



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 340 377**

⑮ Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03767406 .6**

⑯ Fecha de presentación : **07.11.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1585810**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

⑭ Título: **Procedimiento para el cultivo de células para la producción de substancias.**

⑮ Prioridad: **27.11.2002 DE 102 55 508**

⑰ Titular/es: **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2010

⑰ Inventor/es: **Link, Thomas;**
Essers, Ruth;
Skopnik, Kerstin;
Gätgens, Jochen;
Noll, Thomas y
Wandrey, Christian

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2010

⑰ Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 340 377 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el cultivo de células para la producción de substancias.

5 La invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células para la producción de substancias según el concepto general de la reivindicación 1.

10 En la producción de substancias, en particular de proteínas, se emplean cultivos celulares en procesos fermentativos. A este respecto, dichos procesos se diferencian de aquellos en que los cultivos celulares permanecen genéticamente invariables, y forman algunos productos de metabolismo, y de aquellos en que los organismos se modifican genéticamente de tal forma que o bien multiplican substancias propias, por ejemplo proteínas, o bien producen substancias extrañas, por ejemplo proteínas. Los organismos que producen las substancias se alimentan para ello con un medio nutritivo, el cual garantiza la supervivencia de los organismos y hace posible la producción del compuesto diana deseado. Para esta finalidad se conoce un gran número de medios de cultivo, que hacen posible la fermentación. Uno 15 de los componentes más importante de los medios de cultivo es la glucosa. Según el estado actual de la técnica, se procura conseguir en una mezcla de fermentación que se mantenga una mínima concentración de glucosa correctamente, para optimizar el rendimiento del compuesto diana. La solicitud de patente japonesa 001 101 882 A, da a conocer un procedimiento de cultivo para células de mamíferos en el cual se mantiene constante una mínima concentración de 0,2 20 mmoles/litro de glucosa. La patente US 544 39 68 da a conocer un procedimiento de cultivo en el cual tiene lugar una limitación de la glucosa. El procedimiento no conduce sin embargo a un mayor grado específico de producción de las células respecto a una alimentación no limitante.

En la patente WO 98/41611 se describe un método para el cultivo de células que crecen en suspensión, mediante la adición de glucosa, en donde la cantidad de glucosa añadida se aadecua siempre al estado momentáneo del cultivo.

25 Una finalidad de la invención es el de descubrir un procedimiento para el cultivo para la creación de células, con el cual aumente la productividad de las células individuales en el producto, y cómo hacer posible una alta densidad celular. Debe ser posible un alto rendimiento de la relación espacio/tiempo en el producto.

30 El procedimiento debe ser particularmente sencillo en su ejecución, unido a un mínimo gasto de medidas y de reglas, y particularmente económico.

Partiendo del concepto general de la reivindicación 1, se resuelve sorprendentemente la tarea, efectuando el cultivo de una línea celular que produce la substancia, mediante la alimentación con un medio nutritivo de manera que se 35 ajuste en la solución del cultivo una limitación de glucosa. El grado de limitación de la glucosa puede definirse como la relación entre el grado de consumo específico de glucosa observado y el máximo grado de consumo de glucosa conocido para estas células. El grado de limitación de glucosa $DGL = qGlc/qGlc_{máx}$ ($qGlc$ = grado de consumo específico de glucosa observado en el momento; $qGlc_{máx}$ = máximo grado de consumo específico de glucosa conocido para estas células). El DGL está entre los límites $DGL_{mantenimiento}$ y 1, en donde el $DGL_{mantenimiento}$ significa la limitación 40 completa del crecimiento y 1 significa ninguna limitación o respectivamente, el exceso completo de glucosa.

45 Juntamente con la limitación de glucosa tiene lugar un continuo retroceso de la concentración de glucosa residual en una concentración estacionaria de la solución de cultivo, la cual es mayor de 0 mmoles/litro pero menor de 1 mmol/litro, de preferencia menor de 0,5 mmoles/litro. Hay que hacer notar que con la disminución del DGL se puede obtener otro aumento de la densidad de células vivas en el recipiente de cultivo. Con una limitación creciente de glucosa converge entonces la densidad celular hacia un valor máximo. De ello resulta que el grado de limitación de la glucosa converge hacia un valor mínimo, con lo cual el DGL según la invención es mayor o igual que el DGL que conduce al mantenimiento de las células (metabolismo de mantenimiento).

50 $DGL_{mantenimiento} = qGlc_{mantenimiento}/qGlc_{máx}$ ($qGlc_{mantenimiento}$ = en el caso de metabolismo de mantenimiento puro, grado de consumo específico de glucosa observado; $qGlc_{máx}$ = grado de consumo máximo de glucosa específico conocido para estas células), y la inferior a 0,5, de preferencia inferior a 0,4, con particular preferencia inferior a 0,3.

55 Es característico sin embargo, que con la disminución de la concentración de glucosa no se logra ninguna disminución de la concentración de células en la solución. Con una creciente limitación de las glucosa, a saber con valores decrecientes del DGL , aumenta la productividad específica de una célula. Puesto que la densidad de células vivas en el recipiente de cultivo no disminuye, esto conduce a un aumento del rendimiento espacio-tiempo. Con la incorporación de la limitación de las glucosa, tiene lugar fenomenológicamente una disminución del grado de formación específico de lactato. El grado de formación de lactato converge hacia un valor mínimo. Esto conduce a que la concentración 60 de lactato residual en el recipiente de cultivo disminuya, máximo hasta 0. Con la limitación de la glucosa tiene lugar pues, una alteración del metabolismo celular.

65 Es importante que antes del empleo de la limitación de la glucosa no tenga lugar ninguna otra limitación de otro substrato. Por lo tanto el medio de crecimiento debe estar creado de modo que la glucosa sea limitada en primer lugar.

Con el procedimiento según la invención se aumenta el rendimiento espacio/tiempo para una densidad celular dada. Mediante el procedimiento según la invención la cantidad de glucosa disponible por célula disminuye de forma que la glucosa se incorpora principalmente al metabolismo de mantenimiento y unido a la misma el producto, y se incorpora

- menos en el crecimiento celular. El procedimiento según la invención no requiere por lo tanto ninguna regulación del suministro de glucosa, de manera que el procedimiento es particularmente fácil, puesto que puede prescindirse de una costosa regulación de la glucosa. Puesto que es necesaria una menor entrada del medio, se ahorra en el coste de la glucosa, puesto que es necesaria menos glucosa. Además, se logra una muy alta concentración del producto.
- 5 Esto puede conducir a una disminución de los costes de retoque. El procedimiento según la invención hace posible en particular el aumento de la producción de proteínas, sin que además deba modificarse genéticamente una línea celular para la transformación del procedimiento según la invención. El aumento del título del producto hace posible la producción de la cantidad deseada de producto en un volumen de cultivo más pequeño, lo cual conduce a unos menores costes de inversión.

10 El procedimiento según la invención puede efectuarse según los siguientes pasos de procedimiento:

Las células deben cultivarse en un procedimiento continuo con separación de las células, por ejemplo, con un filtro centrífugo (cultivo por perfusión). Para ello son apropiadas todas las clases corrientes de recipientes de cultivo, como por ejemplo una caldera con agitación, y mecanismos de separación de las células, como por ejemplo filtros centrífugos, ultrasonidos o decantadores. De preferencia el sistema de cultivo debe hacer posible altas densidades celulares. De preferencia se efectúa una separación de las células, con el fin de que la densidad celular cuando actúe la limitación de la glucosa no pueda disminuir. Esto conduce a que cuando la densidad de las células vivas aumenta y se mantiene la alimentación de la glucosa, el DGL disminuye de nuevo. Una alta densidad celular hace posible una disminución del DGL por debajo de un valor de 0,4 con un grado de caudal ajustado a un orden de magnitud del grado máximo de crecimiento. Así pueden emplearse por ejemplo grados de caudal de 0,03 - 0,05 h^{-1} para las células CHO MUC2-GFP-C-term empleadas, así como también para las células CHO/MUC1-IgG2a PH3744/25 empleadas.

Para conseguir una disminución del DGL, se puede proceder a la estrategia de alimentación con glucosa según lo siguiente: la cantidad de glucosa a suministrar no aumenta con un aumento de la densidad de células vivas para evitar una limitación de las glucosa. Antes bien, la cantidad de glucosa a suministrar durante el proceso se mantiene constante desde el principio. Por esto la cantidad de glucosa a suministrar debe escogerse de tal manera que el DGL no sobrepase los valores requeridos, a saber que el DGL sea $\leq 0,5$, de preferencia $\leq 0,4$, con particular preferencia $\leq 0,3$. De ello resulta que la cantidad de glucosa a suministrar no es de preferencia superior al 50%, con más preferencia no superior al 35%, lo cual es lo que el sistema puede consumir como máximo para un número de células vivas que cabe esperar en una convencional conducción del proceso no limitador de glucosa. Después de la modificación del metabolismo de las células (metabolismo de lactato y productividad), puede elevarse lentamente la cantidad de glucosa a suministrar, aunque no debe ser posible un DGL superior a 0,5, de preferencia no superior a 0,4. Esto conduce a un posterior aumento de la densidad de las células vivas manteniendo una alta productividad y con ello un rendimiento mayor del espacio/tiempo. La cantidad de glucosa suministrada puede ser influida en un proceso continuo mediante la velocidad de entrada del medio y la concentración de glucosa en el medio de alimentación. Es decisivo que el caudal de masa de glucosa transportada durante el proceso no aumente o aumente solamente de tal medida que el DGL alcance un valor más pequeño de 0,5, de preferencia menor de 0,4, ó quede por debajo de estos valores y ya no los sobrepase.

40 En las reivindicaciones subordinadas se mencionan ventajosos perfeccionamientos.

A partir de ahora, la invención se describirá en sus detalles individuales.

45 Las figuras muestran resultados de pruebas como ejemplo.

En las mismas se muestra:

Figura 1: Aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y representación del grado de fluido medio [h^{-1}] con respecto al tiempo de proceso [h] para la producción de MUC1-IgG2a de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en un reactor de perfusión.

55 Figura 2: Productividad específica de las células MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{h}^*\text{E9}$] y DGL con respecto al tiempo de proceso en el reactor de perfusión.

Figura 3: Aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y mM de glucosa residual, aplicado respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC1-IgG2a de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en el reactor de perfusión.

60 Figura 4: Concentración de glucosa y lactato así como concentración de glucosa en la entrada del medio [mmoles/litro], aplicada respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC1-IgG2a de células CHO MUC1/IgG2a PH3744 en el reactor de perfusión.

Figura 5: aumento de la concentración de MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{ml}$] y qMUC1-IgG2a [células $\mu\text{g}/\text{h}^*\text{E9}$] con respecto al tiempo [h], para la producción de MUC1-IgG2a a partir de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en el reactor de perfusión.

65 Figura 6: aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y representación del grado de caudal del medio [h^{-1}] con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en el reactor de perfusión.

ES 2 340 377 T3

Figura 7: productividad específica de MUC2-GFP-C-term [n moles/células h*E9] y DGL con respecto al tiempo de proceso, en el reactor de perfusión.

Figura 8: aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y glucosa residual [mM], aplicado con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en el reactor de perfusión.

Figura 9: concentración de glucosa y de lactato así como concentración de glucosa en la entrada del medio [mmol/litro], aplicada con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en el reactor de perfusión.

Figura 10: aumento de la concentración de MUC2-GFP-C-term [nM] y qMUC2-GFP-C-term [nmol/células h*E9] con respecto al tiempo [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en el reactor de perfusión.

15

Además, en la tabla 1 se muestran los datos del ensayo a partir del empleo del procedimiento según la invención con las células CHO MUC1/IgG2a PH 3744/25.

20 En la tabla 2 se representan los datos del ensayo a partir del empleo del procedimiento según la invención con las células CHO MUC2-GFP-C-term.

El procedimiento según la invención puede efectuarse con diferentes líneas celulares de producción. Las líneas celulares pueden emplearse como tipo salvaje o como células recombinantes genéticamente modificadas. La modificación genética puede tener lugar por ejemplo por inserción de genes adicionales del mismo organismo o de otro organismo en el ADN, o de un vector, o en el reforzamiento de la actividad o respectivamente expresión de un gen mediante la incorporación de un promotor activo, por ejemplo a partir del CMV. Los genes pueden codificar diferentes proteínas, como por ejemplo proteínas como proteínas de fusión, o como anticuerpos.

30 Pueden citarse como ejemplo las siguientes líneas celulares: células de mamíferos, como líneas de células CHO, como por ejemplo CHO-K1, BHK, como BHK-21, hibridomas, NS/O, otras células de mieloma, y células de insectos u otras células superiores. Es particularmente preferido el empleo de células que de preferencia, no copulan con el crecimiento.

35 Una línea celular CHO recombinante cuya productividad puede aumentar con el procedimiento según la invención, es la línea celular CHO MUC1/IgG2a, PH 3744/25, con la cual puede segregarse la glicoproteína MUC1-IgG2a. Otra línea celular CHO, a saber la CHO MUC2-GFP-C-term, es capaz de segregar de forma creciente una proteína de fusión MUC2-GFP-C-term, cuando es sometida al procedimiento según la invención.

40 Como medio de cultivo puede emplearse en principio cualquier medio que contenga glucosa, que no sea limitante con respecto a otros componentes. A manera de ejemplo puede citarse el ProCHO4-CDM. Pueden emplearse también medios a base de recetas ya conocidas como por ejemplo el IMDM, DMEM ó F12 de Ham, los cuales han sido optimizados por el procedimiento según la invención, de forma que solamente hay limitación para la glucosa. Esto puede lograrse por ejemplo concentrando más los otros componentes en relación con la glucosa. En general, es también posible dosificar la glucosa separadamente del medio.

45 La zona del pH está de preferencia entre 6,7-7,7, con particular preferencia entre 7-7,3. Sin embargo, son también posibles otros intervalos de pH.

50 El intervalo de temperaturas está de preferencia entre 35°C-38,5°C, con particular preferencia 37°C para CHO MUC1-IgG2a. Sin embargo son también posibles otros intervalos de temperatura, como por ejemplo < 35°C, en los que no se produzca la destrucción irreversible del producto.

55 Con el procedimiento de cultivo según la invención se pueden producir substancias como por ejemplo, glicoproteínas, proteínas de fusión, anticuerpos, proteínas en general, de las cuales pueden citarse como ejemplo, MUC1-IgG2a, MUC2-GFP-C-term, EPO, interferonas, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, PA, inmunoglobulinas o fragmentos de inmuno-globulinas.

60 La figura 1 muestra el transcurso de la densidad de células vivas (cv) en células CHO/MUC1-IgG2a y el grado de caudal del medio (D) con respecto al tiempo de proceso (h), en el reactor de perfusión. En la misma, son:

- grado de caudal del medio (litros/hora), y
- densidad de las células vivas.

65

ES 2 340 377 T3

La figura 2 muestra la productividad específica de MUC1-IgG2a (qMUC1-IgG2a) y DGL con respecto al tiempo de proceso, en el reactor de perfusión. En el mismo son:

- 5 productividad específica ($\mu\text{g}/\text{células hE9}$),
 DGL (grado de limitación de la glucosa)

10 La figura 3 muestra una gráfica en la cual, en el lado izquierdo está representado el número de células vivas [ml^{-1}] y en el lado derecho está representada la concentración de la glucosa residual [mM] respecto al tiempo de proceso [h] para la producción de MUC1-IgG2 en CHO MUC/IgG2a PH3744/25. En la misma son:

- 15 número de células vivas, y
 glucosa

En la figura 4, está representada la concentración de glucosa y de lactato, así como la concentración de glucosa en la entrada del medio [mmoles/litro] respecto al tiempo de proceso [h]. En la misma, las curvas son:

- 20 curvas de la concentración de lactato, y
 curvas de la concentración de glucosa.
25 23,9 mmoles/litro concentración de glucosa en la entrada del medio (grado de caudal $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$).

En la figura 5, está representada la concentración de MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{ml}$] sobre el lado izquierdo, así como qMUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/(\text{células h}^*E9)$] sobre el lado derecho de la gráfica, respecto al tiempo [h]. En la misma son:

- 30 productividad específica q de MUC1-IgG2a ($\mu\text{g}/\text{células hE9}$), y
 concentración de MUC1-IgG2a (mg/litro).

35 La figura 6 muestra el transcurso de la densidad de células vivas (cv) de células CHO/MUC2-GFP y el caudal del medio (\bar{D}) respecto al tiempo de proceso (h), en el reactor de perfusión. En la misma, son:

- 40 caudal del medio (litros/hora), y
 densidad de las células vivas (litros/ml)

45 La figura 7 muestra la productividad específica de MUC2-GFP-C-term (qMUC2-GFP-C-term) y DGL respecto al tiempo de proceso, en el reactor de perfusión. En la misma son:

- productividad específica (nmoles/células hE9),
 DGL (degree of glucose limitation) ("grado de limitación de la glucosa")

50 La figura 8 muestra una gráfica en la cual, en el lado izquierdo está representado el número de células vivas [ml^{-1}] y en el lado derecho está representada la concentración de la glucosa residual [mM] respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term en CHO MUC/IgG2a PH3744/25. En la misma son:

- 55 número de células vivas, y
 glucosa

60 En la figura 9, está representada la concentración de glucosa y de lactato, así como la concentración de glucosa en la entrada del medio [mmoles/litro] respecto al tiempo de proceso [h]. En la misma, las curvas son:

- curvas de la concentración de lactato, y
 curvas de la concentración de glucosa.
65 23,9 mmoles/litro concentración de glucosa en la entrada del medio (grado de caudal $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$).

ES 2 340 377 T3

En la figura 10 la concentración de MUC2-GFP-C-term [nM] está representada sobre el lado izquierdo así como qMUC2-GFP-C-term [nmoles/(células h*E9)] está representado sobre el lado derecho de la gráfica respecto al tiempo [h]. En la misma son:

- 5 • productividad específica q de MUC2-GFP-C-term (nmoles/células hE9), y
 ◊ concentración de MUC2-GFP-C-term (nM).

10 La figura 1 muestra el procedimiento según la invención como ejemplo correspondiente a la alimentación de glucosa. En un cultivo de perfusión en continuo, se alimenta una cantidad constante de glucosa. En el ejemplo mostrado esto se logra mediante un caudal constante del medio, por lo que la concentración de glucosa en la entrada del medio es constante. El grado de caudal del medio no aumenta al aumentar la densidad de células vivas. El procedimiento empezo como un procedimiento discontinuo por partidas antes de empezar el procedimiento en forma continua.

15 La figura 2 muestra que en esta forma de procedimiento, el DGL disminuye en el transcurso del procedimiento, y finalmente alcanza un valor por debajo de 0,4. Mientras esto sucede, aumenta la productividad específica y alcanza finalmente un valor de alrededor de 4 veces mayor que el valor del DGL por debajo de 0,4.

20 A partir de la figura 3 se desprende que en el procedimiento según la invención la densidad de células vivas corre hacia un valor máximo el cual puede mantenerse a continuación, mientras que la concentración de glucosa residual en el transcurso del ensayo va hacia cero. Esto ocurre aunque la glucosa se incorpore. Durante la disminución de la concentración de glucosa residual empieza a disminuir la absorción específica de glucosa por el organismo. Mientras tanto el número de células vivas puede todavía aumentar. Paralelamente al retroceso de la absorción específica de glucosa, disminuye también la formación específica de lactato, lo cual conduce en primer lugar a un aumento ralentizado, y a continuación a una caída de la concentración de lactato en el recipiente de cultivo. Finalmente la concentración de lactato en el recipiente de cultivo va hacia cero, como se desprende de la figura 4. Existe por lo tanto una clara alteración del metabolismo de las células. Como se desprende de la figura 5, unido a la transformación del metabolismo de las células tiene lugar un aumento de la productividad específica de aproximadamente 4 veces respecto al momento anterior a la transformación del metabolismo de las células. El aumento de la productividad específica con por lo menos las densidades de las células constantes o incluso todavía crecientes, durante la fase descrita, conduce finalmente a un marcado aumento del título del producto en el sobrenadante del cultivo, como se desprende de la figura 5, y con ello a un aumento del rendimiento espacio/tiempo.

35 La tabla 1 muestra datos de la fermentación de MUC1-IgG2a.

Análogamente a las figuras 1 a 5, las figuras de 6 a 10 describen los resultados del empleo del procedimiento según la invención con las células CHO MUC2-GFP-C-term.

40 La tabla 2 muestra datos de la fermentación de MUC2-GFP-C-term.

La técnica de producción puede hacer que el procedimiento funcione según la invención con el procedimiento de perfusión que se acaba de describir, pero puede funcionar además también con el sistema “Fed Batch” (“alimentación por partidas”) (procedimiento de alimentación).

45 En un funcionamiento por Fed-Batch, el cultivo de producción, es abastecido una vez o repetidas veces, respectivamente por partidas o en continuo con un medio que contiene glucosa o una solución de glucosa por separado, de forma y manera que el DGL está de preferencia por debajo del valor 0,5, con particular preferencia por debajo de 0,4 y todavía con mayor preferencia por debajo de 0,3. Es posible también aquí un “Fed Batch” repetitivo.

50 Tanto en el sistema de procedimiento por perfusión como también en el sistema Fed-Batch, el proceso puede empezar en todas las formas de procedimiento generalmente conocidas. Así antes del principio de la forma de procedimiento según la invención, el cultivo puede funcionar como por partidas, como Fed Batch o como procedimiento en continuo, con o también sin separación de las células.

55

60

65

ES 2 340 377 T3

TABLA 1
Datos para la fermentación de MUC1-IgG2a

5	Tiempo de proceso	cv	D	Alimentación de glucosa	Glucosa	Lactato	MUC1-IgG2a	gMUC1-IgG2a	DGL
10	H	1/mol	1/h	mmol/l	mmol/l	mmol/l	µg/ml	µg/(h*E9)	
	0	2,23E+05	0	0	22,07	2,5	2,62		
15	16,63	2,83E+05	0	0	20,89	5,1	3,59	0,21	0,92
	40,52	6,48E+05	0	0	16,75	10,84	5,77	0,14	0,99
	68	1,78E+06	0	0	8,74	20,1	14,21	0,17	0,61
20	94	2,14E+06	0,035	23,89	8,08	19,48	15,49	0,30	1,00
	120	3,70E+06	0,035	23,89	5,84	22,35	18,02	0,22	0,72
25	136,5	4,68E+06	0,035	23,89	4,30	22,02	19,95	0,17	0,62
	163,5	7,02E+06	0,035	23,89	3,17	22,66	22,67	0,14	0,40
	187,5	6,96E+06	0,035	23,89	1,79	20,77	22,44	0,11	0,44
30	215,5	8,85E+06	0,035	23,89	1,04	17,46	28,24	0,13	0,35
	264,75	1,30E+07	0,035	23,89	-	8,45	67,03	0,22	0,24
35	287	1,54E+07	0,035	23,89	-	5,25	89,42	0,22	0,20
	310	1,64E+07	0,035	23,89	-	2,77	113,28	0,25	0,19
	331	2,27E+07	0,035	23,89	-	1,24	133,80	0,24	0,14
40	352,4	1,45E+07	0,035	23,89	-	0,82	152,87	0,29	0,21
	376,3	1,42E+07	0,035	23,89	-	0,53	182,52	0,45	0,22
45	404,4	1,58E+07	0,035	23,89	-	0,44	218,51	0,51	0,20
	428	1,78E+07	0,035	23,89	-	0,58	241,75	0,50	0,17
	448,4	2,08E+07	0,035	23,89	-	0,55	305,39	0,55	0,15
50	473,63	1,35E+07	0,035	23,89	-	0,55	290,52	0,60	0,23
	496,8	9,30E+06	0,035	23,89	-	0,51	274,94	0,85	0,33
55	521,82	1,53E+07	0,035	23,89	-	0,56	301,12	0,87	0,20

ES 2 340 377 T3

TABLA 2

Datos para la fermentación de MUC2-GFP-Cterm

	Tiempo de proceso h	Número de células vivas 1/ml	D 1/h	Alimentación de glucosa mmol/l	Glucosa mmol/l	Lactato mmol/l	MUC2-GFP -Cterm nM	Producto q nmol h*E9	DGL
5	0,5	7,50E+04	0	0	21,37	3,12	0,00		
10	106	1,80E+06	0	0	4,25	21,1	1,66	0,01	0,44
15	106,01		0,035	23,89			8,92		
20	130	2,20E+06	0,035	23,89	9,36		7,71	0,14	0,66
25	154	2,90E+06	0,035	23,89	8,32	18,23	10,72	0,05	1,00
30	182,38	6,83E+06	0,035	23,89	5,58	19,28	14,08	0,17	0,53
35	212,9	1,19E+07	0,035	23,89	1,65	18,78	26,15	0,12	0,33
40	237,2	1,44E+07	0,035	23,89	0,54	13,84	38,37	0,11	0,26
45	254	1,48E+07	0,035	23,89	0,52	9,81	50,08	0,13	0,24
50	278	120E+07	0,035	23,89	-	5,19	65,63	0,20	0,35
55	302	1,40E+07	0,035	23,89	-	2,05	81,53	027	0,29
60	326	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,7	88,03	0,30	0,34
	349,9	2,16E+07	0,035	23,89	-	0,33	104,60	0,28	0,19
	374	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,26	104,03	0,28	0,34
		0,035	23,89	-			84,47		
		0,035	23,89	-			75,16		
	446	1 10E+07	0,035	23,89	-	0,19	64,81		0,37
	470	1,10E+07	0,035	23,89	-	0,53	52,36		0,37
	494	1,40E+07	0,035	23,89	-	0,32	69,63	0,24	0,29
	518	1,30E+07	0,035	23,89	-		79,34	0,26	0,32
		0,035	23,89	-			93,94		
		0,035	23,89	-		0,35	104,57		
	595,8	1,01 E+07	0,035	23,89	-	0,25	113,89		

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el cultivo de células de mamíferos para la producción de substancias, **caracterizado** porque, 5 se cultivan unas células de mamíferos que producen una substancia, con una limitación de glucosa, en donde el grado de limitación de la glucosa, DGL, es

$$DGL = qGlc/qGlc_{máx}$$

10 siendo

$qGlc$ = grado de consumo específico de glucosa observado en el momento, y

15 $qGlc_{máx}$ = grado de consumo máximo específico de glucosa conocido para estas células,

mayor que el grado de limitación de glucosa que conduce al mantenimiento exclusivo, $DGL_{mantenimiento}$, de las células, y es $\leq 0,5$, en donde

20 $DGL_{mantenimiento} = qGlc_{mantenimiento}/qGlc_{máx}$,

siendo

25 $qGlc_{mantenimiento}$ = en un metabolismo de mantenimiento puro, grado de consumo específico de glucosa observado, y $qGlc_{máx}$ = máximo grado de consumo específico de glucosa conocido para estas células, en donde la cantidad de glucosa suministrada durante el procedimiento se mantiene constante.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, el DGL es $\leq 0,4$ ó $\leq 0,3$.

35 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque, la cantidad de glucosa suministrada no es mayor del 50% de la que pueden consumir como máximo sin la limitación de la glucosa, el número máximo de células esperadas.

40 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque, la cantidad de glucosa suministrada no es mayor del 35%, de la que pueden consumir como máximo sin la limitación de glucosa, el número máximo de células esperadas.

45 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque, se emplea un componente del grupo de las líneas celulares CHO, como por ejemplo CHO-K1, BHK, como por ejemplo BHK-21, hibridoma, células de mieloma, como por ejemplo NS/O, otras células de mamíferos y células de insectos u otras células superiores.

50 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque, las substancias producidas son proteínas o polipéptidos.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque, las substancias producidas son proteínas de fusión, la proteína de fusión MUC1-IgG2a, la glicoproteína MUC2-GFP-C-term, EPO, interferones, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, PA, inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulinas u otras glicoproteínas.

55 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque, se emplea un medio que contiene glucosa el cual, respecto a otros componentes de substancias nutritivas no efectúa ninguna otra limitación antes del comienzo de la limitación de glucosa.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque, la glucosa se suministra separadamente de los otros substratos.

60 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque, se efectúa en un intervalo de pH de 6,7-7,7.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque, se efectúa en un intervalo de temperaturas entre 35°C y 38,5°C.

65 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque, se efectúa de acuerdo con la modalidad continua de procedimiento, con por lo menos una separación parcial de las células.

ES 2 340 377 T3

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque, se efectúa de acuerdo con el procedimiento de Fed-Batch.

5 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque, da comienzo como un procedimiento por partidas y se continúa como un procedimiento de Fed-Batch o un procedimiento en continuo.

15 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque, se efectúa con células productoras que no copulan con el crecimiento.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

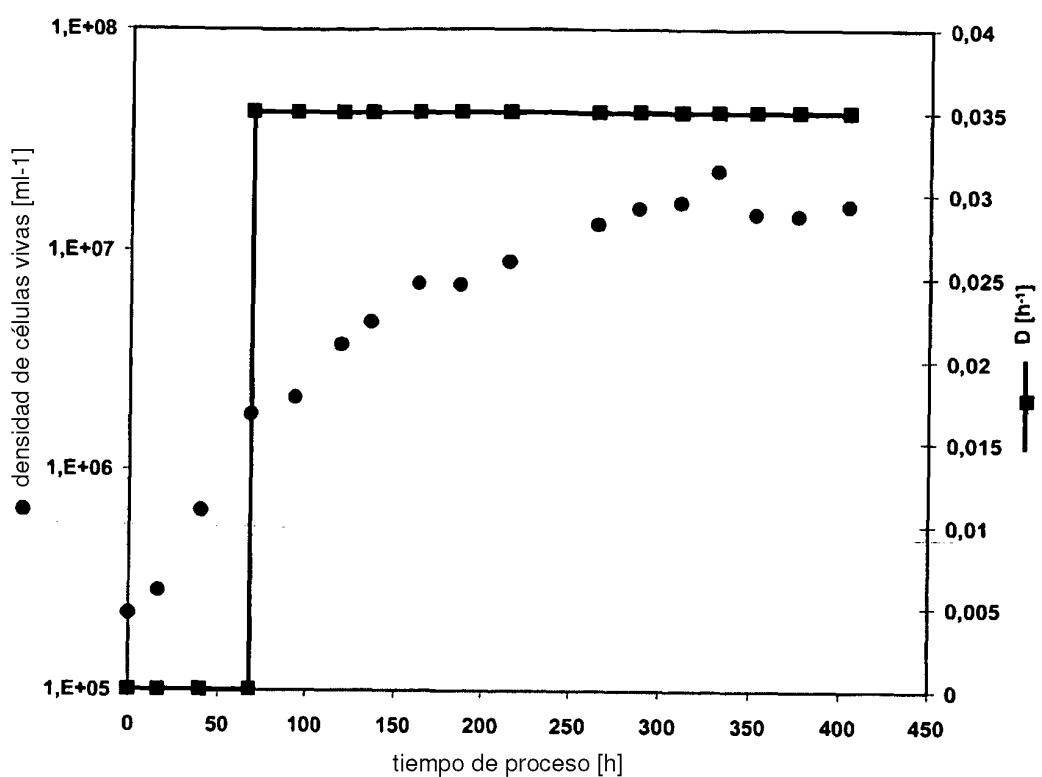


Fig. 1

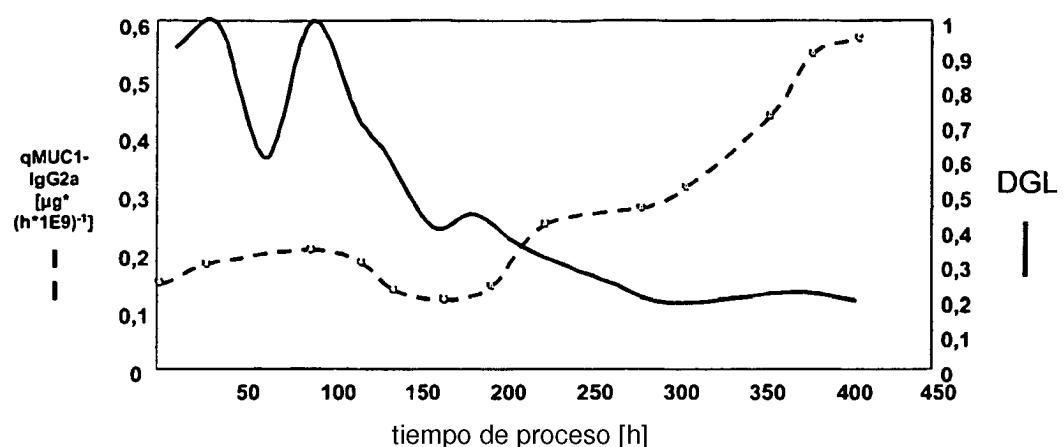


Fig. 2:

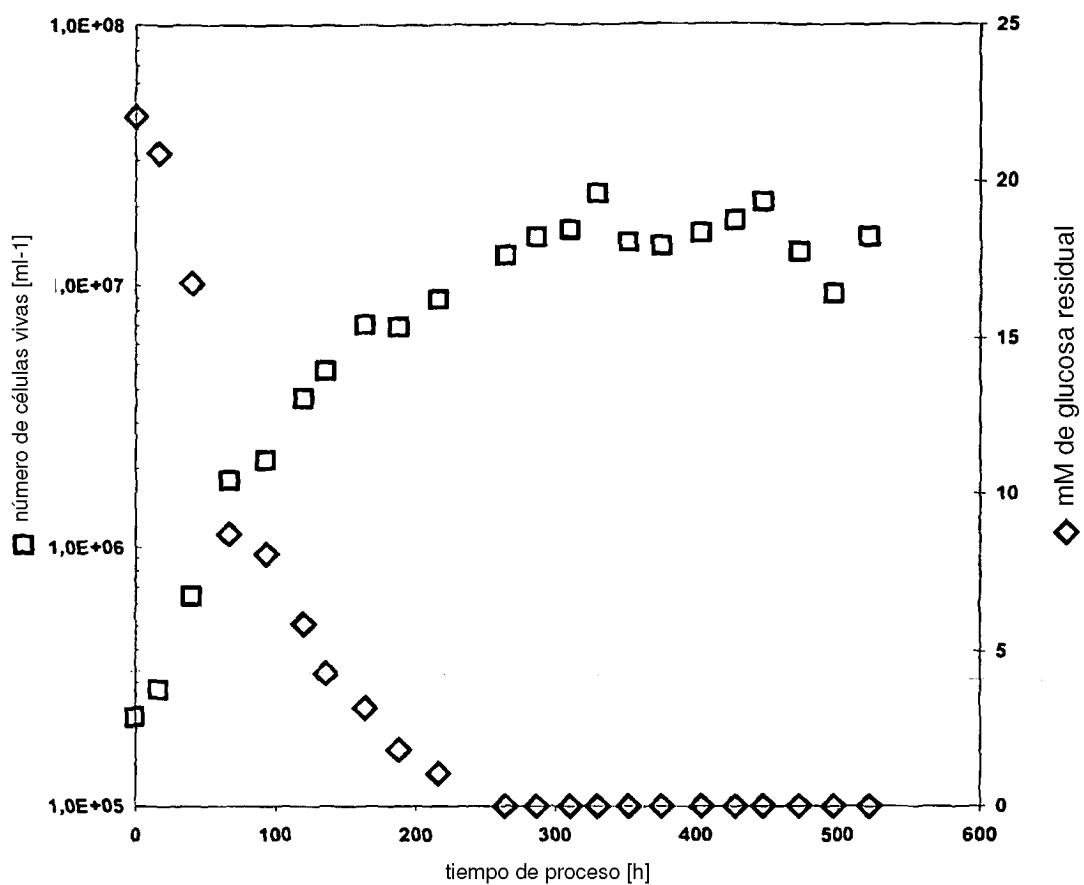


Fig. 3

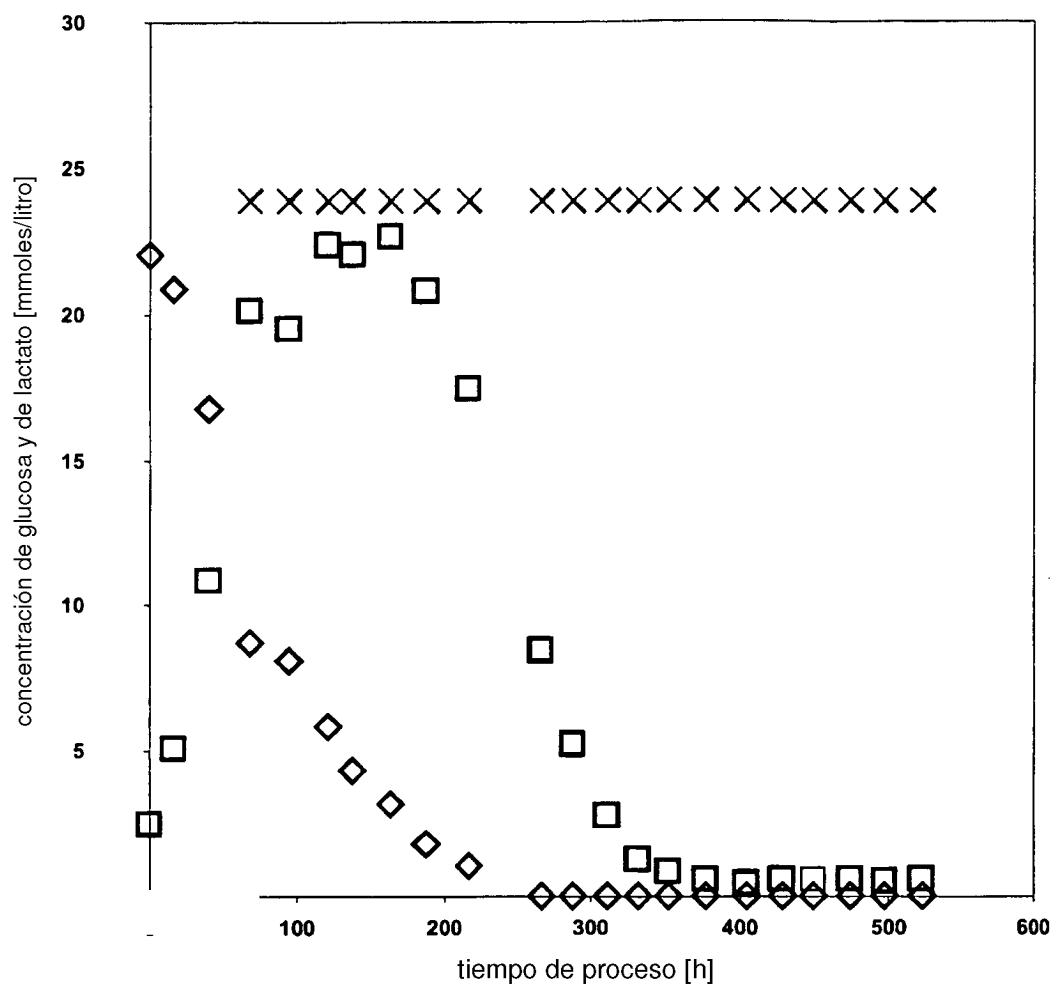


Fig. 4

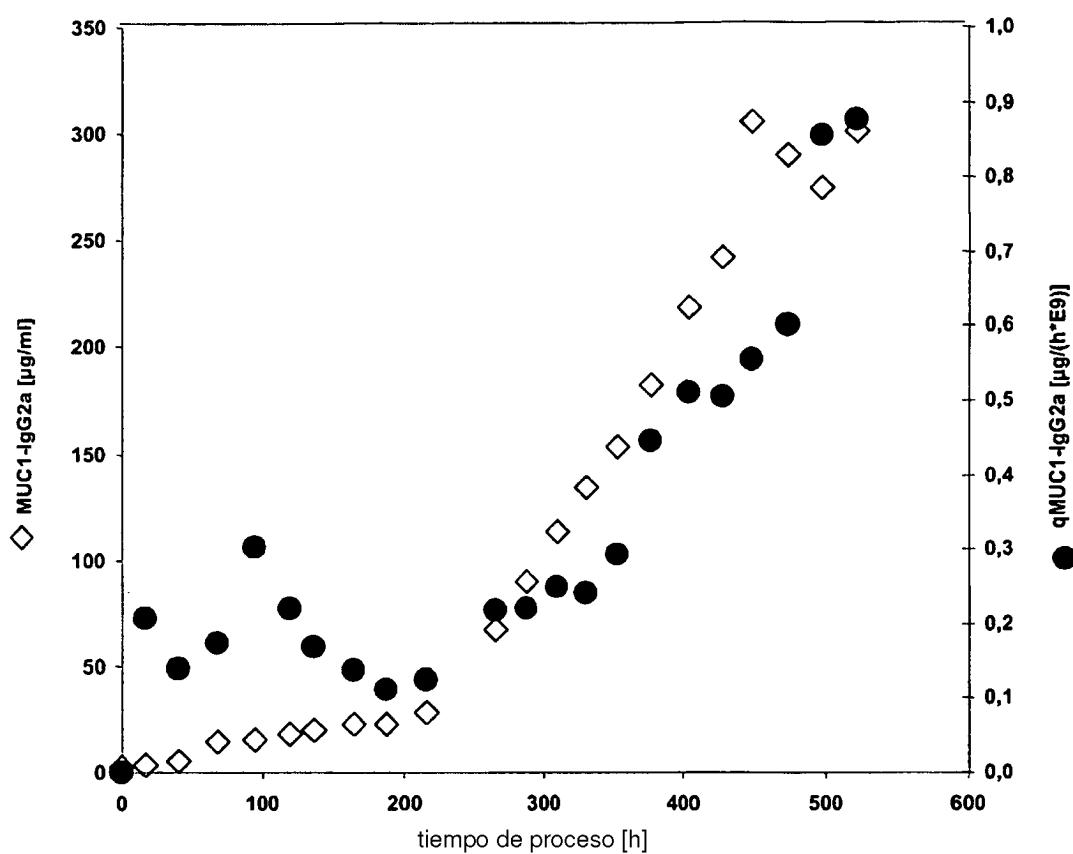


Fig. 5

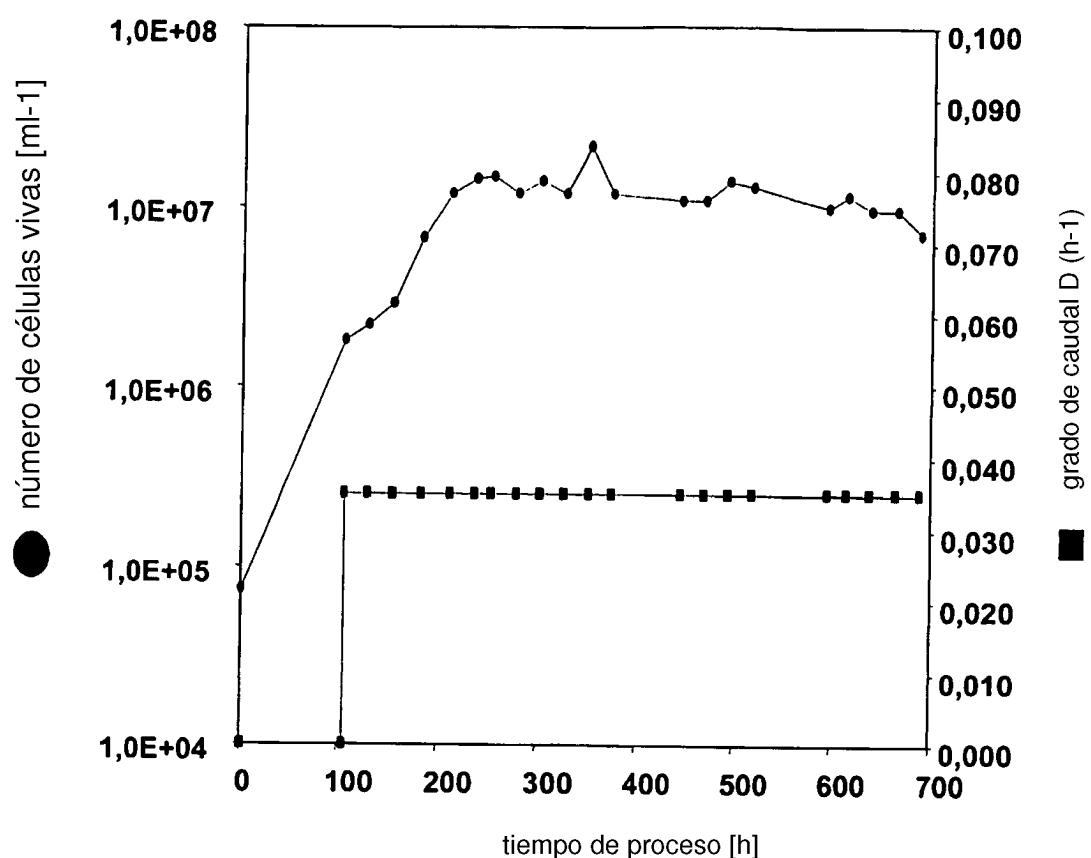


Fig. 6

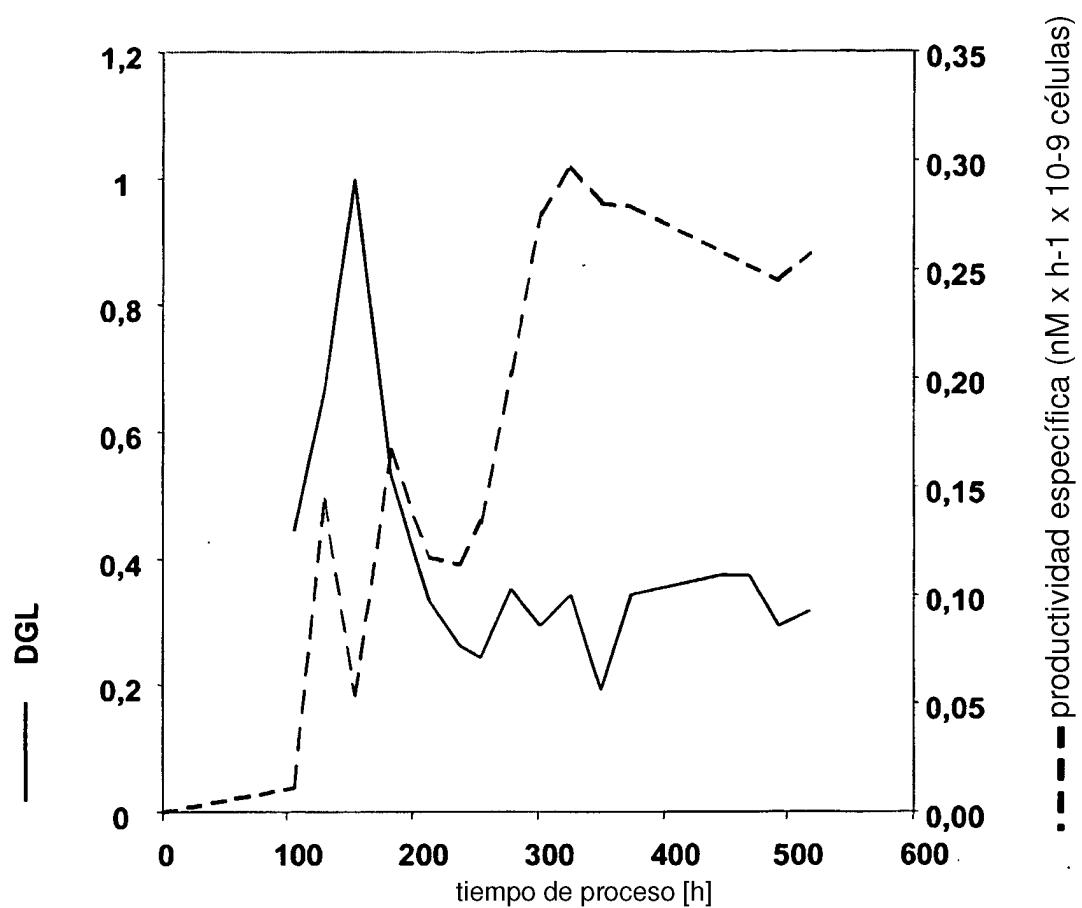


Fig. 7

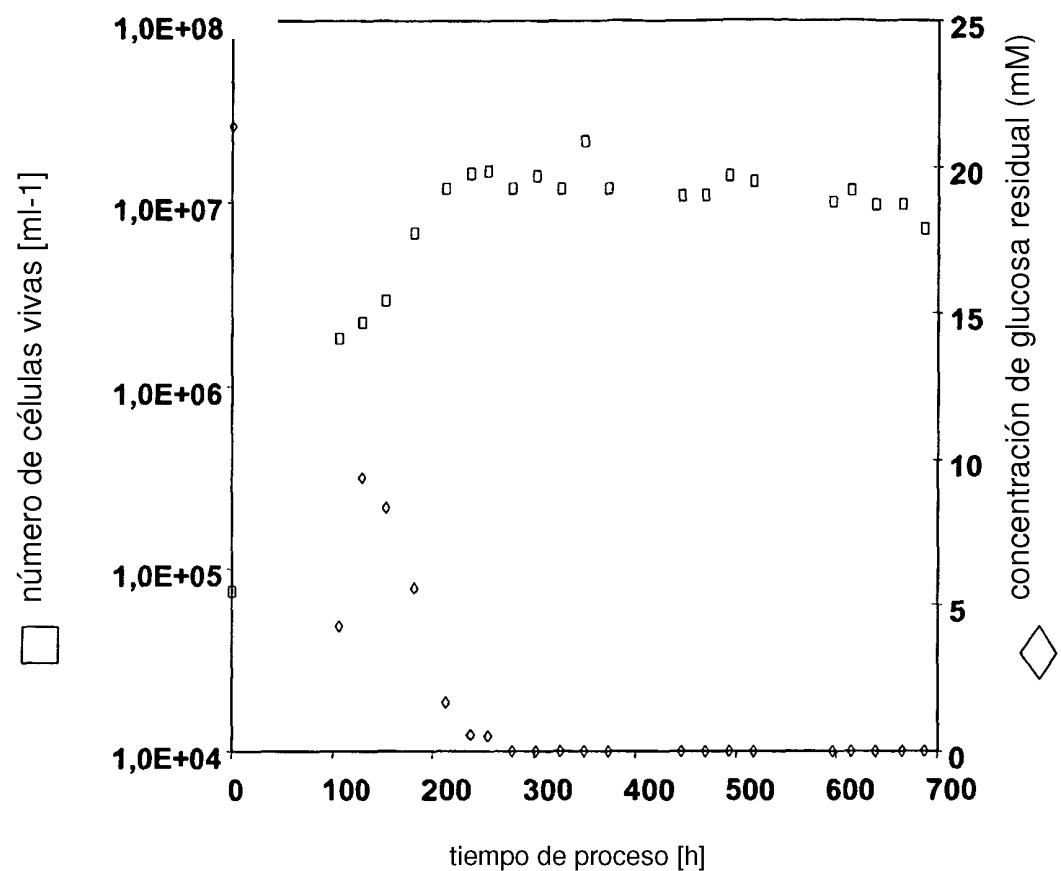


Fig. 8

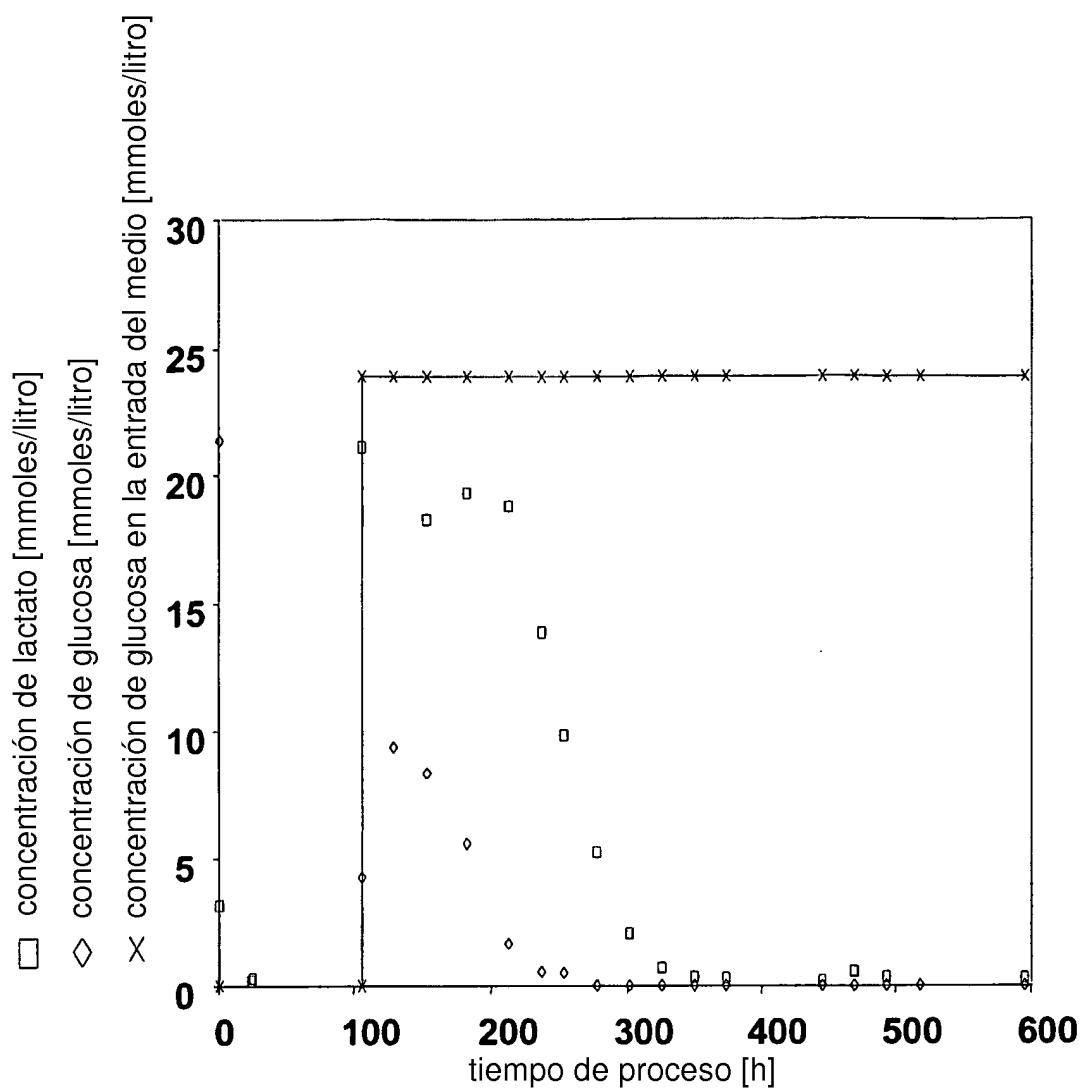


Fig. 9

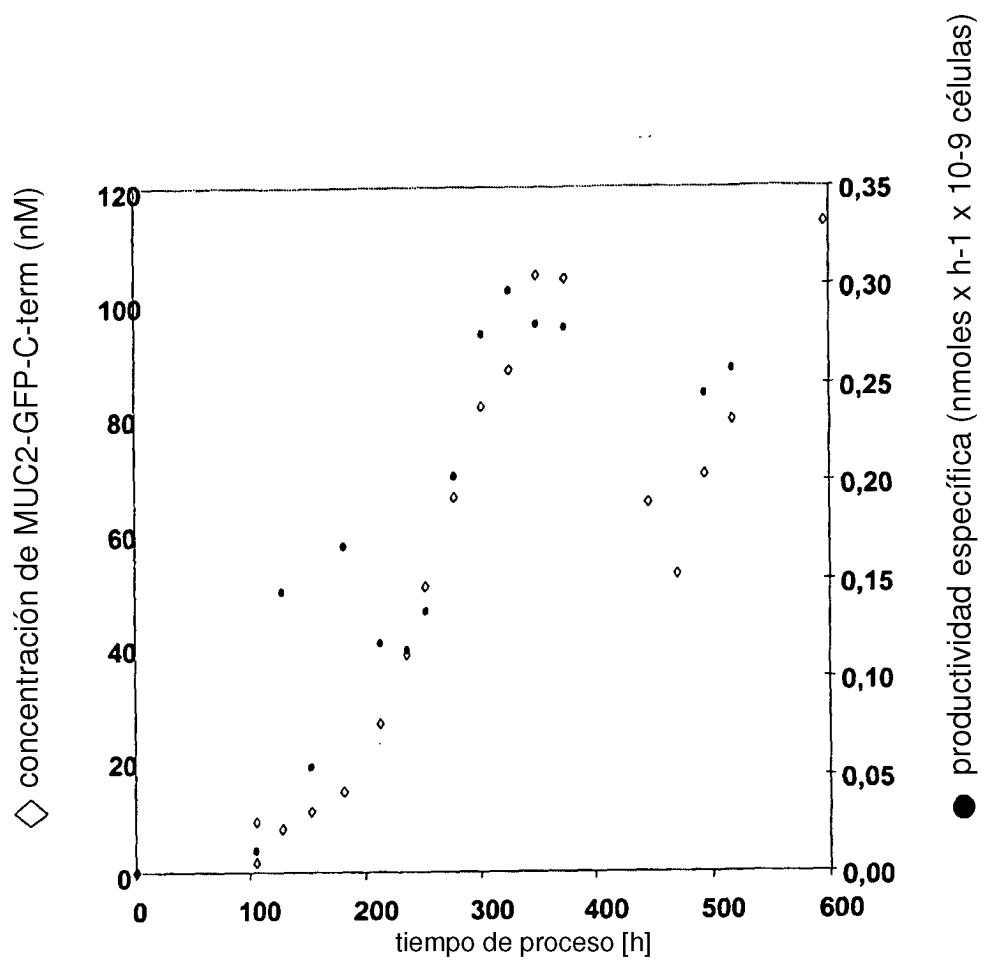


Fig. 10