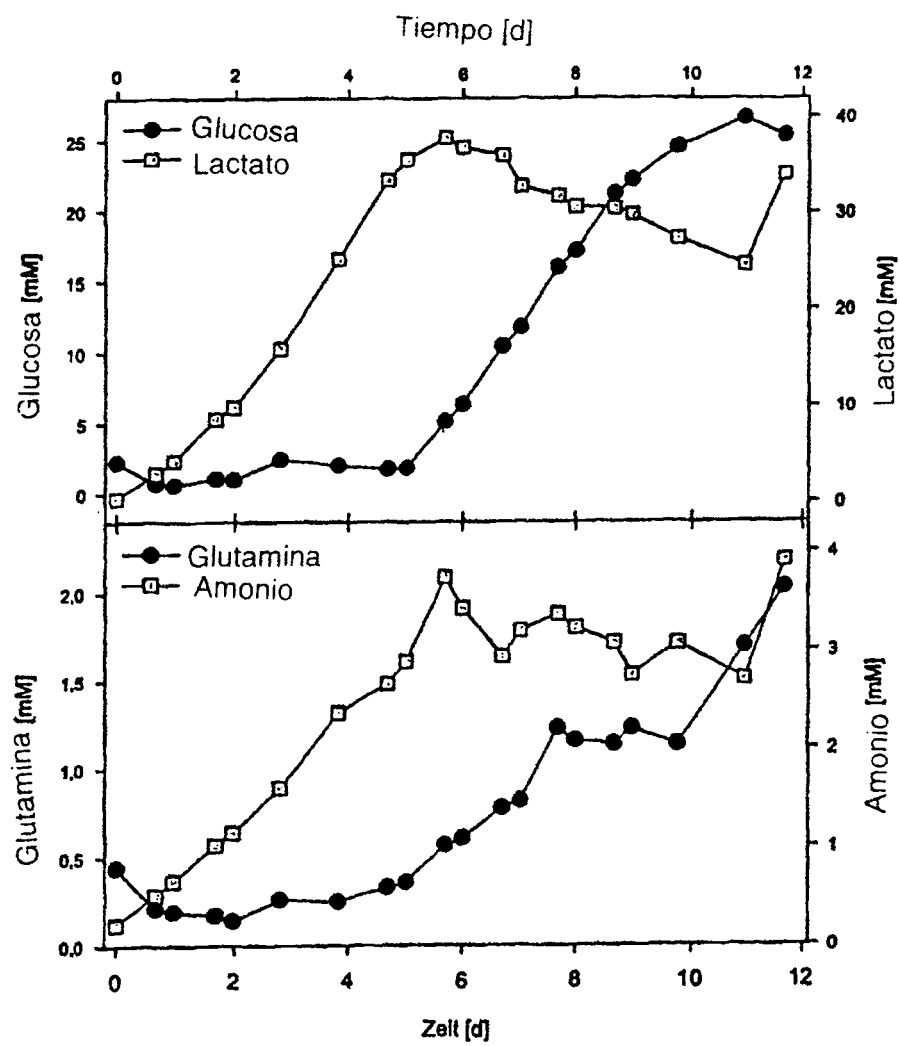


FIG. 4

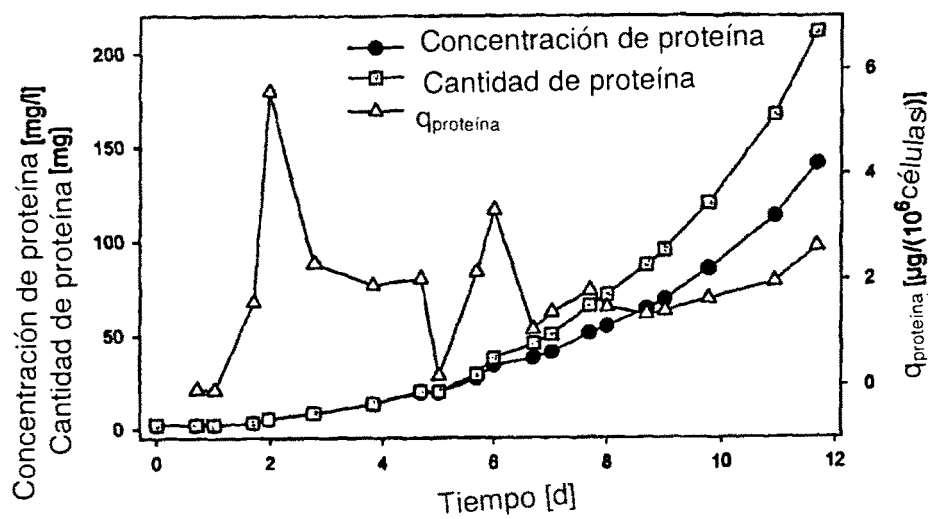


FIG . 5

IEF/Western

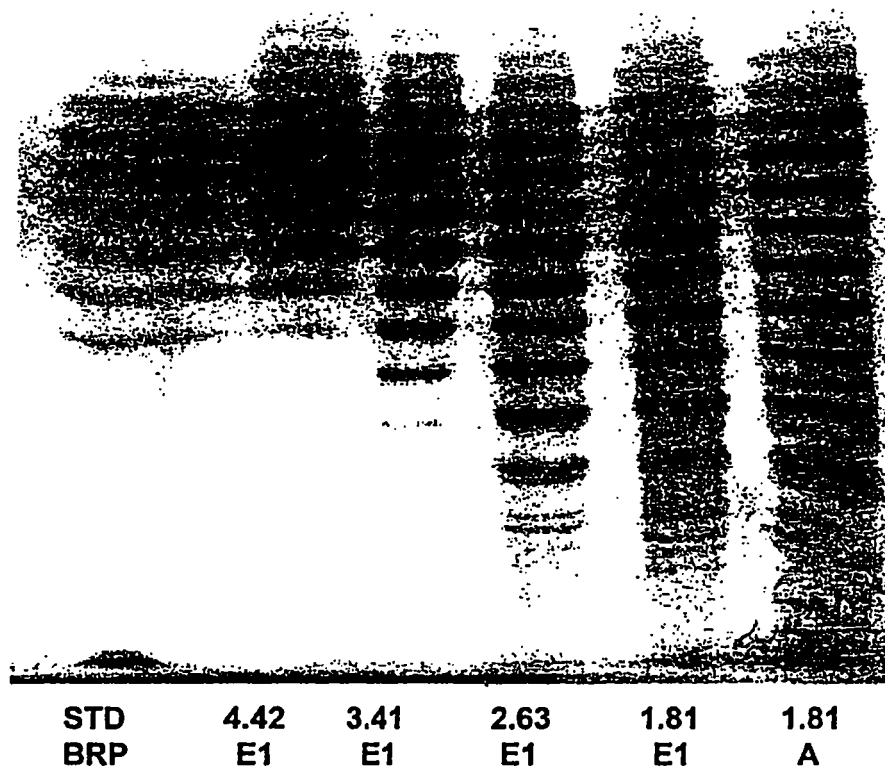


Abb. 6