



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 756**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00117026 .5**

86 Fecha de presentación : **24.08.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **1045023**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2000**

54 Título: **Medio sin suero.**

30 Prioridad: **24.08.1992 IL 102929**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **INTERPHARM LABORATORIES Ltd.**
Science Based Industrial Park Kiryat Weizmann
Ness-Ziona 76110, IL

72 Inventor/es: **Fischer, Dina y**
Bracha, Moshe

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 274 756 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).

ES 2 274 756 T3

DESCRIPCIÓN

Medio sin suero.

5 La presente invención se refiere a un medio sin suero que es capaz de mantener la producción de productos de células de mamífero, tales como proteínas obtenidas por métodos recombinantes.

10 Hoy día está muy extendido el uso de cultivos celulares para la producción de diversos productos biológicamente activos, tales como vacunas virales, anticuerpos monoclonales, inmunorreguladores que no son anticuerpos, factores de crecimiento polipeptídicos, hormonas, enzimas, antígenos específicos de tumores, etc. Estos productos se producen por células normales, transformadas y modificadas por ingeniería genética.

15 Para el cultivo de células, es indispensable suplementar el medio de cultivo con suero, que sirve como nutriente universal para el crecimiento de todas las líneas celulares, así como para la producción de la mayoría de los productos biológicamente activos. El suero contiene hormonas, factores de crecimiento, proteínas de soporte, factores de unión y extensión, nutrientes, oligoelementos, etc. El medio de cultivo normalmente contiene hasta aproximadamente 10% de suero animal, tal como suero bovino fetal (FBS).

20 Aunque su uso está muy extendido, el suero tiene muchas limitaciones. Contiene altos niveles de numerosas proteínas que interfieren de manera espectacular con las pequeñas cantidades de las proteínas deseadas producidas por las células. Estas proteínas del suero tienen que separarse del producto durante el procesamiento posterior, lo cual complica el proceso e incrementa el coste. Otra limitación es la inconsistencia entre un lote y otro, que ocasiona serios problemas de regulación en relación con la contaminación del producto con diversas proteínas del suero.

25 Recientemente, la llegada de la BSE (Encefalopatía Espongiforme Bovina), una enfermedad neurodegenerativa transmisible del ganado bovino con una larga latencia o periodo de incubación, ha planteado problemas adicionales de regulación en relación con el uso de sueros de origen animal en la producción de productos biológicamente activos.

30 Otro inconveniente del empleo de sueros animales, tales como FBS, es su inconstancia en el suministro debida al aumento de demanda que, a su vez, produce fluctuaciones ascendentes en su precio.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de crear un suplemento de medios alternativo para mantener el crecimiento celular y la producción de productos biológicamente activos.

35 Las ventajas e inconvenientes del cultivo sin suero para la fabricación de productos biofarmacéuticos recombinantes a partir de células de mamífero se han revisado minuciosamente (Barnes, 1987; Barnes & Sato 1980; Broad, *et al.*, 1991; Jayme, 1991). Barnes (1987) y Barnes & Sato (1980) resumen la lista de los aditivos principales que se usan como suplementos para medios sin suero.

40 A diferencia del medio suplementado con suero, que puede utilizarse para una amplia serie de tipos celulares y condiciones de cultivo, las formulaciones sin suero generalmente son muy específicas (Barnes, *et al.*, 1984, Sato, *et al.*, 1982, Taub, 1985, Weiss, *et al.*, 1980).

45 La mayoría de los medios sin suero disponibles en el mercado contienen una proteína de soporte, tal como albúmina. La presencia de una proteína de soporte podría ser necesaria para la protección de la viabilidad celular, pero tiene los inconvenientes mencionados anteriormente para el proceso de purificación.

50 Las células CHO han surgido como un hospedador mamífero receptor apropiado para acomodar la transfección y expresión de una diversidad de productos génicos extraños que podrían utilizarse en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas (Familletti y Fredericks, 1988, Marino, 1989).

55 Se dispone de varios medios sin suero comerciales para el cultivo de células CHO. Sin embargo, estos medios tienen múltiples inconvenientes. La mayoría de ellos son adecuados para aplicaciones de laboratorio a pequeña escala, pero son demasiado caros para biorreactores a gran escala. Algunos son apropiados para el crecimiento celular, pero se comportan mal como medio de producción. Cada uno de estos medios podría ser adecuado para el sistema específico para el que se creó, pero normalmente no puede usarse en otros sistemas.

60 Un medio de cultivo sin suero conocido (Patente de EE.UU. 5.063.157) para células de mamífero no adherentes comprende, además del medio base, transferrina, insulina, una peptona, un derivado de beta-D-xilopiranosas, selenita y una poliamina biológica. La única descripción en la patente anterior en relación con la producción se refiere al cultivo de células específicas de hibridoma de ratón en un medio que, además del medio base, contiene seis ingredientes. No se enseña la producción de un producto biológicamente activo distinto de un anticuerpo contra FSH en ninguna otra célula de mamífero.

65 En la Patente de EE.UU. N° 4.443.546 se describe otro medio de crecimiento de células sin suero para células de mamífero. Este medio de crecimiento, además del medio básico, contiene siete ingredientes.

ES 2 274 756 T3

La memoria descriptiva de la Patente Europea Nº 481.791 describe un medio de cultivo para células CHO que comprende agua, un regulador de la osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro, un factor de crecimiento y otros componentes opcionales. Los dos medios ilustrados contienen 19 y 17 componentes, respectivamente.

Los objetivos principales en el desarrollo de un medio sin suero para la producción a gran escala son: un medio definido sin suero, sin proteínas (o con una baja concentración de proteínas), con una cantidad mínima de aditivos, que dé como resultado un medio eficaz de bajo coste que no contenga ingredientes que probablemente complicarían las etapas del proceso de cultivo/producción/purificación.

Sin embargo, si en el medio están presentes proteínas, se prefiere que éstas se hayan obtenido por medios recombinantes y no se hayan aislado directamente de una fuente animal.

Aunque la lista de aditivos potenciales conocidos para un medio sin suero es muy larga, en muchos casos aún no se ha encontrado la combinación correcta. De hecho, sólo hay aproximadamente 40 medios sin suero comerciales en el mercado, a pesar de que se conoce su necesidad desde hace más de una década.

De acuerdo con la presente invención, ahora se ha descubierto que un medio sin suero para células de mamífero capaz de mantener la producción sólo necesita incluir una cantidad mínima de aditivos en un medio básico.

La presente invención proporciona un medio sin suero para células de mamífero que comprende un medio básico y (a) un agente de protección de la viabilidad celular, (b) insulina, y (c) trombina.

El medio sin suero de acuerdo con la invención mantiene la producción en células de mamífero de productos biológicamente activos en una medida comparable a la del suero.

El medio básico puede comprender cualquier medio conocido, por ejemplo, DMEM, F12, RPMI 1640, o mezclas de los mismos, estando disponibles todos ellos en el mercado, por ejemplo, en Gibco, U.S.A. o Boehringer Mannheim, Alemania.

El agente de protección de la viabilidad celular puede comprender un hidrolizado de proteínas, metil celulosa o similares.

La insulina y la trombina empleadas se preparan preferiblemente por métodos recombinantes.

Hidrolizados de proteínas: En una revisión de Rutsky (1981) se ha descrito el uso de péptidos como factores de crecimiento en cultivos de células de mamífero. Como suplementos de medios también se usan otros hidrolizados, por ejemplo, hidrolizado de lactalbúmina (Grace, 1962).

Se añadió *metilcelulosa* a un medio de cultivo como suplemento no nutriente, la cual, como se sabe, es beneficiosa para células cultivadas (Hink, 1991).

En varios medios sin suero se emplea *insulina* como aditivo, ya que se sabe que actúa como factor de crecimiento en todos los tipos celulares.

Trombina y Activador del Receptor de Trombina: Además de su papel en la coagulación sanguínea, se descubrió que la trombina se unía a diversas células a través de receptores específicos y que generaba señales. En las plaquetas, hay al menos dos sitios de unión a trombina (Workman, 1977). La estimulación de las plaquetas sirve como parte del proceso de coagulación. Sin embargo, la trombina también se une a las células endoteliales con alta y baja afinidad (Awbrey, 1979; Machovich, 1982; Bauer, 1983), ocasionando la liberación de prostaciclina (Weksler, 1978), la activación de proteína quinasas (Owen, 1981) y la inhibición de la actividad del activador de plasminógeno (Luskutoff, 1979).

En fibroblastos, la trombina estimula la síntesis de ADN y la división celular (Zetter *et al.*, 1977; Glenn *et al.*, 1980; Chen, 1981; Cunningham *et al.*, 1979). La unión de trombina a fibroblastos humanos también estimula la producción y liberación de una glicoproteína asociada a la superficie, la fibronectina (Mosher & Vaheiri, 1978).

Se sabe que la trombina activa células tales como las plaquetas a través de un receptor específico. Recientemente, Vu *et al.* (1991) sugirieron que el mecanismo de activación implica la escisión del receptor, y se propuso que la región N-terminal recién generada del receptor actúa entonces como un ligando unido. Un péptido sintético, con una secuencia correspondiente a la nueva región N-terminal, puede reemplazar a la trombina en la activación de las plaquetas.

El activador del receptor de trombina (en lo sucesivo "TRA") es un péptido que comprende una región del receptor que se convierte en el extremo N-terminal después de que la trombina active al receptor por escisión cerca de su extremo N-terminal nativo.

ES 2 274 756 T3

La Figura 1 ilustra el efecto de la composición del medio sobre la producción de IL-6 en centrifugadores. Se sembraron células CHO productoras de IL-6 en centrifugadores de 100 ml con soportes de disco. Después de siete días de crecimiento en FBS al 10%, el medio se reemplazó por medio de producción suplementado con FBS al 2% (*-*) o con ADC-1TM + Insulina 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Medio sin suero (SFM) [-]), la producción de IL-6 se determinó cada 24 horas. Los resultados son un promedio de dos centrifugadores.

La Figura 2 ilustra el efecto de la trombina sobre la estimulación de la producción de IL-6 en SFM. Se añadieron los diversos componentes a SFM y la mezcla se añadió a células CHO productoras de IL-6 en placas de 24 pocillos.

La Figura 3 ilustra el efecto de la insulina y la trombina sobre el crecimiento celular y la producción de IL-6.

La Figura 4 muestra el efecto de la insulina sobre la producción de IL-6 en centrifugadores de 100 ml.

La Figura 5 muestra el efecto de ADC-1TM y de la insulina sobre la producción de IL-6 en centrifugadores de 100 ml.

La Figura 6 muestra el patrón de elución de la trombina desde una columna Blue Sepharose que se cargó con trombina comercial (Sigma) de baja actividad específica (50-100 IU/mg).

La Figura 7 muestra el análisis de SDS-PAGE de diversas preparaciones de trombina.

La Figura 8 muestra la producción de TBP en centrifugadores de 1000 ml.

La Figura 9 ilustra la producción de TBP en centrifugadores de 100 ml, comparando el efecto de diversos agentes de protección de la viabilidad celular en medio sin suero que contiene insulina y trombina.

La Figura 10 ilustra la producción de TBP en un biorreactor de 1 litro.

La Figura 11 ilustra el efecto de la composición de medio sobre la producción de TBP en centrifugadores de 100 ml.

La Figura 12 ilustra la producción de rIFN- β por células CHO en centrifugadores de 100 ml.

La presente invención proporciona un medio sin suero que es adecuado para uso en la producción de productos de células de mamífero, contiene una cantidad mínima de aditivos y se puede preparar de forma sencilla por métodos convencionales o por una combinación de métodos convencionales y recombinantes.

Como se ha indicado anteriormente, todos los componentes del medio sin suero de acuerdo con la invención son conocidos *per se* y están disponibles en el mercado, por lo tanto, se pueden adquirir fácilmente.

De acuerdo con una realización de la invención, el medio sin suero se prepara de una manera convencional, simplemente mezclando los diferentes componentes con el medio básico.

La insulina y la trombina pueden producirse por métodos recombinantes convencionales, por ejemplo, por clonación del ADNc, aislamiento de fragmentos de ADN que codifican las proteínas procesadas maduras, construcción de vectores de expresión adecuados para la expresión en *E. coli*, y expresión.

Son agentes de protección de la viabilidad celular preferidos un hidrolizado de proteínas y metilcelulosa. Son hidrolizados adecuados, por ejemplo, el hidrolizado de lactalbúmina, el hidrolizado de gluten de maíz o similares. De esta forma, de acuerdo con otra realización de la invención, el medio sin suero comprende 10 ml de hidrolizado de lactalbúmina al 10% o 10 ml de hidrolizado de gluten de maíz al 5%, que se añaden a 900 ml del medio básico. Además, se añaden entre 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina y entre 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de trombina. Se prefiere el hidrolizado de gluten de maíz por razones de regulación, ya que no es de origen animal.

De acuerdo con otra realización de la invención, los genes para la expresión de insulina y trombina se insertan en las células de mamífero empleadas para la producción recombinante de los productos celulares biológicamente activos. Se cotransfectan promotores adecuados que dirigen la expresión de trombina e insulina con los genes que codifican estas proteínas, con la construcción apropiada para permitir su secreción.

Las células empleadas fueron células CHO (Ovario de Hámster Chino) transformadas con diversos genes fusionados a un promotor temprano de SV40. (Chernajovsky, 1984). Los genes fueron los que codificaban IL-6, TBP-I y rIFN- β (interferón- β recombinante), sin embargo, puede usarse cualquier otro gen adecuado para la expresión en sistemas de células de mamífero. Como el mutante CHO particular empleado para la transfección es dependiente de prolina, fue necesario suplementar el medio básico empleado con prolina.

Como se ha indicado anteriormente, se cree que la trombina activa su receptor escindiéndolo en el dominio amino-terminal extracelular exponiendo un nuevo extremo N-terminal. Se descubrió que péptidos de diferentes longitudes que correspondían a las secuencias del nuevo extremo N-terminal del receptor de trombina (después de la escisión) eran

ES 2 274 756 T3

adecuados para uso en el medio sin suero de acuerdo con la invención. Este uso simplifica la preparación del medio sin suero, ya que las propias secuencias peptídicas cortas se prestan fácilmente a la síntesis por métodos químicos o recombinantes. Esto también evita el uso de la propia trombina comercial, que, debido a su origen de mamífero, puede ocasionar problemas de regulación.

5

La invención se ilustrará por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

10 *Crecimiento celular y producción*

El crecimiento de células y la producción se realizaron en los siguientes sistemas:

15 A) En placas de 24 pocillos, se sembraron células ($0,25 \times 10^6$ /pocillo) en 1 ml de medio suplementado con FBS al 10%. Después de la incubación durante una noche a 37°C , se retiró el medio y la monocapa de células se aclaró dos veces con medio sin suero (SFM). Después se controló el crecimiento celular o el nivel de producción en las diversas composiciones de medio durante 3-5 días, cambiando los medios cada 24 horas.

20 B) En matraces de cultivo de tejidos de 25 cm^2 , se sembraron células ($0,5 \times 10^6$ /matraz) en medio suplementado con FBS al 10% y se incubaron durante 3 días antes de reemplazar el medio de crecimiento por el medio de producción.

25 C) En centrifugadores, la producción se controló en centrifugadores de 100 ml y de 1 litro (Bellco). Las células se unieron a microsoportes. La mayoría de los experimentos se realizaron con soportes de disco (discos de 6 mm, contruidos con tela de poliéster no tejida, laminada en un tamiz de polipropileno (Sterilin, R.U.). En algunos experimentos, los soportes fueron Biosilon (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Las células se sembraron en medio suplementado con FBS al 10% y, después de un periodo de crecimiento de 2-3 días, el medio se cambió por un medio de producción sin suero. Al inicio del periodo de producción, el medio se cambió cada 24 horas, y después de algunos días, los cambios de medio se realizaron cada 12 horas.

30 Ejemplo 2

Formulación de un medio básico sin suero (SFM)

35 Las células CHO recombinantes productoras de IL-6 sobreviven y se multiplican bien en DMEM suplementado con prolina y FBS al 2%. La eliminación del suero del medio produce la muerte celular a menos que el suero se sustituya por un suplemento apropiado.

40 Como se resume en la Tabla 1, la adición de un agente de protección de la viabilidad celular, por ejemplo, ADC-1TM (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), mantuvo la viabilidad celular (después de la adherencia inicial en presencia de FBS o Fibronectina) con muy poco crecimiento celular. La división celular puede estimularse por insulina, y en medio suplementado tanto con ADC-1TM como con insulina, las células crecen tan bien como en el medio suplementado con FBS. Sin embargo, en ausencia de suero, la capacidad de las células para producir IL-6 se reduce con el tiempo, y después de 5 días en el medio sin suero, la productividad específica de las células (μg de IL-6/ 10^6 células) se reduce a la mitad.

45

La reducción de la capacidad de producción de las células se demuestra tanto en matraces de cultivo de tejidos (TC) (Tabla 1) como en centrifugadores con soportes de disco (Figura 1).

TABLA 1

50

Efecto de la composición del medio sobre el crecimiento celular y la producción de IL-6

55

Suplementos del Medio de Producción ^a	Células/Matriz ^b ($\times 10^6$)	IL-6 ^b ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-6 ($\mu\text{g}/10^6$ células)
FBS al 2%	4,45	1,18	1,32
ADC-1 TM	2,16	0,41	0,95
ADC-1 TM + Insulina (0,2 μg)	5,43	0,73	0,67

60

65 ^a Se sembraron células CHO productoras de IL-6 en matraces de 25 cm^2 ($0,5 \times 10^6$ células/matraz) en FBS al 10% y se incubaron durante 3 días antes de reemplazar el medio por el medio de producción.

^b Se determinó el número de células y el nivel de IL-6 después de 5 días de cambio diario del medio de producción. El número de células no incluye las células no adheridas, que se retiraron por lavado con los cambios de medio.

Ejemplo 3

Efecto de la trombina sobre la producción

5 Cuando se añadió trombina bovina (Sigma) al SFM básico (DMEM + ADC-1TM + Insulina), la producción de IL-6 aumentó intensamente (Figura 2). La protrombina no afectaba a la producción. Sin embargo, cuando la protrombina se escindió por el factor Xa activo liberando trombina, se estimuló la producción. La actividad estimuladora de la producción se inhibió por el inhibidor de trombina, la proteína del suero antitrombina IV (Figura 2).

10 Ejemplo 4

La contribución funcional de los factores de crecimiento

15 Tanto la insulina como la trombina estimulan el crecimiento de células CHO. La adición de cada una de estas proteínas a un medio que contenía ADC-1TM produjo un nivel similar de crecimiento celular (Figura 3A). Sin embargo, la producción de IL-6 en presencia de insulina sola fue muy baja, mientras que la trombina estimulaba significativamente el nivel de producción (Figura 3B). En el experimento a corto plazo realizado en pocillos (Figura 3), la productividad observada con la trombina sola sólo mejoró ligeramente cuando se añadieron tanto insulina como trombina al ADCTM. Sin embargo, cuando la producción se controló en centrifugadores (100 ml), el nivel de IL-6, que inicialmente era el mismo con o sin insulina, se redujo claramente después de 9 días en ausencia de insulina (Figura 4). Estos resultados sugieren que se requiere insulina para una producción óptima a largo plazo.

20 Como se demuestra en la Figura 5, además de la insulina se necesitan tanto trombina como ADC-1TM para conseguir una producción máxima. La eliminación de ADC-1TM o de trombina produjo una reducción en el nivel de IL-6 después de 4 a 5 días de producción.

Ejemplo 5

Medio sin suero para producción

30 La composición de medio que se descubrió que mantenía altos niveles de producción de IL-6 por células CHO recombinantes incluye tres aditivos al medio básico (DMEM + Prolina):

- 35 1. ADC-1TM;
2. Insulina 0,2 µg/ml;
3. Trombina 0,02 µg/ml.

40 Cada uno de los componentes se analizó con respecto a una fuente óptima y un posible reemplazo.

Insulina

45 La mayoría de los experimentos se realizaron con insulina bovina de Sigma. Se obtuvieron preparaciones adicionales de diversas fuentes y se añadieron junto con ADC-1TM al medio básico para determinar su potencial. Se examinaron tanto insulina bovina como insulina humana. La insulina humana recombinante que se usa para inyecciones humanas (Novo Nordisk, Dinamarca y Eli Lilly, SA.; Suiza), tuvo un interés particular por razones reguladoras.

50 Como se resume en la Tabla 2, todos los lotes de insulina ensayados tuvieron una actividad similar a la de factores de crecimiento para las células CHO. También se observaron niveles de producción de IL-6 similares.

TABLA 2

Efecto de la insulina procedente de diferentes fuentes sobre el crecimiento celular y la producción de IL-6

Insulina (0,4 µg/ml)		Células/Pocillo ^a (x10 ⁶)	IL-6 (µg/ml)
Fuente	Compañía		
Ninguna		4,08	0,25
Bovina	Sigma	7,45	0,59
Humana (Recombinante)	Eli Lilly	7,46	0,58
Humana (Recombinante)	Novo-Nordisk	7,55	0,58

65 ^a Se sembraron células CHO productoras de IL-6 en una placa de 24 pocillos (1 x 10⁶ células/pocillo). Después de 3 días, el medio se cambió a SFM con o sin insulina. Después de cuatro días más de incubación, se contaron las células y se determinó el nivel de IL-6.

ES 2 274 756 T3

Trombina

La trombina comercial que se usó para los experimentos iniciales fue trombina bovina con una actividad específica muy baja (50-100 IU/mg de proteína) que se obtuvo de Sigma. La trombina se purificó a partir de esta preparación por unión a una columna Blue Sepharose.

Como se resume en la Figura 6, la mayor parte de la actividad se eluyó en tiocianato 1 M, mientras que la mayoría de las proteínas no se unieron o se lavaron con la sal 0,3 M.

La SDS-PAGE de la fracción activa (Figura 7, calle 3) reveló una banda proteica principal con un PM aparente de 37 K, similar a la banda proteica de una trombina bovina purificada comercial (Sigma) con una actividad específica de 2.000 IU/mg de proteína (Figura 7, calle 4).

La fracción activa de la columna Blue Sepharose (tiocianato 1,0 M) de la trombina bovina de Sigma se usó para la producción como aditivo a SFM en centrifugadores de 1 litro. La trombina se usó a una concentración final de 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio que también se había suplementado con ADC-1TM e insulina (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se observaron niveles de producción consistentemente altos durante más de cuatro semanas de producción (Figura 8).

ADC-1TM

El suplemento de medio sin proteínas comercial (ADC-1TM) que se obtuvo de Biological Industries (Beit-Haemek, Israel) puede reemplazarse por hidrolizados de proteína tales como hidrolizado de lactalbúmina (Figura 9) o hidrolizado de gluten de maíz (Figura 8), o por metilcelulosa (Figura 9).

Los componentes anteriores se añadieron al medio básico (DMEM + prolina) con insulina y con trombina purificada (Figura 8). El nivel de producción fue similar en todas las combinaciones siempre que los tres componentes se añadieran al medio.

El ADC-1TM y los diversos sustitutos se pueden esterilizar en autoclave, lo cual es ventajoso considerando los aspectos reguladores.

Ejemplo 6

Versatilidad del medio sin suero

La mayoría de los experimentos se realizaron con células CHO productoras de IL-6. Sin embargo, se demostró la producción de otros productos recombinantes en el medio suplementado con los tres componentes: ADCTM (o equivalente), insulina y trombina.

Se demostró la producción de la Proteína de Unión al Factor de Necrosis Tumoral recombinante (TBP) por células CHO en centrifugadores de 100 ml (Figura 11). En presencia de los tres componentes, ADCTM, insulina y trombina, el nivel de producción fue similar al de las células productoras en FBS al 2%. En ausencia de trombina, la producción se redujo después de 5 días.

Se produjo IFN- β recombinante por células CHO en microsoportes biosilon en centrifugadores de 100 ml. El nivel de producción en medio suplementado con FBS al 2% fue el mismo que en medio sin suero suplementado con ADC, insulina y trombina (Figura 12).

Ejemplo 7

Se examinó la capacidad de reemplazar a la trombina de un péptido de 14 restos aminoácidos que simula el nuevo extremo de aminoácidos del receptor de la trombina, en la actividad estimuladora de la producción de IL-6. El péptido (H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-OH) se obtuvo a partir de dos fuentes. Se adquirió un péptido muy purificado (Activador del Receptor de Trombina) de Bachem (Suiza) y se sintetizó una preparación bruta en el Weizmann Institute of Science (Israel).

Las dos preparaciones se compararon con la trombina como ingrediente de SFM en placas de 24 pocillos usando células CHO productoras de IL-6.

Como se resume en la Tabla 3, los péptidos estimularon la producción de IL-6 en la misma medida que la trombina. Sin embargo, cuando se usó el péptido se requirió una concentración 1000 veces mayor. Como era de esperar, el péptido purificado era activo a menores concentraciones que la preparación bruta.

65

ES 2 274 756 T3

TABLA 3A

Efecto del Activador del Receptor de Trombina sobre la Producción de IL-6

	Aditivo del SFM Básico	IL-6 (µg/ml)
5		
10	Ninguno	1,03
	FBS al 2%	5,64
15	Trombina	0,05 µg/ml
	Activador del Receptor de Trombina I*	100 µg/ml
		50 µg/ml
20	Activador del Receptor de Trombina II*	40 µg/ml
		20 µg/ml

25 * Preparación bruta, Weizmann Institute of Science

** Péptido purificado, Bachem.

30 Como puede verse en la Tabla 3B mostrada a continuación, se obtuvieron resultados similares con los siguientes péptidos:

A - Receptor de trombina (42-55), humano

Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe

35

B - Receptor de trombina (42-47), humano

Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn

40

C - Receptor de trombina (42-55), hámster

Ser-Phe-Phe-Leu-Arg-Asn-Pro-Gly-Glu-Asn-Thr-Phe-Glu-Leu

45

D - Receptor de trombina (42-47), hámster

Ser-Phe-Phe-Leu-Arg-Asn

50

todos de Neosystem, Francia.

55

60

65

ES 2 274 756 T3

TABLA 3B

	<u>Aditivo al SFM básico</u>	<u>IL-6 (µg/ml)</u>
5	Ninguno	2,17
	TRA II (de la Tabla 3A)	
	5 µg/ml	4,29
10	1,25 µg/ml	3,63
	A	
	5 µg/ml	2,27
	1,25 µg/ml	4,21
15	B	
	5 µg/ml	4,32
	1,25 µg/ml	4,32
20	C	
	5 µg/ml	4,13
	1,25 µg/ml	4,06
25	D	
	5 µg/ml	5,04
	1,25 µg/ml	4,89

Ejemplo 8

30

Para examinar la actividad del péptido en las condiciones de producción, se conectó un centrifugador de 1 litro con soportes de disco a los controles del biorreactor CelliGen. Se sembraron células del clon 108-1-22-12/4 de TBP y, después de un periodo de crecimiento, se inició la producción con FBS al 2%.

35

Diez días después, el medio de producción con suplemento de suero se reemplazó por SFM que contenía hidrolizado de gluten de maíz, insulina y TRA. La producción continuó durante 40 días. Durante parte del tiempo de producción, TRA se reemplazó por trombina. El reemplazo de trombina por TRA no afectó al nivel de producción (Figura 10).

40 Ejemplo 9

Clonación y expresión de trombina e insulina en células CHO

45

Después de la clonación inicial de los ADNc que codificaban la trombina y la insulina de una manera convencional, se aíslan los fragmentos de ADN que contienen la secuencia codificante de las proteínas maduras fusionada a un péptido señal. El péptido señal puede ser propio o un péptido señal que se secreta de forma apropiada en células CHO. Posteriormente, se construyen vectores de expresión que contienen estos fragmentos de ADN fusionados a un promotor para la expresión en células CHO, tales como SV40 o CMV.

50

Después, el vector de expresión se utiliza para transfectar uno de los clones de CHO usados para la producción recombinante de la proteína deseada, usando un segundo tipo de selección, por ejemplo, gentamicina (G418). La insulina y la trombina se secretan en el medio sin suero y, de esta forma, mantienen la producción y secreción de proteínas heterólogas por los clones de CHO.

55 Bibliografía

60

Awbrey, B.J., Hoak, J.C., y Owen, W.G. Binding of human thrombin to cultured human endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 254: 4092 (1979).

Barnes, D., y Sato, G. Serum-free cell culture: A unifying approach. *Cell* 22: 649-655 (1980).

Barnes, D.W., Sirbasku, D.A., y Sato, G.H. *Cell culture methods for molecular and cellular biology*. Vols. 1-4, Liss, New York (1984).

65

Barnes, D. Serum-free animal cell culture. *Bio Techniques* 5: 534-542 (1987).

Bauer, P.I., Machovich, R., Aranyi, P., Buki, K., Csonka, E., y Horvath, I. Mechanism of thrombin binding to endothelial cells. *Blood* 61: 368 (1983).

ES 2 274 756 T3

- Broad, D., Boraston, R., and Rhodes M.** Production of recombinant proteins in serum-free media. *Cytotechnology* 5: 47-55 (1991).
- Chen L.B.** Thrombin as a growth factor for cultured cells. “*The growth requirements of vertebrate cells in vitro*” Eds. Waymouth C., Ham, R.G., Chapple, P.J., Cambridge University Press, pág. 380-387 (1981).
- Chernajovsky, Y., Mory., Y., Chen, L., Marks, Z., Novick, D., Rubinstein, M., y Revel, M.** Efficient constitutive production of human fibroblast interferon by hamster cells transformed with the IFN- β gene fused to an SV40 early promoter. *DNA* 3: 297-307 (1984).
- Cunningham, D.D., Carney, D.H. y Glenn, K.C.,** A cell-surface component involved in thrombin-stimulated cell division. *Hormones and Cell Culture*. Eds. Sato, G.H., y Roos, R., Cold Spring Harbor, New York, 199 (1979).
- Familletti P. C., y Fredericks, J.E.** Techniques for mammalian cell immobilization. *Bio/Technology* 6: 41-44 (1988).
- Glenn, K.C., Karney, D.H., Fenton II, J.W., y Cunningham, D.D.,** Thrombin active site regions required for fibroblast receptor binding and initiation of cell division. *J. Biol. Chem.* 255: 6609 (1980).
- Grace, T.D.L.** Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* 195: 788-789 (1962).
- Hink, W.F.** A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A: 397-401 (1991).
- Jayme, D.W.** Nutrient optimization for high density biological production applications. *Cytotechnology* 5: 15-30 (1991).
- Loskutoff, D.** Effect of thrombin on the fibrinolytic activity of cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 64, 329 (1979).
- Machovich, R. y Csonka, E.** Mechanism of the binding of thrombin to endothelial cells. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 17:66 (Abstr.) (1982).
- Marino, M.H.,** Expression systems for heterologous protein production. *Bio Pharm.* Jul/Aug: 18-33 (1989).
- Morita, M., y Iwanaga, S.** Prothrombin activator from Echi carinatus venom. *Methods in Enzymology* 80:303-311 (1981).
- Mosher, D.F. y Vaheri, A.** Thrombin stimulates the production and release of a major surface-associated glycoprotein (fibronectin) in cultures of human fibroblast. *Exp. Cell Res.* 112: 323 (1978).
- Owen, W.G. y Esmon, C.T.** Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin catalized activation of protein C. *J. Biol. Chem.* 256:5532 (1981).
- Sato, G.H., Pardee A.B., y Sirbasku, D.A.** *Growth of cells in hormonally-defined media. Books A and B.* Cold Spring Harbor, New York (1982).
- Taub, M.** *Tissue Culture of Epithelial Cells.* Plenum, New York (1985).
- Vu, T.-K. H., Hung, D.T., Wheaton, V.I., y Coughlin, S.R.** Molecular Cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068 (1991).
- Weiss, S.A., Lester, T.L., Kalter, S.S., y Heberling, R.L.** Chemically defined serum-free media for the cultivation of primary cells and their susceptibility to viruses. *In vitro* 16: 616-628 (1980).
- Weksler, B.B., Ley, C.W., y Jaffe, E.A.** Stimulation of endothelial cell prostacyclin (PGI₂) production by thrombin, trypsin and ionophore A23187. *J. Clin. Invest.* 62: 923 (1978).
- Workman, E.F., White, G.C., y Lundblad, R.L.** High affinity binding of thrombin to platelets. Inhibition by tetranitromethane and heparin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 925 (1977).
- Zetter, B.R., Chen. L.B., y Buchanan, J.M.** Binding and internalization of thrombin by normal and transformed chick cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 74: 596 (1977).

REIVINDICACIONES

1. Un medio sin suero para células de mamífero que comprende un medio básico y
- 5 (a) un agente de protección de la viabilidad celular;
- (b) insulina; y
- 10 (c) trombina
2. El medio sin suero de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medio consiste en un medio básico y
- (a) un agente de protección de la viabilidad celular;
- 15 (b) insulina; y
- (c) trombina.
3. El medio sin suero de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho agente de protección de la viabilidad celular es un hidrolizado de proteínas o metilcelulosa.
4. El medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el medio básico comprende DMEM, F12, RPMI 1640 o mezclas de los mismos.
- 25 5. El medio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el hidrolizado de proteínas comprende hidrolizado de lactalbúmina o hidrolizado de gluten de maíz.
6. El medio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la insulina y/o la trombina se producen por métodos recombinantes.
- 30 7. El medio de la reivindicación 6, donde la insulina y/o la trombina se expresan junto con el producto de la célula de mamífero.
8. El medio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$ de insulina y entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$ de trombina.
- 35 9. Uso de un medio sin suero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el cultivo de células CHO.
10. Uso de un medio sin suero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para cultivo celular para la producción de un producto biológicamente activo seleccionado entre el grupo consistente en vacunas virales, anticuerpos monoclonales, inmunorreguladores que no son anticuerpos, factores de crecimiento polipeptídicos, hormonas, enzimas y antígenos específicos de tumores.
- 45 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha célula es una célula CHO y donde dicha proteína biológicamente activa es el interferón-beta, interleucina-6 o una proteína de unión al factor de necrosis tumoral.
12. Un método para producir interferón-beta, interleucina-6 o proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TBP) recombinantes por células CHO en un medio sin suero, **caracterizado** porque dicho medio sin suero comprende medio
- 50 básico y
- (a) un agente de protección de la viabilidad celular;
- (b) insulina; y
- 55 (c) trombina.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho agente de protección de la viabilidad celular es un hidrolizado de proteínas o metilcelulosa.
- 60
- 65

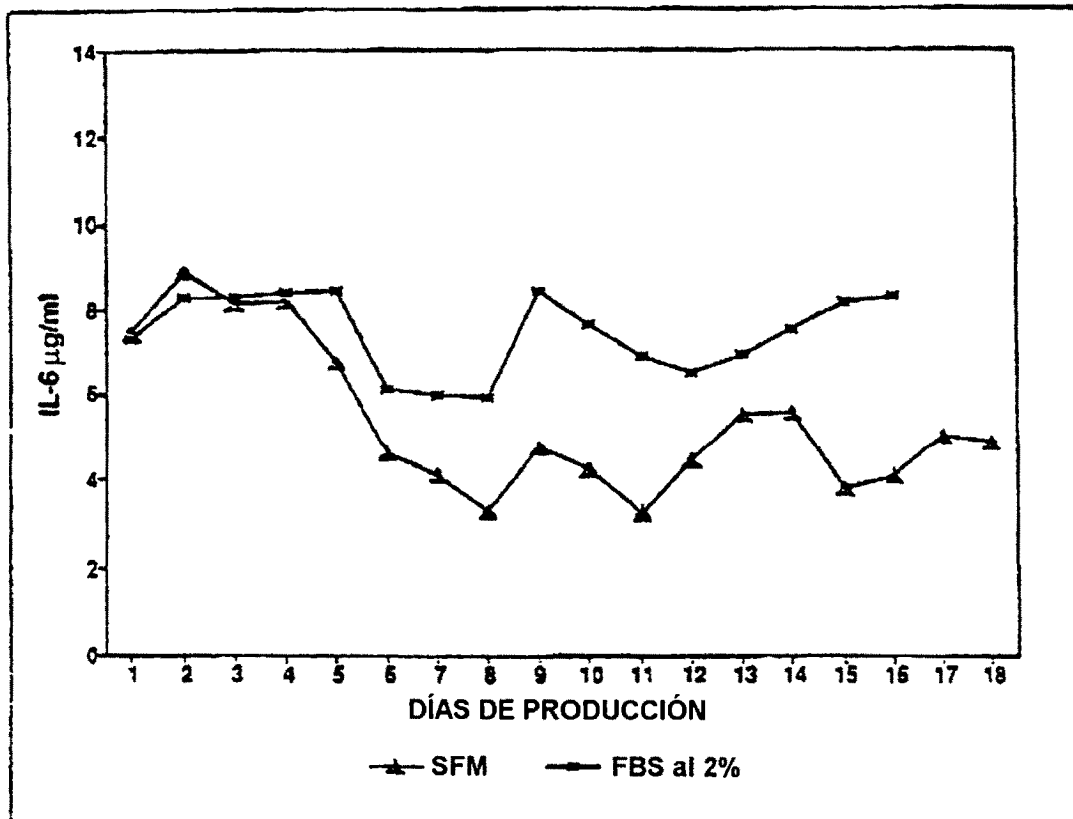
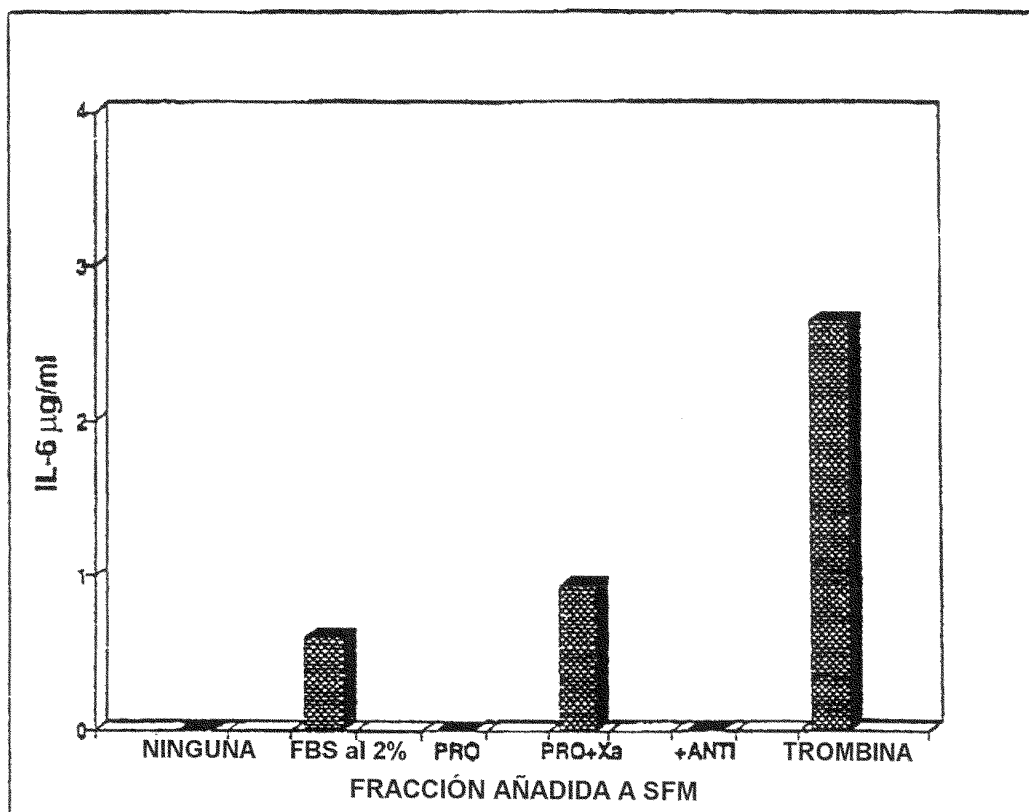


FIGURA 1



PRO + Xa = protrombina, 1 $\mu\text{g/ml}$

PRO + Xa = factor Xa activo incubado con protrombina durante 3 horas a 35°C

Anti = antitrombina, 0,1 $\mu\text{g/ml}$

Trombina = (Sigma T 4648) 1 $\mu\text{g/ml}$

FIGURA 2

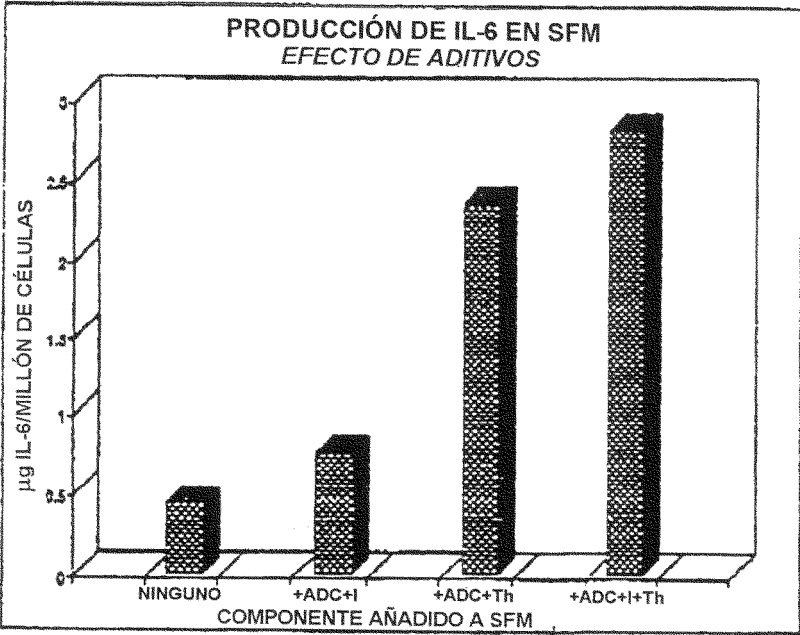
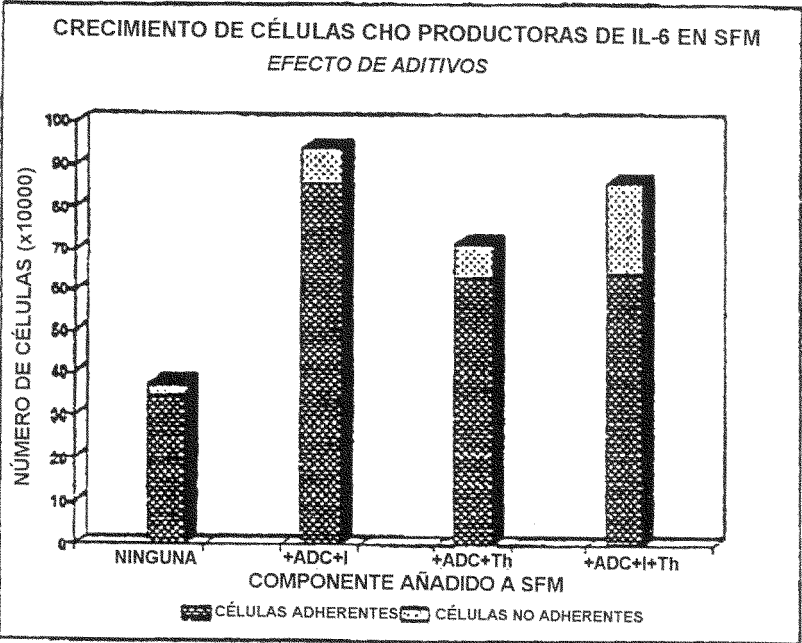
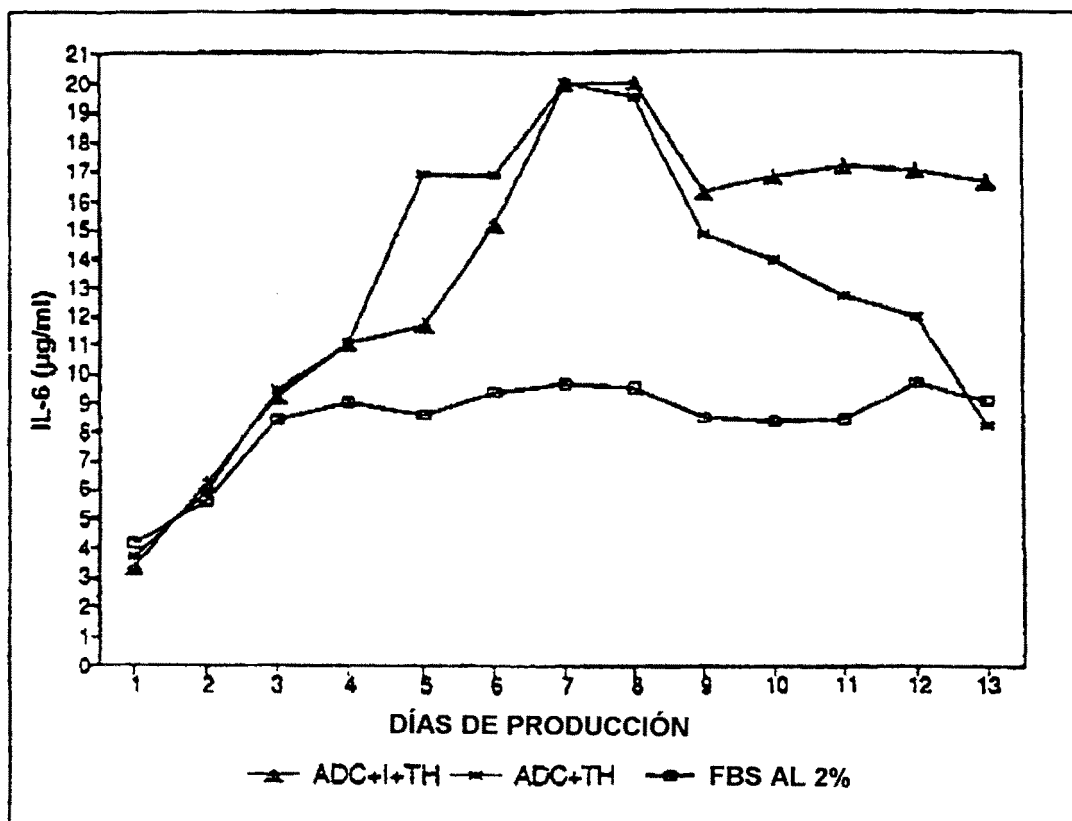


FIGURA 3



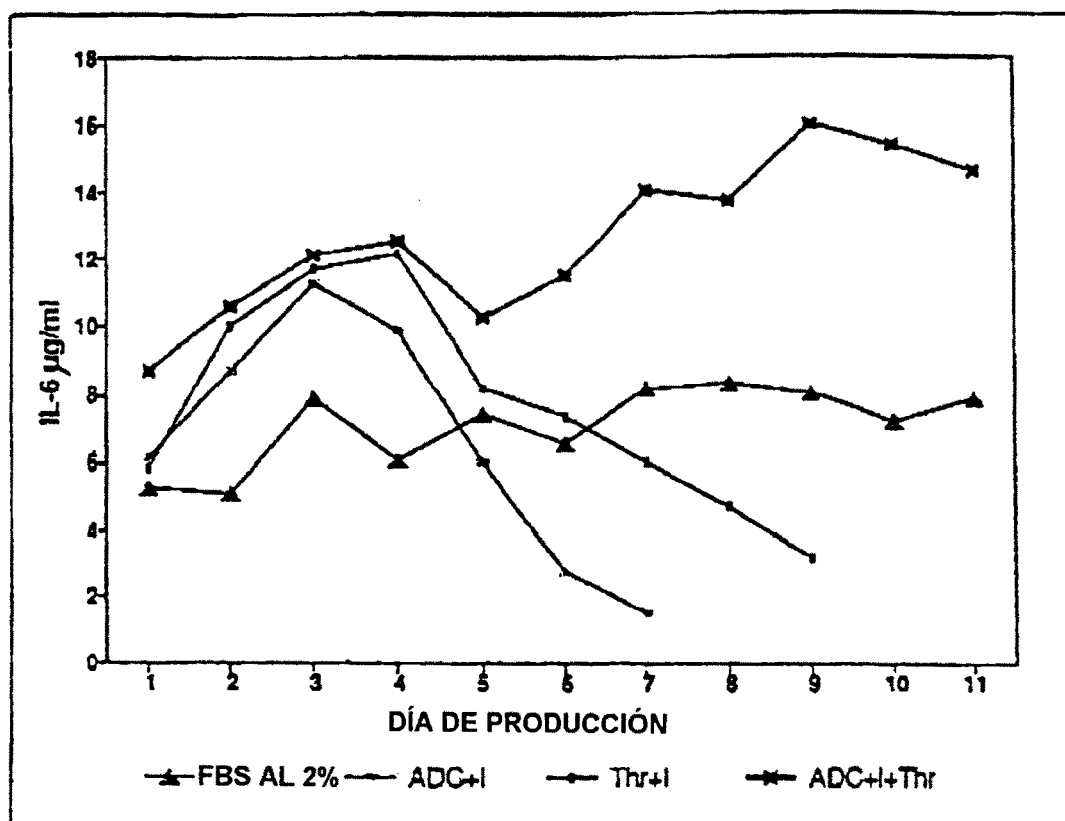
Se compararon los siguientes suplementos de suero:

ADC + Insulina 0,2 µg/ml + trombina 0,2 µg/ml (ADC + I + TH [Δ - Δ])

ADC + Trombina 0,02 µg/ml (ADC + TH [□ - □])

FBS al 2% (● - ●)

FIGURA 4



Se compararon los siguientes suplementos de medio:

FBS al 2% (Δ - Δ).

ADC + Insulina 0,2 µg/ml (ADC + I (°-°))

Trombina + insulina (Thr + I (Δ - Δ))

ADC + Insulina + trombina (ADC + I + Thr (°-°))

FIGURA 5

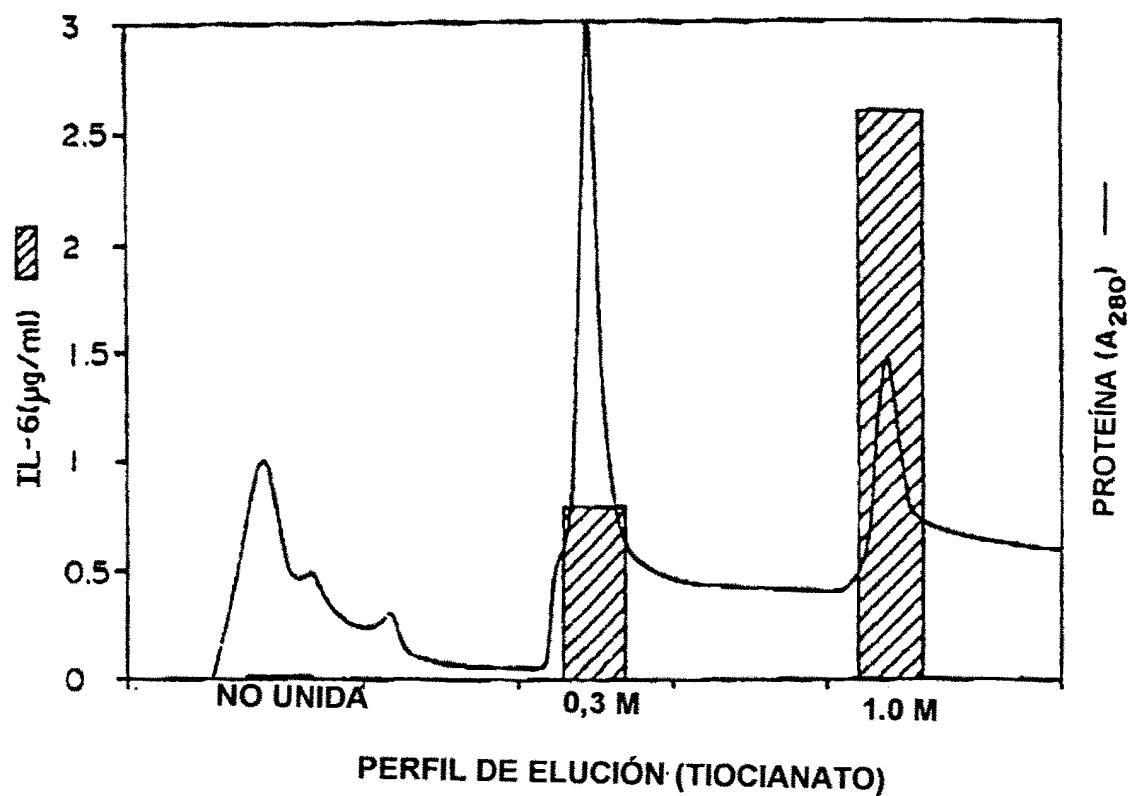
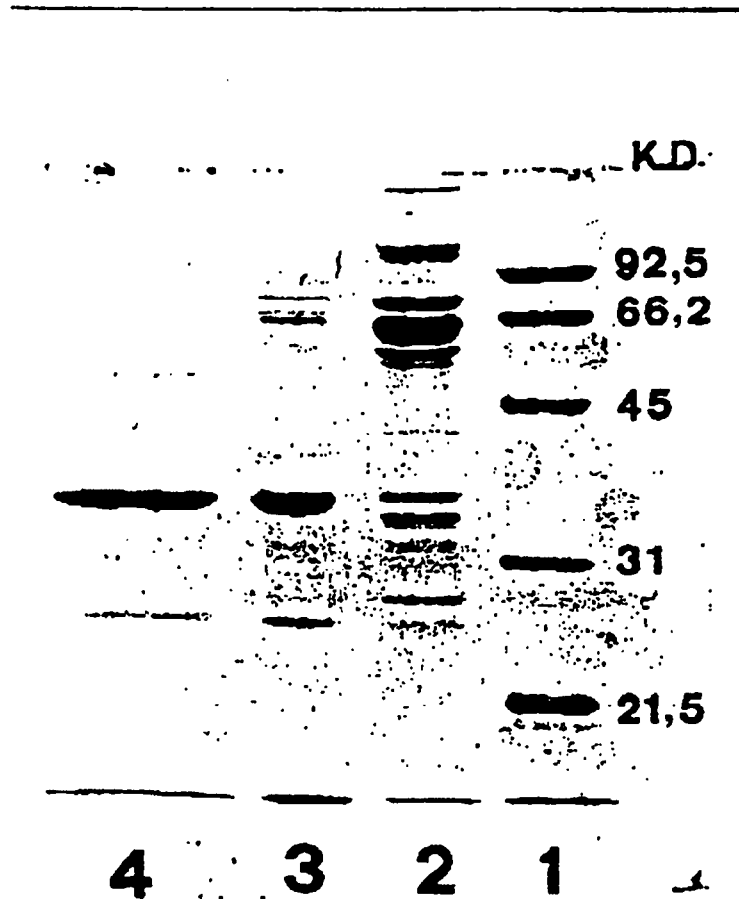


FIGURA 6



Calle 1 - Marcadores

Calle 2 - Trombina 100 iU/mg (Sigma)

Calle 3 - Fracción activa de trombina de Blue sepharose

Calle 4 - Trombina 2000 IU/mg (Sigma)

FIGURA 7

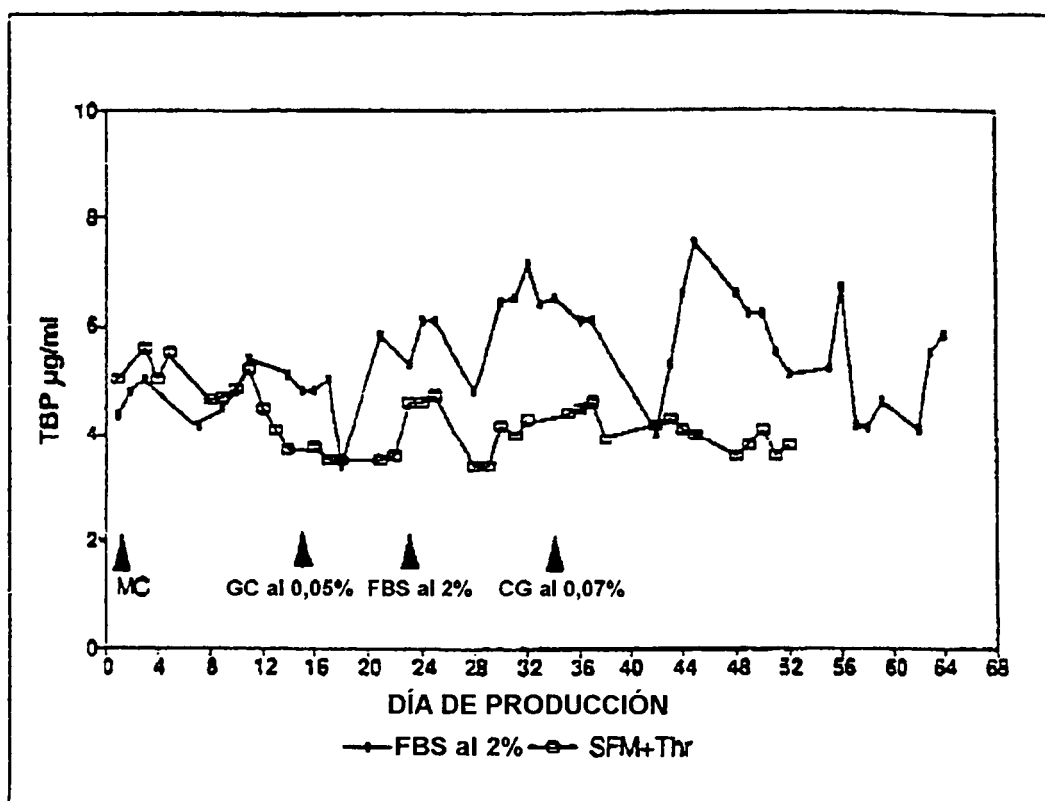


FIGURA 8

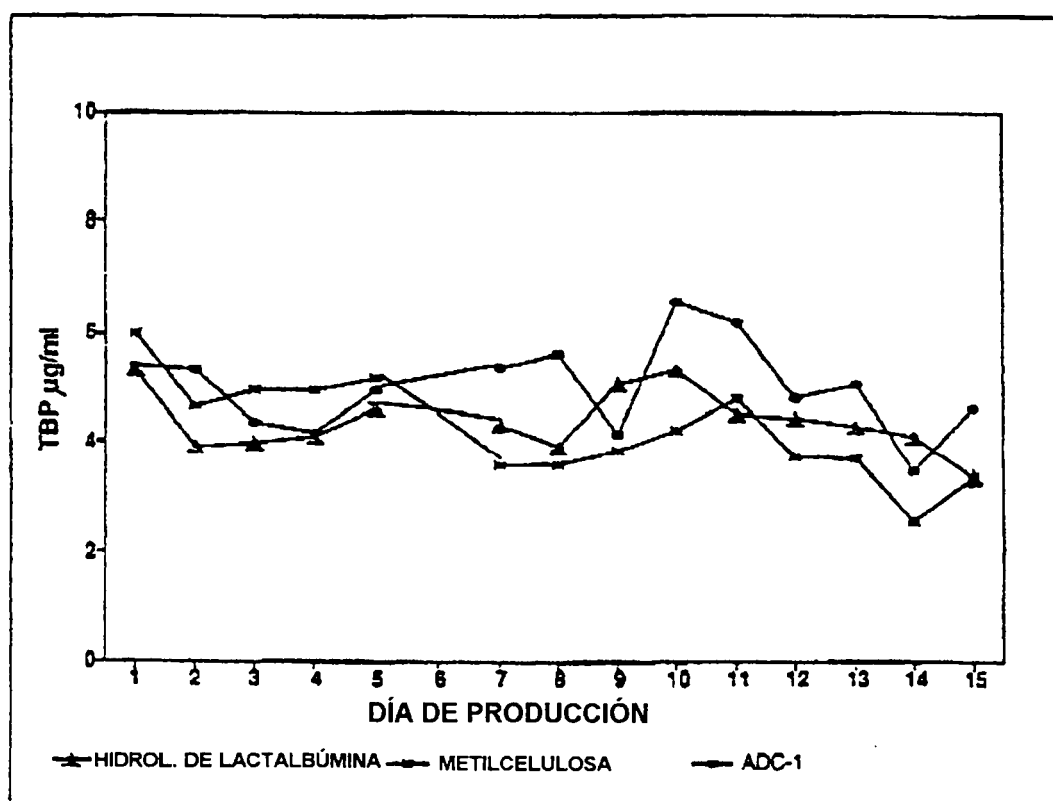


FIGURA 9

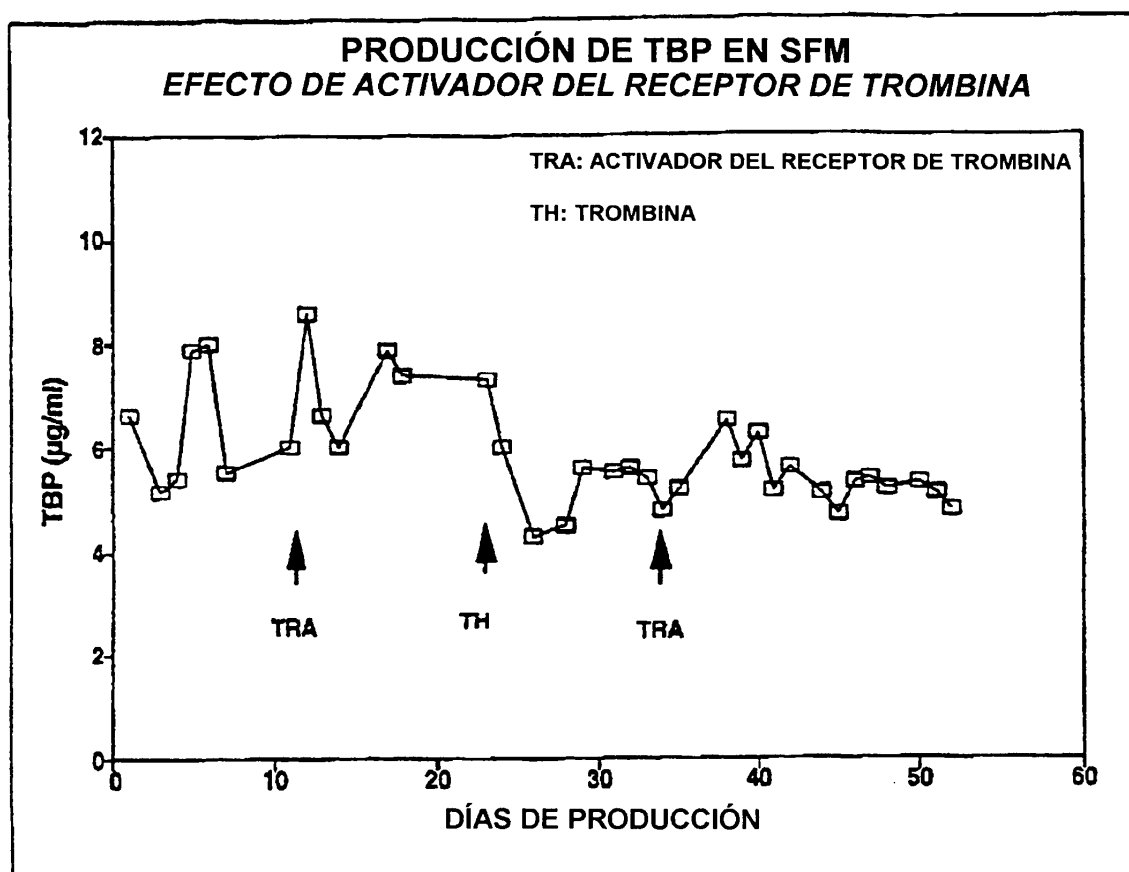


FIGURA 10

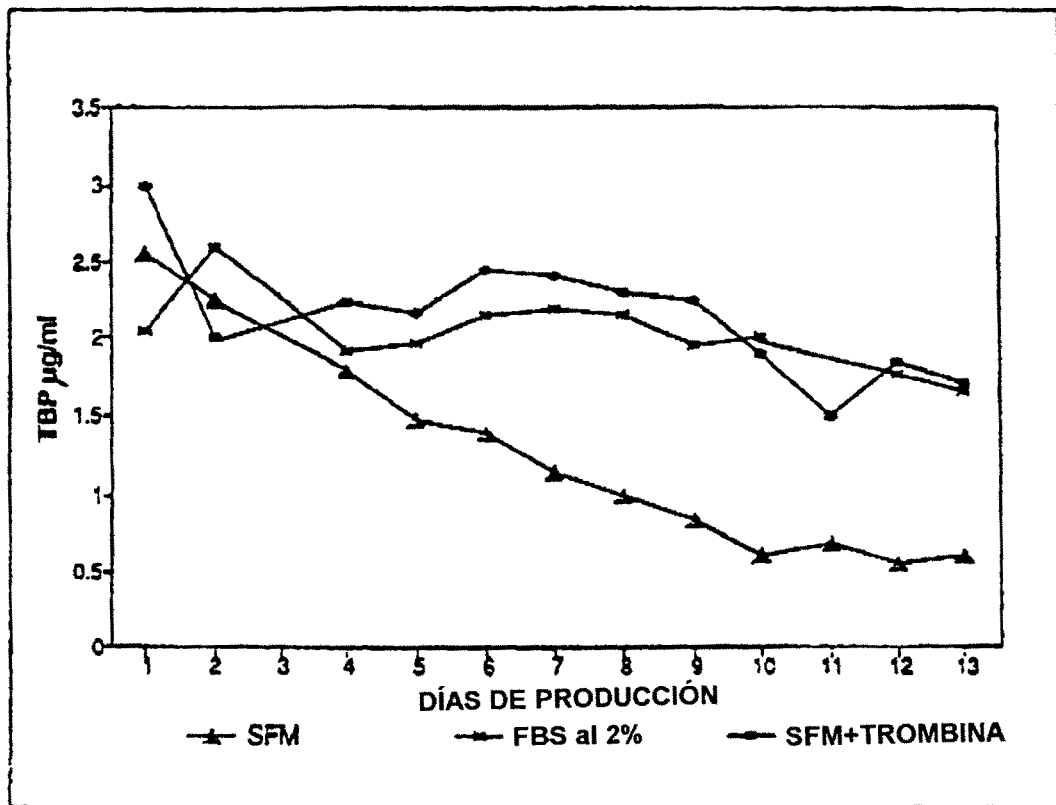


FIGURA 11

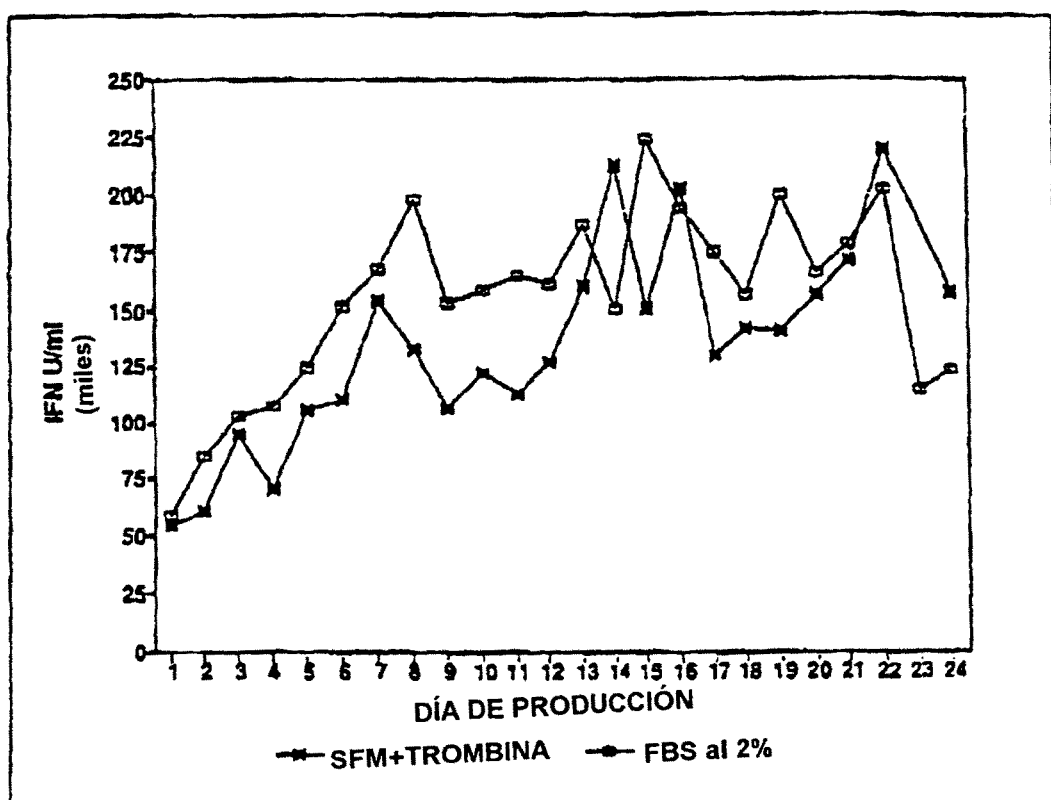


FIGURA 12