



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 705**

51 Int. Cl.:

C12N 1/02 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04730939 .8**

86 Fecha de presentación : **03.05.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1620549**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54

Título: **Proceso para la producción de sustancias biológicas por cultivo por perfusión de células animales suspendidas.**

30

Prioridad: **01.05.2003 EP 03101205**

73

Titular/es: **DSM IP Assets B.V.
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

72

Inventor/es: **Pol, van der, Leonardus, Adolfus**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 290 705 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

Proceso para la producción de sustancias biológicas por cultivo por perfusión de células animales suspendidas.

5 La invención se relaciona con un proceso para la producción de sustancias biológicas por cultivo por perfusión de células animales suspendidas en un medio de cultivo libre de suero, donde la sustancia biológica es separada de las células por filtración.

10 Tales procesos son conocidos en el arte, por ejemplo una reseña sobre cultivo por perfusión fue escrito por Tokashiki y otros 1993, Cytotechnology, vol 13: 149-159. En el cultivo por perfusión, donde la sustancia biológica es separada de las células por filtración, es preferido que la filtración sea tal que 1) las células son retenidas por el filtro, mientras que 2) el líquido que comprende la sustancia biológica pasa a través del filtro. Una medida de cuan bien realiza el filtro estas dos tareas es el producto de la concentración de células total promedio en el cultivo de células y el volumen total que pasa el filtro (funcionamiento del filtro). El funcionamiento del filtro es proporcional al rendimiento de la sustancia biológica.

20 Una desventaja del cultivo por perfusión, donde la sustancia biológica es separada de las células por filtración es, sin embargo, que ocurre una obstrucción del filtro durante el proceso. La obstrucción del filtro limita la cantidad total de volumen que puede pasar el filtro, limitando de esta forma el funcionamiento del filtro y por lo tanto limitando también el rendimiento de la sustancia biológica.

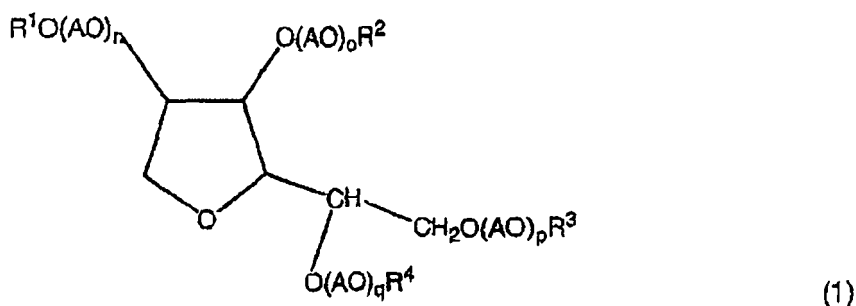
25 Es el objeto de la invención proporcionar un proceso para la producción de sustancias biológicas por cultivo por perfusión de células animales suspendidas en un medio de cultivo de células libre de suero, donde la sustancia biológica es separada de las células por filtración, donde la obstrucción del filtro es disminuida (es decir, el funcionamiento del filtro es incrementado).

Este objetivo es alcanzado por la invención por la presencia de una cantidad de surfactante no iónico de al menos 0.001% en peso en el medio de cultivo de células.

30 El uso de surfactantes no iónicos en un medio de cultivo de células libre de suero para células de mamíferos es conocido de US 5,372,943, sin embargo, en US 5,372,943, el uso está dirigido a la provisión de lípidos esenciales en una forma bio-disponible en un medio de cultivo de células. El solicitante sorprendentemente ha encontrado que el uso de surfactante no iónico en un medio de cultivo libre de suero para células de mamíferos también disminuye la obstrucción del filtro.

35 En principio, el límite superior de la cantidad de surfactante no iónico a ser usada en el medio de cultivo libre de suero no es muy crítico. Puede, sin embargo, por ejemplo, estar limitada por el nivel de toxicidad y/o la solubilidad del surfactante no iónico. El límite superior además puede depender de las condiciones del proceso y puede fácilmente ser determinado por la persona versada en el arte. Usualmente, el límite superior de la cantidad del surfactante no iónico presente en el medio de cultivo de células es 1% en peso.

40 En el proceso de la invención, el surfactante no iónico es preferiblemente un éster de ácido graso, por ejemplo un éster de ácido graso de glicerol o de diglicerol o un éster de ácido graso de polioxialquileno sorbitan representado por la fórmula 1,



60 donde R¹, R², R³ y R⁴ cada uno independientemente representa H o un grupo resto de ácido graso, es decir, el remanente de una condensación de un ácido graso y un alcohol, a condición de que al menos uno de R¹ a R⁴ es un grupo resto de ácido graso, donde A representa un grupo etileno o propileno y n, o, p y q cada uno independientemente representa valores desde 0 a 100, donde preferiblemente la suma de n, o, p, y q es desde 50 a 300.

65 Preferiblemente el grupo resto de ácido graso contiene 10-20 átomos de C. Ejemplos de ácidos grasos incluyen ácido decanoico, ácido laurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido de aceite de pulpa de madera etc.

ES 2 290 705 T3

Ejemplos de compuestos comercialmente disponibles de fórmula 1 incluyen compuestos TweenTM, por ejemplo, TweenTM-80, TweenTM-21 TweenTM--40, TweenTM-60, TweenTM-20, TweenTM-61 TweenTM-65, TweenTM-81, TweenTM-85. Por supuesto, es también posible usar una combinación de diferentes surfactantes no iónicos en el proceso de la invención,

5

Los ésteres de ácido graso son especialmente ventajosos en el proceso de la invención, ya que la presencia de pequeñas cantidades de estos ésteres no presenta un obstáculo para el uso de la sustancia biológica en una aplicación médica.

10 Preferiblemente, la cantidad del surfactante no iónico en el medio de cultivo de células es al menos 0.005, más preferiblemente al menos 0.01, más preferiblemente al menos 0.02% en peso.

15 Las células animales que pueden ser usadas en el proceso de la presente invención son por ejemplo células de mamíferos, por ejemplo células CHO (Ovario de Hamster Chino), hibridomas, células BHK (Riñón de Hamster Bebé), célula de mieloma y células humanas, por ejemplo células HEK-293 y células linfoblastoides humanas.

20 La filtración puede en principio ser realizada con todos los filtros apropiados para la retención de células. Ejemplos de tales filtros son los filtros estáticos, por ejemplo el filtro de fibra hueca o filtros de flujo tangencial o filtros rotatorios, por ejemplo filtros de eje. Preferiblemente, si la sustancia biológica es un producto biofarmacéutico, un filtro interno es usado ya que el uso de un filtro externo requiere validación adicional para la aprobación del proceso de producción del producto biofarmacéutico de acuerdo a las GMP (prácticas de buena fabricación) estándares. Un ejemplo de un filtro interno apropiado es un filtro de eje interno.

25 El tamaño de malla más apropiado de un filtro depende del diámetro de célula de la célula a ser retenida y puede fácilmente ser determinado por una persona versada en el arte. El tamaño de malla es preferiblemente seleccionado de manera que el tamaño de los poros en la malla es cercano al diámetro de las células suspendidas, asegurando una alta retención de las células mientras que los fragmentos de células pueden pasar el filtro. Preferiblemente, el tamaño de malla está entre 500 x 3000-50 x 300.

30 La invención puede en principio ser usada en cualquier tipo de medio de cultivo de células apropiado para el cultivo de células animales. Guías para seleccionar un medio de cultivo de células y condiciones de cultivo de células son bien conocidos y son por ejemplo proporcionados en el Capítulo 8 y 9 de Freshney, R.I. Cultivo de células animales (un manual de técnicas básicas), 4ta edición 2000, Wiley-Liss y en Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G. Cultivo de Células y Tejidos: Laboratory Procedures 1993, John Wiley & Sons.

35

40 Los medios libres de suero son preferidos al medio que contiene una fuente de suero en la producción de productos biofarmacéuticos ya que los medios fuentes de suero son frecuentemente contaminados con virus, presentando el riesgo de infecciones a priori, y pueden crear un obstáculo mayor en el procesamiento aguas abajo del producto biofarmacéutico (es decir, la purificación adicional del producto biofarmacéutico del medio de cultivo de células). Ya que los compuestos de una fuente de mamíferos también presentan un riesgo de infección, preferiblemente, el medio de cultivo de células no está solamente libre de suero, sino también libre de fuente de mamíferos. Más preferiblemente el medio de cultivo de células no está solamente libre de fuente de mamíferos, sino también libre de suero animal.

45 El pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo de células son en principio no críticos y dependen del tipo de células seleccionadas. Preferiblemente, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad son seleccionadas de manera que sean óptimos para el crecimiento y productividad de la célula. La persona versada en el arte conoce cómo encontrar el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad óptimos para el cultivo por perfusión. Usualmente, el pH óptimo está entre 6.6 y 7.6, la temperatura óptima entre 30 y 39°C, la osmolaridad óptima entre 260 y 400 mOsm y la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo de células entre 5 y 95% de la saturación del aire.

50

55 Las sustancias biológicas que pueden apropiadamente ser producidas en el cultivo por perfusión por la célula animal son en principio sustancias biológicas que pueden ser producidas por una célula animal, por ejemplo proteínas terapéuticas y de diagnóstico, por ejemplo anticuerpos monoclonales, enzimas y factores de crecimiento, ADNs, los cuales por ejemplo pueden ser usados en terapia génica, vacunas, hormonas, etc. Preferiblemente, el proceso de acuerdo a la invención es usado para la producción de un producto biofarmacéutico, el cual es una sustancia biológica con una aplicación médica. Ejemplos de productos biofarmacéuticos son como sigue (con ejemplos de nombres comerciales de los productos biofarmacéuticos correspondientes entre paréntesis): Tenecteplase (TN KaseTM), factor antihemofílico (recombinante) (ReFactoTM), Interferón linfoblastoide α -n1 (WellferonTM), factor de coagulación (recombinante) (NovoSevenTM), Etanercept, (EnbrelTM), Trastuzumab (HerceptinTM), Infliximab (RemicadeTM), Basiliximab (SimulectTM), Daclizumab (ZenapazTM), Factor de coagulación IX (recombinante) (BenefixTM), eritropoietina alfa (Epogen[®]), G-CSF (Neupogen[®]/Filgrastim), Interferón alfa-2b (infergen[®]), insulina recombinante (Humulin[®]), Interferón beta 1a (Avonex[®]), Factor VIII (KoGENate[®]), Glucocerebrosidasa (CerezymeTM), Interferón beta 1b (Betaseron[®]), receptor alfa TNF (Enbrel[®]), Hormona de estimulación del folículo (GonalF[®]), Mab abciximab (Synagis[®]), ReoPro[®]), Mab ritiximab (Rituxan[®]), activador de plasminógeno del tejido (Activase[®]), Actilyase[®]), hormona de crecimiento humano (Protropin[®], Norditropin[®], GenoTropinTM). Ejemplos de ADNs con una posible aplicación médica son ADNs plásmidos terapéuticos génicos. Algunos ADNs terapéuticos génicos son actualmente probados en ensayos clínicos para su aplicación médica. Ejemplos de vacunas son la vacuna del Rotavirus

65

ES 2 290 705 T3

tetravalente, oral, viva (Rotashield™), vacunas de conejos (RanAvert™), vacuna de la Hepatitis B (RECOMBIVAX HB®, Engerix®) y vacuna de la Hepatitis A inactivada (VAQTA™).

La sustancia biológica, que fue pasada a través del filtro puede ser adicionalmente purificada en el así llamado procesamiento aguas abajo. El procesamiento aguas abajo usualmente comprende varias etapas de purificación variando las combinaciones y el orden. Ejemplos de pasos de purificación en el procesamiento aguas abajo son los pasos de separación (por ejemplo por cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico), pasos para la concentración de la sustancia biológica (por ejemplo por ultra-filtración o diafiltración), pasos para el intercambio de buffer y/o pasos para eliminar o inactivar virus (por ejemplo por filtración de virus, desplazamiento del pH o tratamiento con detergente solvente).

La invención será dilucidada por medio del siguiente ejemplo, sin estar, sin embargo limitada a este.

Ejemplo 1

Células de hibridoma PFU-83 son células de hetero-hibridoma de rata/ratón que producen un IgG de rata dirigido contra el factor de liberación de corticotropina (J. W. A. M. van Oers y otros, 1989, Endocrinología, 124, pp. 1239-1246). Las células de hibridoma PFU-83 fueron cultivadas en un medio libre de fuente de mamífero mínima a 37°C. El medio libre de fuente de mamífero mínima usada fue 3:1 DMEM/medio F12 de Ham, conteniendo ácido ascórbico (5 mg/l), insulina humana recombinante (5 mg/l, glutatión (1 mg/l), Pluronic™ F68 (500 mg/l), selenio en forma de Na₂SeO₃ (15 µg/l), bicarbonato de sodio (3 g/l), etanolamina (7 µl/l), suplementado con glutamina (concentración final 584,5 mg/l), piruvato de Na (concentración final 110 mg/l) y transferrina (5 mg/l) con una osmolaridad de 320 mOsm. El pH fue establecido a 7,0 y la concentración de oxígeno disuelto fue establecida en 30% de saturación de aire. El cultivo fue realizado en un fermentador Applikon de 7 l corriendo a un volumen de trabajo de 4 l usando un filtro de eje con un tamaño de malla de 325 x 2300 en presencia de concentraciones diferentes de Tween®-80 (0,15 mg/l y 50 mg/l; correspondiendo a aproximadamente 0; 0,015; y 0,050% en peso). Una concentración de células viable de aproximadamente 5*10⁶ fue alcanzada después de 4 a 5 días.

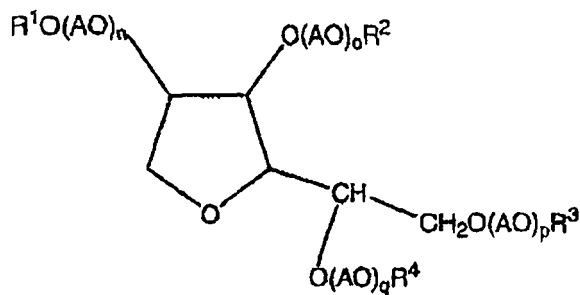
Todas las diferentes corridas tuvieron una retención de células de 100%. El tiempo hasta la completa obstrucción del filtro (el punto cuando el filtro de eje se inunda) fue observado y el funcionamiento del filtro de eje fue calculado. El funcionamiento del filtro de eje es definido como el producto del volumen total que ha pasado el filtro de eje y la concentración de células total promedio en el fermentador. Las concentraciones de células en el fermentador fueron determinadas contando la cantidad total de células muertas y viables en las muestras de cultivo de células tomadas durante la corrida del fermentador bajo un microscopio de luz usando un hemacitómetro Fuchs-Rosenthal y exclusión con tripan-azul para teñir las células muertas. Los resultados de este experimento son mostrados en la Tabla 1 a continuación. De la Tabla 1 puede ser observado que el tiempo hasta la obstrucción, así como el funcionamiento del filtro de eje es incrementado con la adición de Tween®-80.

TABLA 1

[Tween®-80] (mg/l)	Tiempo hasta la completa obturación (días)	Volumen total que ha pasado el filtro de eje (l)	Concentración de células total promedio (x 10 ⁹ /l)	Funcionamiento del filtro de eje (carga de célula total)
0	7	14	3,77	53
15	9	25	4,97	127
50	29	99	4,68	463

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de una sustancia biológica por cultivo por perfusión de células animales suspendidas en un medio de cultivo de células libre de suero, donde la sustancia biológica es separada de las células por filtración, **caracterizado** porque al menos 0.001% en peso de éster de ácido graso de polioxialquileno sorbitan representado por la fórmula 1,



donde R¹, R², R³ y R⁴ cada uno independientemente representa H o un grupo resto de ácido graso, es decir el remanente de una condensación de un ácido graso y un alcohol, a condición de que al menos uno de R¹ a R⁴ es un grupo resto de ácido graso, donde A representa un grupo etileno o propileno y n, o, p y q cada uno independientemente representa valores desde 0 a 100 está presente en el medio de cultivo de células.

2. Proceso de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la fórmula 1, la suma de n, o, p, y q es desde 50 a 300.

3. Proceso de acuerdo a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque al menos 0.01% en peso del compuesto de fórmula 1 está presente en el medio de cultivo de células.

4. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque las células animales son células de mamíferos.

5. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque el compuesto de fórmula 1 es un compuesto TweenTM.

6. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la filtración es realizada con un filtro interno.

7. Proceso de acuerdo a la reivindicación 6, **caracterizado** porque el filtro interno es un filtro de eje.

8. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque la sustancia biológica es un producto biofarmacéutico.

9. Proceso de acuerdo a la reivindicación 8, **caracterizado** porque el medio de cultivo de células libre de suero es también un medio libre de fuente de mamífero.

10. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque la sustancia biológica es adicionalmente purificada por un procesamiento aguas abajo.