



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 380**

51 Int. Cl.:
C07K 14/755 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98106133 .6**
86 Fecha de presentación : **03.04.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0872487**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.1998**

54 Título: **Preparación de Factor VIII recombinante en un medio libre de proteínas.**

30 Prioridad: **18.04.1997 US 844714**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **BAYER CORPORATION**
100 Bayer Road
Pittsburgh, Pennsylvania 15205-9741, US

72 Inventor/es: **Chan, Sham-Yuen y**
Harris, Kathleen

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

ES 2 273 380 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

Preparación de Factor VIII recombinante en un medio libre de proteínas.

5 Antecedentes de la invención

Campo

Esta descripción trata generalmente de la fabricación de Factor VIII recombinante y específicamente de la fabricación de Factor VIII recombinante en un medio libre de suero o proteínas.

Técnica anterior

La hemofilia A es un trastorno genético recesivo ligado al cromosoma X que se debe a una molécula de Factor VIII defectuosa o deficiente, dando como resultado una tendencia hemorrágica. Para controlar los episodios de sangrado, los hemofílicos son tratados con Factor VIII. Históricamente, el Factor VIII se ha aislado de plasma sanguíneo humano. Sin embargo, la terapia con Factor VIII derivado de plasma se ha asociado con la transmisión de varios virus humanos, tales como virus de hepatitis e inmunodeficiencia humana.

Con la llegada de la tecnología del DNA recombinante, la estructura del Factor humano y su gen se ha elucidado. El producto de transcripción del gen, que se deriva de 26 exones, es una molécula de RNA mensajero de -9000 bases de longitud, que codifica para una proteína grande de 2351 aminoácidos. Estudios estructurales del Factor VIII indican que es una glicoproteína que contiene un número significativo de residuos de carbohidrato.

El cDNA que codifica para el Factor VIII se ha clonado y expresado establemente en células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) y ovario de hámster chino (CHO). Se han desarrollado procedimientos comerciales para producir Factor VIII recombinante para el tratamiento de la hemofilia A. El Factor VIII recombinante es fabricado actualmente mediante células de mamífero manipuladas genéticamente, obviando así la dependencia del plasma y minimizando cualquier posible riesgo de transmisión de virus.

La amplificación génica ha sido el método de elección para derivar líneas celulares de alta producción para proteínas terapéuticas. La estrategia de amplificación implica la conexión de una unidad transcripcional que codifica la proteína deseada a un marcador amplificable tal como dihidrofolato reductasa. Se aplican a continuación técnicas de transfección para transferir el DNA del vector a células receptoras. Se seleccionan poblaciones de células con respecto a la resistencia incrementada al fármaco de elección, tal como metotrexato. El establecimiento de un clon celular estable se efectúa mediante clonación por dilución limitativa. Estos clones celulares se adaptan a continuación a un medio de producción libre de suero y se verifican con respecto a la producción de la proteína deseada.

EP 0534383 describe un procedimiento para preparar un complejo de proteína de Factor VIII de coagulación humano. Esta cita no dice nada con respecto a las características de la presente invención que se esbozan en las reivindicaciones.

Para proteínas lábiles tales como Factor VIII, se ha añadido albúmina humana como un estabilizante durante los procedimientos de preparación y purificación. Aunque la albúmina se somete a una etapa de inactivación viral mediante pasteurización, sería ideal que pudiera fabricarse Factor VIII recombinante en ausencia completa de proteínas sanguíneas humanas y animales. Se ha encontrado ahora que esto es posible usando un nuevo medio de cultivo celular. Los detalles se describen posteriormente.

Sumario de la invención

El método para la producción continua de cantidades relativamente grandes de Factor VIII recombinante (rFVIII) a partir de células de mamífero en ausencia de proteínas plasmáticas derivadas de seres humanos o animales comprende cultivar las células huésped de mamífero en un medio libre de proteínas complementado con un polímero poliólico tal como Pluronic F-68. El medio preferido incluye sulfato de cobre, un complejo de sulfato ferroso/EDTA y las sales de metales traza tales como manganeso, molibdeno, silicio, litio y cromo.

Descripción detallada de la invención

Los recientes avances en la tecnología de expresión de proteínas recombinantes han hecho posible la producción de proteína en grandes cantidades en células de mamífero. Células huésped adecuadas para la producción de Factor VIII incluyen líneas celulares tales como células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO) y células renales embrionarias humanas (HEK). Se prefieren particularmente las células de riñón de hámster recién nacido, específicamente las transfectadas con un gen capaz de dirigir la expresión de Factor VIII según se describe en Wood y otros (1984) (incluyendo derivados tales como variantes clonales y la progenie de las mismas). Tal línea celular se ha depositado en the American Type Culture Collection y se le ha asignado el número de registro ATCC CRL-8544.

ES 2 273 380 T3

La línea de células huésped deseada que tiene el gen de Factor VIII se adapta típicamente para crecer como cultivos en suspensión en un medio de producción libre de proteínas que está complementado con lipoproteína. El medio basal elegido para cultivar la línea de células huésped no es crítico para la presente invención y puede ser uno cualquiera de o una combinación de aquellos métodos conocidos en la técnica que son adecuados para cultivar células de mamíferos. Medios tales como medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio F-12 de Ham, medio esencial mínimo de Eagle y medio RPMI-1640 y similares están disponibles comercialmente. La adición de factores de crecimiento tales como insulina recombinante es convencional en la técnica.

Debido a la naturaleza lábil del Factor VIII, la productividad de las células huésped manipuladas se reduce severamente bajo condiciones libres de proteínas. Se usa comúnmente albúmina de suero humano como un complemento de cultivo libre de suero para la producción de proteínas recombinantes. La albúmina de suero humano sirve para muchas funciones incluyendo: (1) como un portador para ácidos grasos, colesterol y vitaminas lipófilas, hormonas esteroideas y factores de crecimiento; (2) como un agente protector contra daños debidos a fuerzas de cizallamiento; (3) como un tampón para cambios de pH; y (4) como un regulador de la presión osmótica. Otro papel crítico de la albúmina es quizás proteger a proteínas lábiles tales como Factor VIII de la proteólisis sirviendo como un substrato para proteasas.

Las impurezas presentes en preparaciones de albúmina también pueden contribuir al efecto estabilizador de la albúmina. Factores tales como lipoproteína (Chan, 1996) se han identificado como un sustituto para albúmina de suero humano para la producción de Factor VIII recombinante bajo condiciones libres de suero.

El intento de los presentes inventores para desarrollar un medio de producción libre de albúmina derivada de plasma humano condujo a la invención de esta descripción, un medio basal libre de proteínas para la producción de Factor VIII recombinante. El medio preferido consiste en medio esencial mínimo de Dulbecco y medio F-12 de Ham (50:50, en peso) complementados con insulina recombinante (Nucellin, Eli Lilly) a $10 \mu\text{g/ml}$ y $\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}$ ($50 \mu\text{M}$). Con la excepción de la producción de Factor VIII, las células BHK manipuladas crecen bien en este medio basal libre de proteínas.

Sorprendentemente, la adición de un poliol tal como Pluronic F-68 no tenía efecto sobre el crecimiento pero mejoraba la productividad específica de las células BHK con respecto al Factor VIII. Inesperadamente, la adición de sulfato de cobre potencia adicionalmente la producción de Factor VIII. Además, la inclusión de un grupo de metales traza tales como manganeso, molibdeno, silicio, litio y cromo conduce a incrementos adicionales en la producción de Factor VIII. Se desarrolló a continuación un procedimiento continuo para la producción de Factor VIII bajo condiciones libres de proteínas derivadas de plasma humano. Información adicional relativa al uso de polioles Pluronic puede encontrarse en Papoutsakis (1991) y Schmolka (1977).

Pluronic F-68, un poliglicol, (BASF, Wyandot) se usa comúnmente para prevenir la espumación que se produce en cultivos agitados y para proteger a las células de la tensión de cizallamiento y el daño por burbujeo en cultivos asperjados. Pluronic F-68 es un copolímero de bloques no iónico con un peso molecular medio de 8400, que consiste en un bloque central de poli(oxipropileno) (20% en peso) y bloques de poli(oxietileno) en ambos extremos. Una investigación extensiva del papel de Pluronic F-68 indica que Pluronic F-68 actúa como un tensioactivo y previene el daño a las células permitiendo el drenaje de las células desde las burbujas formadas en biorreactores durante la agitación o la aspersión. Sin embargo, varios investigadores han apuntado efectos beneficiosos de Pluronic F-68 sobre el crecimiento bajo condiciones de cultivo en las que el cizallamiento es mínimo (Mizrahi, 1975; Murhammer y Goochee, 1990). La copurificación de lípidos con Pluronic F-68 durante la purificación del producto proporciona una evidencia anecdótica de que el polímero Pluronic puede substituir a la albúmina no solo como un tensioactivo sino que también puede actuar como un portador para lípidos. Pluronic F-68 también puede prevenir el daño a la membrana procedente de células muertas antes de que pueda efectuarse la reparación, posiblemente mediante intercalación directa en la membrana. El papel de Pluronic F-68 al actuar como un tampón para iones metálicos es completamente desconocido.

Aunque existen informes de que Pluronic F-68 en medios puede incrementar la productividad volumétrica, el mecanismo de acción parece ser el mantenimiento de la viabilidad celular (Schneider, 1989; Qi, 1996). En cuanto al conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera vez que se ha observado que Pluronic F-68 incrementa la producción específica de un producto proteínico particular. Puesto que las viabilidades y las velocidades de crecimiento son comparables en el presente sistema con Pluronic F-68, el mantenimiento de la viabilidad celular no puede ser el mecanismo de acción de Pluronic F-68 en el presente sistema. Sin embargo, el efecto de la adición de Pluronic F-68 es inmediato y drástico, sea cual sea el mecanismo.

Se anticipa que una gama de otros polioles tendría efectos similares. Tales otros polioles incluyen copolímeros de bloques no iónicos de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno) que tienen pesos moleculares que varían de aproximadamente 1000 a aproximadamente 16.000.

Además de técnicas de cultivo en suspensión convencionales tales como matraces removidos, matraces giratorios y botellas rotatorias, el método de la presente invención también es aplicable para usar con biorreactores de perfusión y discontinuos. Después de cultivar las células huésped, el Factor VIII puede recuperarse del medio agotado mediante tecnologías estándar tales como ultrafiltración o centrifugación. Si se desea, el Factor VIII recuperado puede purificarse mediante, por ejemplo, intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaños, inmunofinidad o cromatografía de quelatos metálicos, y similares.

ES 2 273 380 T3

Según se usa aquí, un “medio libre de proteínas de ser humano o animal” es un medio de cultivo celular que está libre de cualquier proteína que se haya derivado de una fuente humana o una fuente animal. Las proteínas que se aíslan de fuentes humanas o animales tienen inherentemente el riesgo de introducir contaminación viral. El objetivo de un medio libre de proteínas humanas o animales es así eliminar o al menos reducir mucho el riesgo de transmisión viral.

Ejemplo 1

Células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) transfectadas con un gen capaz de dirigir la expresión de Factor VIII se obtuvieron de Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU. de A. La línea celular se preparó como se describe con detalle en Wood y otros (1984) y se depositó en the American Type Culture Collection con un número de registro ATCC CRL-8544. Una variante clonal de esta línea celular también se obtuvo de Genentech, Inc. y se usó en todos los ejemplos.

Las células BHK-21 que contenían el gen que codifica Factor VIII se cultivaron como cultivos en suspensión en matraces removidos usando un medio basal libre de suero que contiene lo siguiente: medio F-12 de Ham y medio esencial mínimo de Dulbecco (50:50, en peso), Nucellin (insulina recombinante, 5-10 $\mu\text{g/ml}$), $\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}$ (50 μM) y MgCl_2 (15 mM). Las células se mantuvieron y se sometieron a “pasadas” a intervalos de 48 horas. Las células se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos, se contaron y se volvieron a sembrar a una densidad de 1×10^6 células por ml. Cada matraz contiene 50-100 ml de medio reciente. Los matraces removidos se pusieron en un rotador, se incubaron a 37°C y se mantuvieron como cultivo en suspensión sometiendo a turbulencia suavemente entre 90-110 r.p.m. El efecto de un poliol tal como Pluronic F-68 (0,1%), mostrado como F-68 posteriormente, y sulfato de cobre (50 nM) sobre la producción de Factor VIII se examinó en los matraces removidos. El Factor VIII se cuantificó mediante un ensayo cromogénico. El ensayo es vendido comercialmente como un estuche de prueba conocido como Coatest VIII:C/4 y está disponible de Baxter HealthCare Products. Las células se mantuvieron mediante este procedimiento durante 24 días. La actividad de Factor VIII en cada medio, según se determinaba con el estuche Coatest VIII:C/4, se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

| Condiciones | Valoración (U/ml) | Productividad Específica ($\mu\text{U/célula/día}$) | % de Incremento sobre el basal + F-68 |
|---|----------------------|---|---|
| Medio Basal | 0,15 \pm 0,07* | 0,026 \pm 0,013 | 0 |
| Basal + F-68 (0,1%)** | 0,24 \pm 0,04 | 0,052 \pm 0,013 | 200 |
| Basal + F-68 (0,1%) + Cu (50 nM**) | 0,42 \pm 0,09 | 0,091 \pm 0,013 | 350 |
| <p>* Media de 36 muestras \pm desviaciones estándar. Las células se controlaron con respecto a la producción de Factor VIII durante un período de 24 días según se describe anteriormente.</p> <p>** Los experimentos de valoración mostraban que 0,1% es la dosis óptima para Pluronic F-68. Incrementar la concentración hasta 0,3% no tenía impacto significativo sobre la producción de Factor VIII. Los experimentos de respuesta a la dosis revelaban que el sulfato de cobre 50-800 nM es óptimo para la producción de Factor VIII.</p> | | | |

Según se muestra en la Tabla 1, la adición de Pluronic F-68 solo o, preferiblemente, en combinación con sulfato de cobre potencia significativamente la valoración y la productividad específica de células BHK que contienen el gen que codifica el Factor VIII bajo condiciones libres de proteína.

ES 2 273 380 T3

Ejemplo 2

Para optimizar adicionalmente la producción de Factor VIII bajo condiciones libres de proteínas, se añadieron metales traza al medio de producción libre de proteínas. La producción de Factor VIII se determinó a continuación mediante el sistema de cultivo de matraces removidos continuo que se describe en el ejemplo 1 durante 16 días. Los datos se muestran en la Tabla 2. En ausencia de sulfato de cobre, los metales traza no tenían efecto sobre la productividad de Factor VIII. Véase la Tabla 2.

TABLA 2

| Condiciones | Valoración (U/ml) | Productividad Específica ($\mu\text{U}/\text{célula}/\text{día}$) | % de Incremento sobre el basal + F-68 |
|--|-------------------|---|---------------------------------------|
| Basal + F-68 | 0,46 \pm 0,11 | 0,065 \pm 0,013 | 0 |
| Basal + F-68 + Cu | 0,53 \pm 0,15 | 0,078 \pm 0,026 | 120 |
| Basal + F-68 + Cu + metales* | 0,73 \pm 0,16 | 0,104 \pm 0,026 | 160 |
| * Los metales incluyen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (50 nM), MnSO_4 (3 nM), $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1,5 μM), $[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3 nM), $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,5 nM) y LiCl (236 nM). | | | |

Ejemplo 3

El efecto de metales traza y cobre sobre la producción de Factor VIII se evaluó adicionalmente en un fermentador de perfusión. Dos fermentadores de 1,5 litros se sembraron con la variante clonal de BHK a una densidad de 2×10^6 células/ml usando el medio basal descrito en la Tabla 1. El fermentador se perfundió a una velocidad de 0,5 litros/día. Un fermentador se mantuvo como un control y el otro fermentador se complementó con cobre y metales traza según se describe en la Tabla 2. Los fermentadores se mantuvieron durante 15 días con una densidad celular media de $2-3 \times 10^6$ células/ml. Según se muestra en la Tabla 3, la adición de Pluronic F-68, cobre y metales traza potenciaba significativamente la productividad específica de células BHK que alojan el gen que codifica Factor VIII bajo condiciones libres de proteínas bajo condiciones de perfusión continua. Este método de producción puede adaptarse fácilmente a fermentadores mayores (de 200 a 500 litros) equipados con dispositivos de retención de células tales como sedimentadores.

TABLA 3

| Días | Productividad Específica ($\mu\text{U}/\text{célula}/\text{día}$) | |
|------|---|--------------|
| | Medio basal | Cu + metales |
| 1 | 0,02 | 0,04 |
| 2 | 0,02 | 0,05 |
| 3 | 0,02 | 0,045 |
| 4 | 0,018 | 0,05 |

ES 2 273 380 T3

TABLA 3 (continuación)

| Días | Productividad Específica (μ U/célula/día) | |
|------|--|--------------|
| | Medio basal | Cu + metales |
| 5 | 0,02 | 0,05 |
| 6 | 0,035 | 0,060 |
| 7 | 0,025 | 0,055 |
| 8 | 0,02 | 0,04 |
| 9 | 0,025 | 0,06 |
| 10 | 0,02 | 0,065 |
| 11 | 0,025 | 0,070 |
| 12 | 0,025 | 0,065 |
| 13 | 0,02 | 0,060 |
| 14 | 0,03 | 0,06 |
| 15 | 0,02 | 0,05 |

Los ejemplos anteriores se proporcionan como un medio para ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitativos de la invención, que solamente está definida por las reivindicaciones.

Referencias

- Bihoreau**, N. y otros, *Eur. J. Biochem.* 222: 41-48 (1994).
- Chan**, S.Y., Patente de EE.UU. N° 5.576.194 (1996).
- Eis-Hubinger**, A.M. y otros, *Thromb. Haemost.* 76: 1120 (1996).
- Mizrahi**, A., *J. Clin. Microbiol.* 11-13 (1975).
- Murhammer**, D.W. y otros, *Biotechnol. Prog.* 6: 142-148 (1990).
- Papoutsakis**, E.T., *Trends in Biotechnology* (Tibtech) 9: 316-324 (1991).
- Qi**, Y-M. y otros, *Cytotechnology* 21: 95-109 (1996).
- Schmolka**, I.R., *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 54: 110-116.
- Schneider**, Y-J., *J. Immunol. Meth.* 116: 65-77 (1989).
- Wood**, W. y otros, *Nature* 312: 330-337 (1984).
- Xu**, D. y otros, *China J. Biotech.* 11: 101-107 (1995).
- Zhang**, J. y otros *Biotechnol.* 33: 249-258 (1994).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de Factor VIII recombinante a partir de células huésped de mamífero que tienen el gen para el mismo, que comprende cultivar dichas células huésped de mamífero en medio libre de proteína derivada de plasma y complementado con polioles e iones cobre.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliol es Pluronic F-68 y está presente en el medio en una concentración que varía de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,2% en peso.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio incluye sulfato de cobre en una cantidad que varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 800 nM.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que están presentes iones manganeso en una cantidad que varía de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 nM.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que están presentes iones que contienen molibdeno en una cantidad que varía de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 nM.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que están presentes iones que contienen silicio en una cantidad que varía de aproximadamente 75 a aproximadamente 300 nM.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que están presentes iones cromo en una cantidad que varía de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0 nM.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que están presentes iones litio en una cantidad que varía de aproximadamente 120 a aproximadamente 480 nM.
- 30 9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha célula huésped de mamífero se selecciona del grupo que consiste en células renales de hámster recién nacido, células renales embrionarias humanas y células de ovario de hámster chino.
10. Un medio de cultivo celular para la producción de Factor VIII recombinante, que comprende:
- 35 (a) un medio basal;
- (b) un poliol; y
- (c) iones cobre,
- 40 en donde el medio de cultivo celular está libre de proteína derivada de plasma.
11. El medio de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además al menos un metal traza seleccionado del grupo que consiste en manganeso, molibdeno, silicio, cromo y litio.
- 45 12. El medio de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los iones cobre están presentes en una cantidad que varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 800 nM.
- 50 13. El medio de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además iones molibdeno presentes en una cantidad que varía de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 nM.
14. El medio de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además iones litio presentes en una cantidad que varía de aproximadamente 120 a aproximadamente 480 nM.
- 55 15. El medio de acuerdo con una de las reivindicaciones 10-14, que comprende además insulina producida recombinantemente.

60

65