



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 460**

(51) Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97923382 .2**
(86) Fecha de presentación : **13.05.1997**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0934424**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.1999**

(54) Título: **Un proceso para producir un polipéptido recombinante que involucra la adición al medio de cultivo celular de un inhibidor de proteasas o quimiotripsinas dependientes de metales.**

(30) Prioridad: **14.05.1996 SE 9601855**
29.05.1996 US 18874 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **BIOVITRUM AB.**
112 76 Stockholm, SE

(72) Inventor/es: **Adamson, Lars;**
Walum, Erik;
Dixelius, Johan y
Lima Lie, Kristina

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 270 460 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

Un proceso para producir un polipéptido recombinante que involucra la adición al medio de cultivo celular de un inhibidor de proteasas o quimioproteasas dependientes de metales.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un proceso para producir proteínas y polipéptidos humanos recombinantes, y con un medio de cultivo para su uso en dicha producción. Más particularmente, la invención se relaciona con el cultivo de células en un medio de cultivo celular que contiene un inhibidor de proteasas dependientes de metales.

Antecedentes de la invención

Las enzimas proteolíticas están involucradas en todas las funciones corporales y la mayoría de ellas tienen contrapartes reguladoras naturales, esto es, inhibidores de proteasas. La International Commission on Enzymes ha establecido una clasificación y nomenclatura sistemática para las enzimas proteolíticas: 1) proteasas de serina, 2) proteasas de cisteína, proteasas aspárticas, 4) metaloproteasas, todas clasificadas de acuerdo con un grupo esencial en su centro activo, y finalmente 5) una subclase de proteasas con mecanismo catalítico aún desconocido (Borivoj Keil, "Specificity of Proteolysis", Springer-Verlag NY, 1992, 336 páginas). La intención de esta clasificación no es funcional, ni está relacionada con la fuente biológica de la enzima en el tejido. El problema de la clasificación de las enzimas proteolíticas, frecuentemente abreviadas como proteasas, se describe en el capítulo introductorio: "La clasificación de las enzimas en Enzyme Nomenclature (1200) se hace de acuerdo con las reacciones que catalizan. Esta regla difícilmente puede aplicarse a las endopeptidasas. La reacción global catalizada por este gran grupo de enzimas es esencialmente siempre la misma: ruptura de un enlace peptídico. Una proteína, sin embargo, no puede ser considerada como un sustrato en el término clásico: contiene cientos de sustratos potenciales, un conjunto de enlaces de péptidos cualitativamente diferentes con representación cuantitativa variable. Además, la disponibilidad de estos enlaces varía de acuerdo con la conformación global de la cadena de polipéptidos. Por lo tanto, la Enzyme Nomenclature hace una excepción de endopeptidasas de su regla: en vez de una clasificación de acuerdo con la reacción catalizada, las endopeptidasas son clasificadas por el tipo de su sitio activo. De esta forma, las enzimas con especificidad completamente diferente (como la tripsina, quimioproteasa y prolil peptidasa) se encuentran en el mismo grupo". Como se ilustra adicionalmente en la misma referencia, la especificidad del sustrato y el inhibidor es bastante más complicada que una simple relación con cinco clases de enzimas. NO obstante, esta clasificación es ampliamente usada en la literatura, por ejemplo, cuando se describen diversos efectos de la proteólisis.

En las proteasas de serina, una unidad estructural de serina es esencial para la actividad, esto es, la función de ruptura. La especificidad de las diferentes proteasas de serina se basa en las características de las cavidades que encajan con las estructuras de los sustratos correspondientes. Una hendidura profunda cuenta para la especificidad de la quimioproteasa por cadenas laterales aromáticas y otras voluminosas hidrófobas (véase L. Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA, USA, 1981, pp. 157-166).

Muchas proteasas necesitan metales alcalino-térreos o metales (en lo sucesivo denominados solo metales) para su actividad. Las proteasas dependientes de metales son consideradas bien como proteasas activadas proteína metales (a las cuales deben añadirse los iones metálicos para su actividad) o metaloproteasas (que contienen metales como parte integrante de su estructura. Con respecto al primer grupo, la activación y estabilización de enzimas por metales frecuentemente se presenta en diversos casos de proteasas, tales como proteasas de serina y cisteína.

La importancia de una metaloproteasa en células endoteliales cultivadas para la secreción de un cierto metabolito ha sido demostrada por R. Ikegawa *et al* in Biochem. Biophys. Res. Comm. 171(2), p. 669-675 (1990). Esto fue revelado por el efecto supresor sobre esta secreción reconocido por la adición de el inhibidor fosforamidón específico para metaloproteasas. Fue evidente, sin embargo, que la enzima fue confinada al espacio intracelular, puesto que no se obtuvo efecto del inhibidor en un medio condicionado libre de células.

No obstante, los efectos de las proteasas son mencionados con mayor frecuencia en contexto del riesgo potencial de degradación de la proteína en cuestión.

El efecto de las proteasas en cultivos de células CHO ha sido estudiado por M Satoh *et al*, In Vitro Cell Dev Biol 26, 1101-1104 (1990). Se usaron diversos inhibidores para clasificar la actividad catalítica presente. De la falta de inhibición por adición de fosforamidón se concluyó que las proteasas no pertenecían al grupo de las metaloproteasas, al menos no a las conocidas generalmente por ser inhibidas por este agente. El efecto de los demás inhibidores agregados reveló que la actividad proteolítica extracelular surgía de proteasas de cisteína.

Otro estudio describe los perfiles proteolíticos para células BHK y cultivos de hibridoma respectivamente (R B Kratje *et al*, J Biotechnol. 32, 107-125 (1994)). No se encontró actividad de metaloproteasas con ninguno de estos tipos de células. La actividad correspondiente a diversas proteasas de serina fue identificada sin embargo. También se reveló que la presencia de proteasas dependía no sólo del tipo de células usadas sino también de las condiciones de cultivo y de la edad del cultivo.

A partir de los artículos antes mencionados, es evidente que una secreción estable de polipéptidos en cultivos de células puede ser impedida por una diversidad de enzimas proteolíticas. Para un control eficiente de estas fuerzas degradantes, se necesitan herramientas versátiles. Mediante tal control, la homogeneidad de la proteína objetivo sería mejor retenida. Además, los aditivos o sustancias producidas endogénicamente por las células, susceptibles de ataque proteolítico, estarían protegidos. Todo junto, se conseguiría un más alto rendimiento y consistencia del proceso.

Tokunaga *et al*, Yeast, vol. 9 (1993), p. 379-387 se refiere la actividad de la proteasa sensible a la quimostatina en el medio de cultivo celular de *Schizosaccharomyces pombe* la cual digiere la α -amilasa secretada hacia el medio de cultivo. Además, la *Schizosaccharomyces pombe* es una levadura de fisión y la α -amilasa es una enzima, más particularmente una enzima degradadora de carbohidratos.

La EP-A2-319944 de Zymogenetics se refiere a la expresión de células eucarióticas de una proteína deseada, por ejemplo, t-PA, factor VII o factor IX, y una proteína que procesa o estabiliza la proteína deseada, por ejemplo, un inhibidor de proteasa. En este caso, proteína lo tanto, el inhibidor de proteasa es producido *in-situ*. Esto necesita la introducción de una primera secuencia de ADN que codifique la proteína deseada, y al menos una secuencia de ADN adicional que codifique la proteína estabilizante.

La WO-A-9002175 a Novo-Nordisk revela un método para producir polipéptidos cultivando células eucarióticas en presencia de diversos inhibidores de proteasa. Ejemplos específicos incluyen factor VIII como polipéptido, pero los inhibidores de proteasa están todos dirigidos a proteasa de serina y cisteína.

En la EP-A-306 968 de Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst and Tei se hace uso de aprotinina en un medio de cultivo celular usado para producir un derivado de eliminación del factor VIII. El nivel de expresión después de la adición de 100 a 10,000 KIU/m se estableció como dos a tres veces más alto que el control sin adición de aprotinina.

Los problemas encontrados con las proteasas dependientes de metales en la producción de diversas proteínas han sido mucho menos vigilados que el papel de la proteasa de serina y cisteína, especialmente en la literatura que cubre los cultivos de células de mamíferos. Más particularmente, el problema específico con las proteasas dependientes de metales nunca ha sido conducido previamente en conexión con el factor VIII.

Se han sugerido diversas soluciones para reducir la degradación por proteasas de proteínas y polipéptidos, por ejemplo, moléculas derivadas del plasma y del factor VIII recombinante. Estas soluciones han sido dirigidas a reducir la influencia de las proteasas de serina y cisteína en general. Las proteasas de serina y cisteína se consideran como las más dañinas en el plasma sanguíneo así como en cultivos celulares. Así, la WO-A-9310143 de Johnson *et al* revela un método para recuperar una proteína purificada y estabilizada poniendo en contacto un muestra biológica que contiene el factor VIII con al menos un agente inhibidor de proteasa o removedor de proteasa. Este método está particularmente dirigido a inhibir o remover la trombina, puesto que se dice que el factor VIII es muy sensible a cantidades mínimas de la proteasa de serina presente de forma natural en el plasma sanguíneo. Los inhibidores de proteasa incluyen, por ejemplo, benzamidina, antitrombina III, heparina y hirudina. El efecto del método es evidente solo para factor VIII derivado de plasma.

El objeto de la presente invención es proveer una solución a los problemas encontrados en las proteasas en general, y más particularmente con las proteasas dependientes de metales en medios de cultivo celular usados para producir proteínas y polipéptidos recombinantes, especialmente factor VIII.

Resumen de la invención

Las proteasas generalmente tienden a reducir la actividad de proteínas y polipéptidos degradando la molécula. La presente invención se relaciona con un proceso para reducir la influencia que va en detrimento de ciertas proteasas sobre las moléculas de proteína y polipéptido recombinantes, agregando un inhibidor de proteasas dependientes de metales al medio de cultivo celular. La presencia del inhibidor específico de proteasa de la invención permite un periodo de recolección prolongado y un rendimiento considerablemente más alto con una actividad de la proteína y del polipéptido esencialmente mantenida. La invención también se relaciona con un medio de cultivo celular para cultivar células que expresan y secretan un polipéptido recombinante biológicamente activo que contiene un inhibidor de proteasas dependiente de metales. La invención se relaciona además con el uso del factor VIII recombinante el cual ha sido producido en un medio de cultivo celular de acuerdo con el presente proceso para la manufactura de un medicamento para administración a un paciente que tiene los síntomas de la hemofilia A. También, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la hemofilia A por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de factor VIII recombinante el cual ha sido producido en el medio de cultivo celular de acuerdo con el presente proceso.

Descripción detallada de la invención

Un objetivo de la presente invención es reducir la influencia de proteasas dependientes de metales cuando se cultivan células huésped para producir polipéptidos recombinantes.

Otro objetivo de la presente invención es proveer condiciones de cultivo mediante las cuales se retiene esencialmente la actividad de los polipéptidos recombinantes.

Un objetivo adicional de la presente invención es incrementar la vida media de los suplementos proteínicos agregados al medio de cultivo celular y otras proteínas producidas por las células y secretadas en el medio de cultivo.

Los objetivos anteriores son alcanzados por la presente invención, la cual se relaciona con un proceso para producir un polipéptido humano recombinante biológicamente activo en un medio de cultivo celular que permite la expresión y secreción de dicho polipéptido, donde un inhibidor de proteasas dependientes de metales es agregado al medio de cultivo celular.

La presente invención se relaciona además con un medio de cultivo celular para el cultivo de células que expresan y secretan un polipéptido humano recombinante biológicamente activo, donde el medio de cultivo celular contiene un inhibidor de proteasas dependientes de metales.

La presente invención también se relaciona con un método para cultivar células que expresan un polipéptido humano recombinante en un medio de cultivo celular donde el medio de cultivo celular contiene un inhibidor de proteasas dependientes de metales. La presente invención se relaciona además con un método para producir un polipéptido humano recombinante, cultivando células que expresan el polipéptido cultivando células que expresan un polipéptido humano recombinante en un medio de cultivo celular que contiene un inhibidor de proteasas dependiente de metales y recuperando el polipéptido.

Los inventores de la presente invención han encontrado que ciertos inhibidores de proteasa tienen un impacto sorprendentemente positivo sobre la actividad de los polipéptidos durante el cultivo de células huésped que expresan polipéptidos recombinantes. La presencia de tales inhibidores resulta en la más alta productividad. De esta forma, el rendimiento de polipéptido con actividad y/o homogeneidad esencialmente mantenidas puede incrementarse considerablemente.

Los inhibidores de proteasas dependientes de metales son compuestos apropiados que contienen una unidad estructural hidrófoba. Adecuadamente, la unidad estructural hidrófoba es un grupo aromático, heterocíclico aromático u otro grupo lateral voluminosos. Los grupos laterales heterocíclicos aromáticos se relacionan con compuestos aromáticos en los cuales un elemento diferente al carbono está presente en el anillo aromático. Ejemplos son piridina, pirrol, furano y tiofeno. Además, en la presente invención, el término grupo lateral voluminoso hidrófobo con diversas otras estructuras anulares no polares tales como monocicloalcanos, por ejemplo, ciclohexano, dicioalcanos y policicloalcanos, o derivados sustituidos de cualquiera de estas estructuras.

Las proteasas dependientes de metales son consideradas bien como proteasas activadas por metales (las cuales deben agregarse iones metálicos para su actividad) o metaloproteasas (que contienen el metal como parte integrante de su estructura). Con relación al primer grupo, la activación y estabilización de enzimas por metales ocurre frecuentemente en varias clases de proteasas, tales como proteasas de serina y cisteína. Por ejemplo, en el campo de las funciones sanguíneas, especialmente la coagulación, fibrinólisis y activación complementaria, un grupo de dominios enlazantes del calcio dependientes de la vitamina K, son comunes (véase e.g. László Patthy in *Methods in Enzymology*, 222, p. 10-21 (1993)). Con respecto a las últimas metaloproteasas, puede encontrarse en Bond *et al*, *Int. J. Biochem.*, 17, no. 5, p. 565-574 (1985), una revisión de las metaloendopeptidasas, que son un subgrupo importante de esta clase de proteasas. Estos autores concluyen que el Zn^{2+} parece ser el metal esencial para todas las metaloproteasas caracterizadas de mamíferos. En una revisión más reciente (D. A. Auld, *Methods in Enzymology*, 248, p. 229-242 (1995)) este ion es aún considerado como el ion activo de una mayoría sobresaliente de la metaloproteasas. Esto no excluye un papel estructural y funcional de otros metales tales como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} (Auld, véase más arriba). Así, una enzima dependiente de Zn^{2+} así como de Ca^{2+} , es descrita en Butler *et al*, *Biochem. J.*, 241, p. 229-235 (1987).

En la presente invención, los inhibidores de proteasa dependiente de metales pueden ser compuestos estructuralmente relacionados con el sustrato natural de la proteasa y contener una unidad estructural electronegativa. Tales compuestos son adecuadamente péptidos, análogos de péptidos u otros compuestos que imiten una parte del sustrato natural preferiblemente seleccionados del grupo consistente de fosforamidatos, hidroxamatos y carboxilatos. El mecanismo para la inhibición de metaloproteasas por péptidos o análogos de péptidos funcionalizados con e.g. fosforamidatos, hidroxamatos o grupos carbonilo no está completamente claro. Sin embargo, en la literatura su efecto es considerado como debido a una función quelante (véase especialmente p. 221-222 of Birkeclal-Hansen *et al*, *Critical Review in Oral Biology and Medicine*, 4(2), p. 197-250 (1993)).

Compuestos estructuralmente relacionados pueden ser, como en el caso del fosforamidon, o sintéticos. El diseño de tales inhibidores sintéticos se revisa en Bond *et al* (véase más arriba). Un ejemplo, descrito por N. Nishino and J. C. Powers in *Biochemistry*, 17 (14), p. 2846-2850 (1978), es la síntesis de inhibidores específicos para zinc metaloendopeptidasa termolisina. En el caso, la especificidad del análogo de péptido fue conseguida incluyendo un aminoácido hidrófobo, previsto para interactuar con una bolsa correspondiente del sitio activo de la enzima, así como un residuo de ácido hidroxámico, para interactuar con el átomo de zinc. Una ilustración de este fenómeno se da en B. Roques *et al* in *Methods in Enzymology*, 248, p. 263-283, especialmente p. 268-269 and 272 (1995)). Ejemplos adicionales de hidroxamatos son revelados en WO 90/05719.

Los fosforamidatos adecuados para su uso en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos. El fosforamidon es un fosforamidato natural preferiblemente usado en la presente invención. El fosforamidon inhibe la acción

de la termolisina, una metaloendopeptidasa. La estructura de este fosforamidato es N-(α -L-ramnopiranosiloxihidroxi-fosfinil)-L-leucil-L-triptófano) abreviado Rha-P-Leu-Trp.

El residuo P-Leucina-Triptófano presente en el fosforamidón, es un rasgo común a varios fosforamidatos. Datos de diversas fuentes indican que este residuo constituye el grupo activo, por ejemplo en fosforamidón. Por lo tanto, en la presente invención se hace uso adecuado de los que contienen el residuo P-Leucina-Triptófano.

La concentración del inhibidor de proteasas dependientes de metales puede estar en el rango de 0.5 PM hasta 2 mM, y preferiblemente en el rango de 1 PM hasta 1 mM.

Las células huésped para uso en la presente invención pueden ser procarióticas o eucarióticas, adecuadamente células eucarióticas. Las células huésped para uso en la presente invención pueden ser células de mamíferos, bacterianas, fúngicas o de insectos. Las células son adecuadamente células de mamíferos o células de insectos, preferiblemente células de mamíferos. Las células de insectos pueden ser células SF-9 o SF-21. Las células de mamíferos pueden ser células de Ovarios de Hámster Chino (CHO), células de Riñón de Hámster Bebé (BHK), células COS o células de hibridoma, preferiblemente células CHO.

El medio de cultivo celular puede contener suero. Adecuadamente, sin embargo, el medio de cultivo celular es un medio bajo en suero y preferiblemente un medio libre de suero. El medio de cultivo celular puede contener adicionalmente una o más proteínas añadidas, tales como albúmina de suero humana (HSA), albúmina de suero bovino (BSA), insulina, factores de crecimiento, IGF-1, IGF-2, hormona de crecimiento, neutrofinas, leptina, transferrina y el factor de von Willebrand (vWf). Si se añaden proteínas al medio de cultivo celular en la presente invención, tales proteínas son producidas preferiblemente por técnicas de ADN recombinante. Preferiblemente, el medio de cultivo celular es un medio libre de proteína, esto es, libre de sustancias proteínicas añadidas. Esto hace posible la producción de un polipéptido con una muy alta actividad específica. De esta forma, el medio estará bien definido y el riesgo de introducir contaminantes tales como micoplasma, bacteriófagos, virus y toxinas será casi extinguida. Adicionalmente, la purificación corriente arriba de las moléculas de polipéptido producidas será facilitada.

El medio de cultivo celular puede estar basado en un medio completo, o un medio nutritivo basal suplementado con cierto número de componentes. Ejemplos de medios completos adecuados son diversos medios ASF comercializados por Ajinomoto de Japón, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Eagle's Minimum Essential Medium, Ham's Medium F-12 y RPMI-1640 Medium. Diversas combinaciones de DMEM y Ham's F-12, ambos comercializados por GIBCO de Renfrewshire en Escocia son también medios completos adecuados para su uso en la presente invención. Un medio basal suplementado puede ser preparado añadiendo componentes al medio nutritivo basal de acuerdo con procedimientos estándar para preparar medios de cultivo celular.

Los suplementos añadidos al medio de cultivo celular no son críticos para la presente invención y pueden ser combinaciones de los conocidos en la técnica los cuales son adecuados para las células en cuestión. Ejemplos de suplementos que pueden ser usados incluyen insulina, transferrina, ácido ascórbico, atanolmina, glutamina y selenito de sodio.

El inhibidor de proteasa puede ser añadido al medio de cultivo celular una vez, varias veces o continuamente durante el periodo de cultivo. Los inhibidores de la presente invención son adecuadamente añadidos al medio de cultivo celular en el cambio de medio. El inhibidor de proteasa puede ser una mezcla de un inhibidor de proteasas dependientes de metales y un inhibidor de quimiotripsinas. El inhibidor de proteasas también puede ser una combinación de un inhibidor de proteasas dependientes de metales y un inhibidor de quimiotripsinas, añadidos en secuencias arbitrarias.

En la presente invención, los polipéptidos se refieren a proteínas y oligopéptidos con al menos 20 aminoácidos en la cadena. El número de aminoácidos del polipéptido producidos de acuerdo con la presente invención, cae adecuadamente en el rango de 30 hasta 4.500 aminoácidos, y preferiblemente en el rango de 40 hasta 3000 aminoácidos. Los polipéptidos que pueden ser producidos de acuerdo con la presente invención incluyen polipéptidos que exhiben actividades coagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, receptores de enlace de membranas y nucleares y factores hormonales de regulación del metabolismo (hormonas). Ejemplos específicos de polipéptidos que pueden ser producidos de acuerdo con el presente proceso son factor VIII, factor V, factor VII, factor IX, tPA, receptores de prostaglandina, receptores de glucocorticoides, proliferadores de peroxisoma activados (PPARs), factores promotores del crecimiento y supervivencia celular, interferón y proteínas enlazantes de IGF (IGFBP). Los polipéptidos pueden ser de cadena completa, esto es, la secuencia de los aminoácidos es idéntica a la secuencia encontrada en mamíferos en general, y en seres humanos en particular. Los polipéptidos también pueden ser derivados por eliminación de polipéptidos de cadena completa, donde falta uno o más aminoácidos. En la presente invención, el polipéptido es preferiblemente factor VIII.

En la presente invención, el factor VIII producido proteína la técnica de ADN recombinante puede ser factor VIII de longitud completa o preferiblemente un derivado por eliminación del factor VIII que tiene una actividad coagulante. Por derivado por eliminación se entiende aquí un factor VIII de coagulación en el cual todo o parte del dominio B falta, 1 vez que se mantiene la actividad coagulante. Los dominios restantes están enlazados adecuadamente por un aminoácido enlazante. Ejemplos de diversas construcciones enlazantes se dan en P. Lind *et al*, Eur. J.

ES 2 270 460 T3

Biochem., vol. 232 (1995), pp. 19-27. La estructura y bioquímica de los productos del factor VIII recombinante han sido descritas en general por Kaufman in Trends in Biotechnology, 9, p. 353-359 (1991) y Hematology, 63, p. 155-65 (1991).

El factor VIII de longitud completa humano presente en el plasma humano tiene una masa molecular de aproximadamente 300 kDa. Los concentrados de factor VIII derivados de tal plasma contienen varias formas de factor VIII fragmentado fragmentos completamente activos según lo describen Andersson *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, p. 2979-83 (May 1986). La forma activa más pequeña tiene una masa molecular de aproximadamente 170 kDa y consiste de dos cadenas de aproximadamente 90 kDa y aproximadamente 80 kDa mantenidas juntas mediante iones metálicos. Se hace referencia aquí a EPA-0 197 901 (Farmacia AB). El factor VIII biológicamente activo producido de acuerdo con la presente invención, proteína lo tanto, tiene adecuadamente una masa molecular en el rango de aproximadamente 170 kDa hasta aproximadamente 300 kDa.

Pharmacia AB of Stockholm, Sweden, ha desarrollado un producto de factor VIII recombinante que corresponde al factor VIII de plasma de aproximadamente 170 kDa en concentrados terapéuticos de factor VIII. La molécula de factor VIII recombinante truncado es denominada r-VIII SQ y es producida por células de Ovario de Hámster Chino (CHO) en procesos de cultivo celular en medio libre de suero. La estructura y bioquímica de r-VIII SQ han sido descritas en WO-A-9109122 (Farmacia AB). En la presente invención, más preferiblemente el derivado de eliminación es el factor VIII SQ (r-VIII SQ) recombinante.

El factor VIII recombinante producido en un medio de cultivo celular de acuerdo con el presente proceso puede ser usado para la manufactura de un medicamento para la administración a un paciente que tiene los síntomas de la hemofilia A. También, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la hemofilia A por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de factor VII recombinante que ha sido producido en un medio de cultivo celular de acuerdo con el presente proceso.

El pH del medio de cultivo celular adecuadamente cae en el rango de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8. La osmolalidad del medio de cultivo celular adecuadamente cae en el rango de aproximadamente 280 hasta aproximadamente 400 miliosmoles.

La técnica de cultivo celular puede ser el cultivo por suspensión, cultivo en monocapa tal como la botella en rotación, microportadores o fibra hueca, preferiblemente la técnica de cultivo en suspensión.

El modo de operación del presente proceso puede ser continuo o en lotes.

Lo siguientes ejemplos se proporcionan para propósitos de ilustración solamente y no deben ser considerados como limitantes en manera alguna del alcance de la presente invención, el cual está definido por las reivindicaciones anexas.

Los porcentajes y partes son por peso, a menos que se exprese otra cosa.

Experimentación

Preparación de factor VIII recombinante

La producción de factor VIII recombinante SQ (r-VIII SQ) fue llevada a cabo esencialmente según se describe en la patente WOA-9109122 a Pharmacia & Upjohn, Ejemplos 1 a 3. Una línea celular CHO deficiente en DHFR (DG44) fue sometida a electroforesis con vector de expresión que contenía el gen r-VIII SQ y un vector de expresión que contenía el gen dihidrofolato-reductasa. Después de la selección sobre medio selectivo, las colonias supervivientes fueron amplificadas a lo largo del crecimiento en cantidades paso a paso crecientes de metotrexato. El sobrenadante de las colonias resultantes fue examinado individualmente en cuanto a la actividad del factor VIII. Se escogió un clon de producción y éste fue subsecuentemente adaptado para el crecimiento en suspensión libre de suero en un medio definido.

Material

La quimiostatina usada en los experimentos, contenía quimiostatina A, quimiostatina B y quimiostatina C, constituyendo la quimiostatina A la mayor porción. Los inhibidores de proteasa fueron todos de grado analítico y fueron obtenidos de Sigma en St. Louis, EEUU.

Métodos analíticos

La actividad del factor VIII de coagulación fue establecida mediante un ensayo de sustrato cromogénico (Coatest Factor VIII, Chromogenix AB, Mölndal, Suecia). El factor X activado (Xa) es generado a través del camino intrínseco donde el factor VIII actúa como co-factor. El factor Xa es determinado entonces mediante el uso de un sustrato cromogénico sintético, S-2222 en presencia de un inhibidor de trombina I-2581 para prevenir la hidrólisis del sustrato

ES 2 270 460 T3

por parte de la trombina. La reacción es detenida con ácido, y el VIII:C que es proporcional a la liberación de pNA (p-nitroanilina) se determina fotométricamente a 450 nm contra un blanco de reactivos. La unidad de factor VIII:C se expresa en unidades internacionales (IU) según lo define el actual Internacional Concentrate Standard (IS) establecido por la WHO.

La viabilidad de la célula fue determinada en diversas ocasiones como se revela en las Tablas I-IV, con el fin de verificar que los inhibidores añadidos no tienen efectos negativos sobre la supervivencia de la célula a lo largo del proceso completo de producción. Los análisis fueron hechos después de teñir las células con Eritrosina B en una cámara Bürker o por citometría de flujo. La porción de células viables fue calculada en relación con el número total de células (%).

Ejemplo 1

Este Ejemplo pretende ilustrar la eficiencia de la presente invención en comparación con otros diversos inhibidores de proteasa.

Las células CHO fueron cultivadas bajo condiciones de crecimiento en matraces giratorios en un medio de cultivo complete tal como ASF o una mezcla de DMEM y medio de Harr F-12. Inicialmente, la temperatura fue 37°C y el contenido de células fue de aproximadamente 0.7×10^6 células/ml de medio de cultivo celular. El día 0 fue definido como el día de inicio de la producción. La temperatura fue disminuida según comenzó el día de producción. La temperatura fue disminuida hasta 34°C. En el día 3, el medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco que incluía 0.5 mM de ácido butírico, y el contenido de células fue ajustado a aproximadamente 3×10^6 células/ml de medio de cultivo celular. En el día 4, se tomó una alícuota de una suspensión de las células en producción en tubos de polipropileno para un cultivo continuo y se añadieron los inhibidores de proteasa. En el día 5 el medio fue reemplazado y se añadieron los inhibidores de proteasa. El reemplazo del medio fue ejecutado en el día 6, día 7, día 10 /valor acumulado después de 72 horas). En el día 11, se detuvieron los experimentos. El análisis por Western Blot reveló que la calidad del factor producido no se afectó esencialmente. La viabilidad fue alta en general. El valor más bajo, 90% obtenido para el control y la aprotinina, en el día de producción 11.

Los resultados se dan en las Tablas siguientes.

(Tabla pasa a página siguiente)

Prueba	Concentración Inhibidor	Día 6, IU/ml	Día 6, %	Día 7, IU/ml	Día 7, %	Día 10, IU/ml	Día 10, %	Día 11, IU/ml	Día 11, %	Acumu- lado IU/ml	Acumu- lado %
1	Control	2.93	100	7.2	100	24.5	100	12.5	100	47.1	100
2	Fosforamidon 0.015 mM	4.93	168	11.0	152	34.5	141	15.1	121	65.6	139
3	Fosforamidon 0.15 mM	6.12	209	10.2	141	39.0	159	17.1	137	72.4	154
4 compara- tivo	Quinostatina 1.04 nM (0.625 µg/l)	5.48	187	12.5	174	33.7	138	15.7	126	67.4	143
5 compara- tivo	Quinostatina 10.4 nM (6.25 µg/l)	6.80	232	10.6	148	38.5	157	10.7	86	66.6	141

Factor VIII:C en medio de cultivo celular conteniendo inhibidores de proteasa de acuerdo a la invención

TABLA I

TABLA II
Factor VIII:C en medio de cultivo celular conteniendo inhibidores de proteasas no según la presente invención

Prueba	Concentración Inhibidor	Día 6, IU/ml	Día 6, %	Día 7, IU/ml	Día 7, %	Día 10, IU/ml	Día 10, %	Día 11, IU/ml	Día 11, %	Acumulado IU/ml	Acumulado %
1	Control	2.93	100	7.2	100	24.5	100	12.5	100	47.1	100
2	Aprotinina 0.3 µM	3.83	131	8.52	118	24.5	100	15.5	124	52.3	111
3	Aprotinina 3.0 µM	3.96	135	8.42	117	24.1	98	13.8	110	50.3	107
4	Cloroquina 0.625 µM	4.19	143	9.39	130	26.5	108	11.4	91	51.5	109
5	Cloroquina 6.25 µM	3.75	128	7.19	100	25.5	104	9.41	75	45.9	97
6	L-Histidina 0.52 mM	3.17	108	6.22	86	23.1	94	11.5	92	43.9	93
7	L-Histidina 5.2 mM	2.17	74	4.64	64	8.16	33	3.37	27	18.3	39

ES 2 270 460 T3

TABLA III

Viabilidad celular en medio de cultivo celular conteniendo inhibidores de proteasa de acuerdo a la presente invención

Prueba	Concentración Inhibidor	Día 6, %	Día 7, %	Día 10, %	Día 11, %
1	Control	97.4	97.5	91.4	90.7
2	Fosforamidón , 0.015 mM	98.6	96.5	89.1	94.7
3	Fosforamidón , 0.15 mM	98.8	96.7	91.3	93.1
4 comparativo	Quimiosatina, 1.04 nM (0.625 µg/l)	98.3	98.0	94.9	93.6
5 comparativo	Quimiosatina , 10.4 nM (6.25 µg/l)	95.3	95.9	91.6	94.0

TABLA IV

Viabilidad celular en medio de cultivo celular conteniendo inhibidores de proteasa no según la presente invención

Prueba	Concentración Inhibidor	Día 6, %	Día 7, %	Día 10, %	Día 11, %
1	Control	97.4	97.5	91.4	90.7
2	Aprotinina, 0.3 µM	97.7	98.4	93.8	89.4
3	Aprotinina, 3.0 µM	97.8	98.1	94.1	90.1
4	Clorequina, 0.625 µM	98.0	95.3	90.1	92.5
5	Clorequina, 6.25 µM	96.9	98.2	94.5	90.3
6	L-Histidina, 0.52 mM	98.0	98.0	92.5	92.8
7	L-Histidina, 5.2 mM	99.1	97.8	95.4	95.4

Como es evidente en la Tabla I, la presencia de inhibidores de proteasa de acuerdo con la presente invención incrementa dramáticamente la posibilidad de retener el factor VIII:C. Como es evidente de la Tabla II, la presencia de diversos otros inhibidores de proteasa tienen muy poco o aun un efecto negativo sobre el factor VIII:C. En la Tabla III es evidente que la producción incrementada del factor VIII ilustrada en la Tabla I, no puede ser atribuida a una viabilidad celular incrementada o diluida. Además, en la tabla IV es evidente que la falta de efecto en la producción del factor VIII ilustrada en la Tabla II, no es un efecto que contrarreste una viabilidad celular disminuida.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un factor VIII recombinante de coagulación humano biológicamente activo en un medio de cultivo celular que permite la expresión y secreción de dicho polipéptido, **caracterizado** porque un inhibidor de proteasas dependientes de metales seleccionado de un grupo consistente de péptidos o análogos de péptidos funcionalizados con fosforamidatos, se añade al medio de cultivo celular durante el periodo de cultivo, donde las células cultivadas expresan y secretan un factor VIII recombinante de coagulación humano biológicamente activo.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proteasa dependiente de metal es una metaloproteasa.

3. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque el ión metálico requerido para la actividad de la proteasa dependiente de metal es seleccionado del grupo consistente de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} .

4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el inhibidor de la proteasas dependientes de metal es fosforamidon que contiene un residuo de P-Leucina-Triptófano.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque la concentración del inhibidor de proteasas dependientes de metal está entre $1\mu\text{M}$ y 1 mM .

6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la célula es una célula de mamíferos.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque la célula de mamífero es seleccionada del grupo consistente de Ovario de Hámster Chino (CHO), células de Riñón de Hámster Bebé (BHK), células COS y células de hibridoma.

8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el medio de cultivo celular es un medio libre de suero.

9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el factor VIII recombinante de coagulación es un derivado eliminado del dominio B del factor VIII de longitud completa con actividad coagulante retenida.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque el derivado eliminado del dominio B del factor VIII es el factor VIII SQ (r-VIII SQ) recombinante.