



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 559**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

C07K 14/825 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05857769 .3**

96 Fecha de presentación : **28.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1807504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Medio de cultivo de células exento de suero para mamíferos.**

30 Prioridad: **02.11.2004 EP 04105451**
04.11.2004 US 624885 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73 Titular/es: **ARES TRADING S.A.**
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es: **Casatorres Hernández, José y**
Martin Piera, Carlos

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 559 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

Medio de cultivo de células exento de suero para mamíferos

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención es del campo del cultivo de células de mamíferos bajo condiciones de cultivo exentas de suero, en particular para el cultivo de células productoras de proteínas recombinantes como, por ejemplo, la hormona del crecimiento humano (hGH).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención usa un medio exento de suero para el crecimiento y mantenimiento de células de mamíferos en cultivo.

El cultivo de células es ampliamente usado en la actualidad para la preparación de diversos productos biológicamente activos como vacunas virales, anticuerpos monoclonales, inmuno-reguladores no anticuerpos, factores de crecimiento de polipéptidos, hormonas, enzimas, antígenos específicos para tumores, etc. Estos productos son preparados mediante células tratadas normales o transformadas y tratadas por ingeniería genética.

Para cultivar células, en el pasado, el medio de cultivo fue complementado con suero, que sirve como un nutriente universal para el crecimiento y mantenimiento de todas las líneas celulares de mamíferos que producen productos biológicamente activos. El suero contiene hormonas, factores de crecimiento, proteínas portadoras, factores de unión y extensión, nutrientes, elementos residuales, etc. Los medios de cultivo contenían habitualmente hasta aproximadamente 10% de suero de animal, como suero bovino fetal (FBS), también denominado suero de ternera fetal (FCS).

Aunque es ampliamente usado, el suero tiene muchas limitaciones. Contiene niveles elevados de numerosas proteínas que interfieren con las cantidades limitadas de la proteína de interés deseada producida por las células. Estas proteínas derivadas del suero deben ser separadas del producto durante el tratamiento en dirección descendente, como la purificación de la proteína de interés, lo que complica el procedimiento y aumenta el coste.

El advenimiento de la BSE (encefalopatía espongiforme bovina), una enfermedad neurodegenerativa transmisible del ganado con un período prolongado de latencia o incubación, ha elevado las preocupaciones reguladoras acerca del uso de sueros derivados de animales en la preparación de productos biológicamente activos.

Por lo tanto, hay una gran demanda para el desarrollo de medios alternativos exentos de suero animal que apoyen el crecimiento de células y mantengan las células durante la preparación de productos biológicamente activos.

Generalmente, los medios de cultivos de células comprenden muchos componentes de categorías diferentes, como aminoácidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y compuestos adicionales:

- Aminoácidos: por ejemplo, el documento US 6.048.728 (Inlow et al.) describe que los siguientes aminoácidos pueden ser usados en un medio de cultivo celular: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, triptófano, tirosina, treonina y valina.

- Vitaminas: el documento US 2003/0096414 (Ciccarone et al.) o el documento US 5.811.299 (Renner et al.), por ejemplo, describen que pueden ser usadas las siguientes vitaminas en un medio de cultivo celular: biotina, pantotenato, cloruro de colina, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, piridoxina, riboflavina, vitamina B12, tiamina o putrescina.

- Sales: por ejemplo, el documento US 6.399.381 (Blum et al.) describe un medio que comprende CaCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl , fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, selenito de sodio, CuSO_4 , ZnCl_2 . Otro ejemplo de un documento que describe sales inorgánicas que pueden ser usadas en un medio de cultivo es US 2003/0153042 (Arnold et al.), que describe un medio que comprende CaCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl , fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 .

- Ácidos grasos: los ácidos grasos que se conoce que se usan en los medios son ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, así como metil-beta-ciclodextrina, véase, por ejemplo, el documento US 5.045.468 (Darfler). Debe apreciarse que la ciclodextrina no es un lípido por sí misma, sino que tiene la capacidad de formar un complejo con lípidos y, por tanto, es usada para solubilizar lípidos en el medio de cultivo celular.

- Componentes adicionales, en particular usados en el marco de medios de cultivos de células exentos de suero, son compuestos como glucosa, glutamina, piruvato de Na, insulina o etanolamina (por ejemplo, documento EP 274.445) o un agente protector como Pluronic F68. El Pluronic® F68 (también conocido como Poloxamer 188) es un copolímero de bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO).

Los "medios básicos" estándar son también conocidos por un experto en la técnica. Estos medios contienen ya varios de los componentes de medios anteriormente mencionados. Ejemplos de estos medios que son ampliamente

aplicados son medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DMEM F12 (1:1), mezcla F-10 nutriente de Ham, medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), MCDB131 o medio E de William. Estos medios comerciales están disponibles, por ejemplo en la empresa Gibco, Invitrogen.

5 Los metales como zinc (Zn) y cobre (Cu) están involucrados en las reacciones metabólicas (Vallee y Falchuk, 1993, o Lindner, 1991).

10 El zinc es esencial para la estructura y la función de un gran número de macromoléculas y para muchas reacciones enzimáticas. Desempeña una función catalítica, co-catalítica o estructural en el apropiado plegado de las proteínas. El Zn-ATP es necesario para la síntesis de piridoxal-5-fosfato y para flavina adenosina dinucleótido (FAD), dos co-enzimas esenciales para la síntesis de ácidos biogénicos y el metabolismo de monoamina oxidasa.

15 La actividad del zinc en la protección de estructuras biológicas del deterioro por radicales libres puede ser debida a diversos factores: mantenimiento del nivel adecuado de metaloproteínas, que son también depuradores de radicales libres, como un componente esencial de superóxido dismutasa o como un agente protector para tioles y en la evitación de la interacción de grupos químicos con hierro para formar radicales libres.

20 Además de eso, la presencia de Zn evita la peroxidación de lípidos. El zinc es también un efector de la polimerización de tubulina y actúa *in vitro* sobre la formación y estabilización de filamentos de actina. El zinc es también un componente del resto digitador de zinc de proteínas de unión de DNA, que es un resto común en proteínas de transcripción.

25 Los iones de zinc existen principalmente en forma de complejos con proteínas y ácidos nucleicos y participan en todos los aspectos del metabolismo intermedio, transmisión y regulación de la expresión de información genética, almacenamiento, síntesis y acción de hormonas péptidas y el mantenimiento estructural de cromatina y biomembranas.

30 El cobre es también un elemento residual importante para la función de muchas enzimas celulares. Los iones de cobre pueden adoptar distintos estados redox, Cu (II) oxidado o Cu (I) reducido, permitiendo que el metal desempeñe una función clave en la fisiología celular como un cofactor catalítico en la química redox de las enzimas. Funciona en un grupo de oxidasas de cobre que incluyen citocromo c oxidasa, tirosinasa, dopamina-β-monooxigenasa, amina oxidasas, y lisil oxidasa. El cobre participa también en la respiración mitocondrial, la homeostasis del hierro como un componente de ceruloplasmina, depurador de radicales libres y reticulación de elastina.

35 Los medios exentos de suero que contienen iones metálicos como iones de zinc o cobre son conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir de los documentos US 6.048.728 (Inlow et al.), US 4.767.704 (Cleveland et al.) o WO 01/16294 (Life Technologies Inc.). Sin embargo, estos documentos no describen ningún efecto mejorado de la productividad de estos iones si son añadidos a concentraciones específicas de un medio de producción estándar.

40 Para el desarrollo y suministro de productos biológicamente activos, como proteínas terapéuticas o vacunas, deben ser producidas grandes cantidades. Las células adecuadas que son ampliamente usadas para la producción de polipéptidos son células de ovarios de hámster chinos (CHO).

45 Las células CHO fueron cultivadas en primer lugar por Puck (J. Exp. Med. 108, 945, 1958) a partir de una biopsia de un ovario de hámster chino hembra. A partir de estas células originales se preparó un cierto número de sub-líneas con diversas características. Una de estas líneas de células CHO, CHO-K1, requiere prolina y es diploide para el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR). Otra línea derivada de esta línea celular es una línea celular CHO deficiente en THFR (CHO DUK B11) (PNAS 77, 1980, 4216-4220), que se caracteriza por la pérdida de la función DHFR como consecuencia de la mutación de un gen DHFR y la posterior pérdida del otro gen.

50 Otras células que son frecuentemente usadas para la producción de proteínas destinadas a una administración a seres humanos son las líneas celulares humanas como la línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 o la línea celular 293 de riñón embrionario humano.

55 La línea celular C127 de muridos es también altamente adecuada para la producción de proteínas recombinantes (Carter et al., 1989; Oka and Rupp; 1990).

60 Una proteína terapéutica de interés es la hormona del crecimiento. La hormona del crecimiento humano (hGH), también conocida como somatotropina (INN) o somatotropina, es una hormona de proteína producida y secretada por células somatotrópicas de la pituitaria anterior. La hormona del crecimiento humano desempeña una función clave en el crecimiento somático en la infancia y en el metabolismo en la edad adulta a través de sus efectos sobre el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y lípidos.

65 La hormona del crecimiento humano es una cadena única de polipéptido de 191 aminoácidos (Bewly et al, 1972) que tiene dos enlaces disulfuro, uno entre Cys-53 y Cys-165, formando un gran bucle en la molécula, y el otro entre Cys-182 y Cys-189 formando un pequeño bucle cerca del C terminal. La secuencia de DNA que confirmó la secuen-

cia de aminoácidos fue expuesta por Martial et al (1979). La hGH purificada es un polvo amorfo blanco en su forma liofilizada. Es altamente soluble (concentraciones > 10 mg/ml) en tampones acuosos a un pH en un intervalo de 6,5 a 8,5.

En solución, la hGH existe predominantemente en forma de un monómero, con una pequeña fracción en forma de dímeros y oligómeros de pesos moleculares superiores. Bajo ciertas condiciones, puede ser inducida hGH para formar cantidades mayores de dímeros, trímeros y oligómeros superiores.

Son conocidos diversos derivados de hGH, que incluyen derivados que se producen de forma natural, variantes y productos metabólicos, productos de degradación principalmente hGH biosintética y derivados tratados por ingeniería de hGH producidos mediante métodos genéticos. Un ejemplo de un derivado que se produce de forma natural de hGH es GH-V, una variante de hormona del crecimiento encontrada en la placenta. Otros miembros del lugar génico se describen por Chen et al (1989). Cualquier derivado de hGH, incluidos los derivados diseñados para una larga duración en el cuerpo pueden ser usados para los fines de la presente invención, en la medida en que retengan la actividad biológica de hGH.

La metionil-hGH fue la primera forma de hGH en ser producida a través de la tecnología de DNA recombinante. Este compuesto es realmente un derivado de hGH que tiene un residuo de metionina adicional en su N terminal (Goeddel et al. 1979).

Se ha expuesto que una variante de hGH que se produce de forma natural, denominada 20-K-hGH, se produce en la pituitaria, así como en la corriente sanguínea (Lewis et al, 1978; Lewis et al. 1980). Este compuesto, que carece de los 15 residuos de aminoácidos de Glu-32 a Gln-46, surge de una escisión alternativa del ácido ribonucleico mensajero (DeNoto et al, 1981). Este compuesto comparte muchas, pero no la totalidad, de las propiedades biológicas de la hGH.

La 20-K-hGH se prepara en la pituitaria y es secretada a la sangre. Constituye aproximadamente un 5% de la producción de hormona del crecimiento de adultos y aproximadamente un 20% de la producción de hormonas del crecimiento de niños. Tiene la misma actividad favorecedora del crecimiento que la hormona del crecimiento de 22 kD y se ha descrito que tiene una cantidad igual o superior de actividad lipolítica que la forma de 22kD. Se une a los receptores de las hormonas del crecimiento con igual afinidad que la hormona del crecimiento de 22kD y tiene una décima parte de la bioactividad lactogénica (de tipo prolactina) que la hormona 22kD. Al contrario que la de 22kD, la de 20-K-hGH tiene una débil actividad anti-insulina.

Un cierto número de derivados de hGH surge de modificaciones proteolíticas de la molécula. La trayectoria principal del metabolismo de hGH incluye la proteólisis. La zona de hGH alrededor de los residuos 130-150 es extremadamente susceptible a la proteólisis y se han descrito diversos derivados de hGH que tienen mellas o deleciones en esta zona (Thorlacius-Ussing, 1987). Esta zona está en el bucle grande de la hGH y la escisión de un enlace péptido en la misma da lugar a la generación de dos cadenas que están conectadas a través del enlace disulfuro en Cys-53 y Cys-165. Muchas de estas formas de dos cadenas de ha expuesto que tienen una actividad biológica aumentada (Singh et al. 1974). Han sido generados muchos derivados de hormona del crecimiento humano de forma artificial mediante el uso de enzimas. Las enzimas tripsina y subtilisina, así como otras, han sido usadas para modificar la hGH en diversos puntos por toda la molécula (Lewis et al 1977; Graff et al, 1982). Uno de estos derivados, denominado proteína anabólica de dos cadenas (2-CAP) se formó a través de la proteólisis controlada de hGH usando tripsina (Becker et al, 1989). La 2-CAP se encontró que tenía propiedades biológicas muy distintas de la molécula de hGH intacta, en cuanto que la actividad favorecedora del crecimiento de la hGH estaba ampliamente retenida y se evitaban la mayoría de los efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono.

Los residuos de asparagina y glutamina en las proteínas son susceptibles de reacciones de desamidación bajo condiciones apropiadas. La hGH de pituitaria se ha mostrado que experimenta este tipo de reacción, dando lugar a la conversión de ASN-152 en ácido aspártico y también, en menor medida, a la conversión de Gln-137 en ácido glutámico (Lewis et al, 1981). La hGH desamidada se ha mostrado que tiene una susceptibilidad alterada a la proteólisis con la enzima subtilisina, sugiriendo que la desamidación puede tener un carácter fisiológico significativo en la dirección de la escisión proteolítica de la hGH. La hGH biosintética se conoce que se degrada bajo ciertas condiciones de almacenamiento, dando lugar a la desamidación en una asparagina diferente (Asn-149). Este es el sitio principal de desamidación, pero se ha observado también la desamidación en Asn-152 (Becker et al, 1988). La desamidación en Gln-137 no ha sido expuesta en la hGH biosintética.

Los residuos de metionina en las proteínas son susceptibles a la oxidación, principalmente al sulfóxido. La hGH, tanto derivada de pituitaria como biosintética, experimenta sulfoxidaciones en Met-14 Met-125 (Becker et al, 1988). La oxidación de Met-170 ha sido expuesta también hGH de pituitaria pero no en la biosintética. Tanto la hGH desamidada como la Met-14 sulfóxido hGH se ha encontrado que exhiben una actividad biológica completa (Becker et al, 1988).

Han sido producidas formas truncadas de hGH, mediante acciones de enzimas o bien mediante métodos genéticos. La 2-CAP, generada mediante las acciones controladas de tripsina, tiene los ocho primeros residuos en el N terminal de hGH suprimidos. Otras versiones truncadas de hGH han sido producidas modificando el gen antes de la expre-

sión en un hospedante adecuado. Los 13 primeros residuos han sido suprimidos para producir un derivado que tiene propiedades biológicas distintivas (Gertler et al, 1986) en la que no es escindida la cadena de polipéptido.

Aunque la hormona del crecimiento humano se obtuvo generalmente a partir de glándulas pituitarias de cadáveres, estas preparaciones no eran electroforéticamente homogéneas y aparecían anticuerpos en el suero de pacientes tratados con preparaciones de aproximadamente 50% de pureza, siendo atribuida la inmunogenicidad a componentes inactivos. La tecnología de DNA recombinante permitió la producción de un suministro ilimitado de hGH en un cierto número de sistemas diferentes. La purificación de hGH a partir del medio de cultivo es facilitada mediante la presencia de solamente cantidades bajas de proteínas contaminantes. De hecho, se ha mostrado que la hGH puede ser purificada a escala de laboratorio mediante una etapa de purificación única en una columna de HPLC de fase inversa (Hsiung et al (1989)).

La hormona del crecimiento humano recombinante, rhGH, es producida por la entidad Serono International S.A. como SEROSTIM®, producto al que le ha sido concedida una aprobación acelerada de la FDA para tratar pérdidas de peso en pacientes de SIDA. El SAIZEN® es una hormona del crecimiento humano recombinante indicada para deficiencias de GH en niños, para el síndrome de Turner en niñas así como para el fallo renal crónico en niños. PROTROPIN®, producido por la entidad Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) difiere ligeramente en su estructura de la hGH de secuencia natural, teniendo un residuo de metionina adicional en el N terminal. La hGH recombinante es generalmente comercializada en forma de viales que contienen hGH más excipientes adicionales, por ejemplo, glicina y manitol, en una forma liofilizada. Se proporciona un vial de diluyente de compañía, que permite que el paciente reconstituya el producto hasta la concentración deseada antes de la administración de la dosis. La hGH puede ser comercializada también de otras maneras bien conocidas, como jeringuillas previamente rellenas, etc.

En general, no se han observado diferencias significativas en las actividades farmacocinéticas o biológicas de la hGH de secuencia natural recombinante, N-metionil-hGH recombinante o material derivado de pituitaria en seres humanos (Moore et al, 1988; Jorgensson et al, 1988).

Considerando las diversas indicaciones médicas para las que es usada la hormona del crecimiento, hay una necesidad de una vía eficaz y segura para producir cantidades suficientes de la misma en un cultivo celular, en particular en un procedimiento de cultivo celular exento de suero.

Los medios exentos de suero han sido descritos en la técnica.

Por ejemplo, el documento US 6.162.643 describe un medio basal exento de suero denominado HECK-109, que contiene cantidades residuales de sulfato de cobre y cloruro de zinc. Este medio está específicamente diseñado para cultivos primarios y secundarios de células humanas normales como queratinocitos con el objetivo de la generación de tejidos para trasplantes humanos. La expresión de proteínas humanas recombinantes en células *in vitro* no es mencionada en esta patente de EE.UU.

El documento US 5.324.656 describe un medio basal exento de suero denominado MCDB120 y MCDB131M, que comprende cantidades residuales de sulfato de cobre y cloruro de zinc. Este medio está específicamente diseñado para el cultivo *in vitro* de células satélites de músculos humanos con el objetivo de evitar la diferenciación de estas células. La producción de proteínas humanas recombinantes no está prevista en el marco de este documento.

El documento GB 2.196.348 describe un medio sintético para el cultivo *in vitro* de células de hibridomas y mielomas. El medio contiene iones de cobre, zinc y férricos. El cultivo de células de hibridomas y mielomas en este medio es exclusivamente para la finalidad de fabricar anticuerpos monoclonales.

El documento US 6.103.529 proporciona una formulación de medio de cultivo celular exento de suero para el cultivo *in vitro* de células animales. Las células animales pueden ser usadas para la producción de virus, anticuerpos monoclonales, hormonas o factores de crecimiento. Sin embargo, no se menciona la producción de hormona del crecimiento en este documento.

El documento US 6.048.728 describe un medio de cultivo celular exento de proteínas que comprende iones de Co, Zn y Fe para el cultivo de células animales con el fin de producir, por ejemplo, productos naturales o recombinantes con anticuerpos. Estos productos que van a ser producidos por las células cultivadas no incluyen hormonas del crecimiento ni factores de crecimiento, que son exclusivamente mencionados como constituyentes del medio exento de suero con el fin de mejorar el crecimiento celular en el cultivo.

El documento US 5.316.938 describe un medio de cultivo bioquímicamente definido para células de ovarios de hámster chino (CHO) que comprende citrato férrico, sulfato de zinc y sulfato de cobre, denominado WCM5. El medio está específicamente diseñado para la producción de anticuerpos y tPA en células CHO.

El documento US 5.122.459 describe un método para la producción de proteínas recombinantes en un medio de cultivo exento de suero que contiene iones de zinc y férricos, particularmente adecuado para el cultivo de células

CHO, no se menciona la producción de hormonas de crecimiento en este documento.

El documento WO 98/08934 describe un medio exento de suero que comprende zinc 1-11 μM y cobre 4-26 nM. Se describe un medio separado que comprende hierro 1-6 μM y zinc 3-500 nM.

El documento US 2003/0096402 describe un medio de cultivo exento de componentes derivados de suero animal para líneas celulares que expresan proteínas terapéuticas. Contiene cobre 2-40 nM, hierro 3,5 nM-0,35 μM y zinc 27 nM-0,34 μM . El documento no describe la expresión de hormona del crecimiento.

El documento US 4.767.704 describe un medio de cultivo exento de proteínas que comprende cobre 2,5-10 nM, hierro 0,8-3,2 μM y zinc 0,8-2,9 μM .

Por lo tanto, el problema que subyace en la presente invención es proporcionar un medio de cultivo celular exento de suero para la producción eficaz de hormona del crecimiento, en particular hormona del crecimiento humano (hGH).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el desarrollo de un medio de cultivo celular que está exento de componentes derivados de suero animal y que, al mismo tiempo, es altamente eficaz para el crecimiento y mantenimiento celular de células de mamíferos en cultivo, permitiendo particularmente la producción de proteínas recombinantes.

Se describe un medio de cultivo celular exento de componentes derivados de suero animal, que comprende iones de zinc, cobre así como hierro en cantidades residuales.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de hormona del crecimiento que comprende la etapa de cultivar una célula que expresa hormona del crecimiento en el medio de la invención.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de un medio según la invención para la producción de hormona del crecimiento.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un medio según la invención para el mantenimiento de células de cultivo durante la fase de producción de hormona del crecimiento.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra el perfil de productividad de rhGH obtenido en la fase de producción bajo la adición continua de diferentes elementos a 10 μM en medio de cultivo DMEM (RB= frasco rotativo, H1-H14 = días 1 a 14 de la fase de producción);

la Fig. 2 muestra los valores medios de producción de rhGH, expresados como mg de rhGH por frasco rotativo, obtenidos en la fase de producción bajo la adición continua de metales (níquel, bario, cobalto, cromo) a 10 μM en medio de cultivo DMEM;

la Fig. 3 muestra los valores medios del aumento de productividad de rhGH en comparación con un testigo obtenidos en el experimento de diseño factorial para ensayar combinaciones de zinc (Zn) 0,5 μM , cobre (Cu) 0,02 μM , selenio (Se) 0,050 μM , manganeso (Mn) 0,001 μM y citrato férrico (4,8 μM);

la Fig. 4 muestra los resultados de un experimento de diseño factorial para determinar el resultado de una mezcla de elementos residuales metálicos (Zn 0,5 μM , Cu 0,02 μM y citrato férrico 4,8 μM) y los aminoácidos glutamina (Gln 4,8 mM), serina (Ser 0,49 mM) y cistina (Cys 0,29 mM);

la Fig. 5 muestra el efecto de concentraciones diferentes de cobre combinado con zinc y citrato férrico (Zn 0,5 μM , citrato de Fe 4,8 μM) sobre la productividad de rhGH en el DMEM;

la Fig. 6 muestra el efecto de concentraciones diferentes de zinc combinado con cobre y citrato férrico (Cu 0,02 μM , citrato de Fe 4,8 μM) sobre la productividad de rhGH en DMEM; y

la Fig. 7 muestra el sumario del efecto del aumento de productividad de rhGH obtenido cuando se añaden cobre, zinc y citrato férrico (Zn: 1,5 y 0,5 μM , Cu: 0,02 μM y citrato férrico 4,8 μM) como complementos de DMEM para diferentes experimentos con células C127 productoras de rhGH.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está basada en el desarrollo de un medio de cultivo celular que está exento de suero animal.

El medio de cultivo celular exento de suero animal comprende:

Zinc (Zn) en una concentración que varía en el intervalo de 0,2 a 1,75 μM ,

5 Cobre (Cu) en una concentración que varía en el intervalo de 10 a 75 nM, e

iones férricos (Fe) en una concentración de 5 o 6 μM .

10 Como se muestra en los ejemplos posteriores, la adición de Zn y/o Cu en cantidades residuales a un medio estándar dio lugar a un aumento de la productividad de células que expresan una proteína secretada de interés.

15 La adición tanto de Zn como de Cu en las concentraciones anteriormente identificadas condujo a un aumento en la productividad de hormona del crecimiento (GH) humana recombinante en células C127 por encima de 60% respecto al testigo (mismas células cultivadas en DMEM estándar). Cuando las células que expresan GH fueron cultivadas en un medio que comprende iones de Zn, Cu y Fe en las concentraciones anteriormente identificadas, la productividad fue aumentada en aproximadamente 70% en comparación con el testigo.

20 Los intervalos de concentración preferidos de los iones metálicos del medio de la invención son como sigue:
- Zinc a aproximadamente 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,5, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75 μM .

Preferentemente, el zinc está comprendido a aproximadamente 0,5 μM o aproximadamente 1,5 μM . Es preferido también que el zinc esté comprendido como sulfato de zinc.

25 - Cobre a aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ó 75 nM.

Preferentemente, el cobre está comprendido a aproximadamente 25 nM. Es preferido que el cobre esté comprendido como sulfato de cobre.

- Los iones férricos están comprendidos a aproximadamente 5 ó 6 μM .

30 Los iones férricos pueden estar comprendidos preferentemente como citrato férrico y/o nitrato férrico y es adicionalmente preferido que el citrato férrico suponga la mayor parte de los iones férricos comprendidos en el medio de cultivo celular. El medio puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 5 μM de citrato férrico y aproximadamente 1 μM de nitrato férrico.

35 En una realización preferida, el medio comprende adicionalmente los componentes de un medio básico. Es preferido que el medio contenga medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) como medio básico. La concentración de DMEM estándar es expuesta en el ejemplo posterior.

40 El primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína que comprende la etapa de cultivar una célula que expresa hormona del crecimiento en el medio de la invención.

45 La etapa de cultivo del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en cualquier entorno adecuado, como platos de Petri, matraces T o frascos rotativos, pero se puede hacer también en recipientes que tengan volúmenes mayores como, por ejemplo, un biorreactor.

La proteína de la invención puede ser expresada usando cualquier promotor que sea adecuado en el tipo de célula particular usada. En una realización altamente preferida, la proteína es expresada a partir del promotor de metalotio-
neína (MT). Si se usan células de múridos para la producción de la proteína, el promotor es preferentemente el pro-
motor MT-1 de múridos.

50 Preferentemente, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de recoger el medio que comprende la proteína de interés.

55 En una realización preferida, el procedimiento comprende adicionalmente aislar la proteína de interés.

En una realización preferida adicional, el procedimiento comprende adicionalmente formular la proteína aislada con un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica.

60 En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso del medio según la invención para la producción de hormona del crecimiento.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de un medio de la invención para el mantenimiento de células en cultivo durante la fase de producción de hormona del crecimiento.

65 Las células que van a ser usadas en el marco de los diversos aspectos de la presente invención son preferentemente células de mamífero. Pueden ser de origen humano o animal. Ejemplos de células de mamíferos que pueden ser cultivadas en el procedimiento según la presente invención incluyen, por ejemplo, células C127 de múridos, células

3T3, células COS, células de osteosarcoma humano, células MRC-5, células BHK, células VERO, células CHO (ovario de hámster chino), células HEK 293, células rHEK 293, células de fibroblastos humanos normales, células de estroma, células de hepatocitos o células PER.C6. Ejemplos de hibridomas que pueden ser cultivados en el procedimiento según la presente invención incluyen, por ejemplo, células DA4.4, células 123A, células 127A, células GAMMA y células 67-9-B.

Es preferido cultivar células C127 de murino de acuerdo con la presente invención.

Las células cultivadas con la presente invención pueden crecer en suspensión o, para un anclaje de células dependientes, unidas a un soporte sólido. Se usan microportadores y discos Fibracel® en cultivos celulares de mamíferos para el crecimiento de células dependientes de anclaje y están entre las plataformas tecnológicas establecidas para la producción industrial de proteínas (véase, por ejemplo, Bohak *et al.* 1987; Pelti *et al.* 1994).

El procedimiento de la Invención sirve para producir hormona del crecimiento. Por tanto, el medio de la invención es usado para la producción de hormona del crecimiento.

La hormona del crecimiento puede ser de cualquier origen. Las hormonas del crecimiento preferidas son de origen humano.

En el caso de que la hormona del crecimiento se produzca en el procedimiento de la invención formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable, el resultado del procedimiento es una composición farmacéutica.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" está previsto que abarque cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al que va a ser administrado. Por ejemplo, para una administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) ser formulada(s) en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos, solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución Ringer.

La composición farmacéutica formulada según la invención puede ser seguidamente administrada a un individuo en una diversidad de formas. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Puede ser usada cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en la que una molécula de DNA que codifica el ingrediente activo es administrada al paciente (por ejemplo, a través de un vector), lo que provoca que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) según la invención puede(n) ser administrada(s) junto con otros componentes de agentes biológicamente activos como tensioactivos farmacéuticamente aceptables, excipientes, soportes, diluyentes y vehículos.

Para una administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) ser formulada(s) en forma de una solución, suspensión emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación es esterilizada mediante técnicas comúnmente usadas.

De acuerdo con la presente invención, el medio es usado para la producción de hormona del crecimiento.

La GH puede ser nativa, es decir, GH que se produce de forma natural. Preferentemente, la GH que va a ser producida es de origen humano. Como la GH es una proteína secretada soluble, es liberada en la materia sobrenadante del cultivo celular, por medio de su péptido de señal natural o por medio de un péptido de señal heterólogo, es decir, un péptido de señal derivado de otra proteína secretada que puede ser más eficaz en el sistema de expresión particular usado.

La expresión "hormona del crecimiento" es usada en la presente memoria descriptiva de forma sinónima con "GH". Este término incluye GH natural o nativa, GH producida de forma recombinante así como las variantes de GH explicadas en detalle en la sección de "antecedentes de la invención". El término "GH", como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye muteínas, derivados funcionales, fracciones activas, proteínas fusionadas, proteínas circularmente permutadas y sales de GH. La GH es preferentemente humana, pero puede ser derivada también de otras especies, en particular mamíferos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "muteínas" se refiere a análogos de una GH, en la que uno o más de los residuos de aminoácidos de una GH natural están sustituidos con residuos de aminoácidos diferentes, o son suprimidos, o uno o más residuos de aminoácidos son añadidos a la secuencia natural de una GH, sin disminuir considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la GH de tipo salvaje. Estas muteínas son preparadas mediante técnicas de síntesis y/o mutagénesis dirigida al sitio conocidas, o cualquier otra técnica conocida adecuada para las mismas.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico como DNA o RNA, que se hibrida a DNA o RNA, que codifica una GH bajo condiciones restrictivas. Los DNA que codifican GH son conocidos en la técnica anterior. La expresión "condiciones restringidas" se refiere a las condiciones de hibridación y posterior lavado, que los expertos en la técnica denominan convencionalmente "restringidas". Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., nº 6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, ejemplos de condiciones restringidas incluyen condiciones de lavado a 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido sometido a estudio, por ejemplo, en 2 x SSC y 0,5% de SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y seguidamente 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica comprenden que las condiciones restrictivas pueden depender también de la longitud de las secuencias de DNA, sondas de oligonucleótidos (como 10-40 base) o sondas de oligonucleótidos mixtos. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametil-amonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o las dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.

Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, puede ser determinada una "% de identidad". En general, las dos secuencias que van a ser comparadas están alineadas para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "espacios" en una o en las dos secuencias, para mejorar el grado de alineación. Puede ser determinado un % de identidad a lo largo de la longitud completa de cada una de las secuencias que están siendo comparadas (denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de longitud igual o muy similar, o sobre longitudes más cortas definidas (denominada alineación local), es decir, más adecuada para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden ser usados programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J et al., 1984) por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. El programa BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (1981) y encuentra la mejor zona única de analogía entre dos secuencias. Otros programas para determinar identidad y/o analogía entre secuencias son conocidos también en la técnica, por ejemplo, la familia BLAST de programas (Altschul S F et al, 1990, Altschul S F et al, 1997, accesible a través de la página de internet del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R. 1990).

Cualquiera de estas muteínas tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente reproducible de la de una GH, con el fin de que tenga una actividad sustancialmente similar a GH. Una actividad de GH es su capacidad de unirse al receptor de GH. En la medida en que la muteína tiene una actividad de unión sustancial al receptor de GH (GHR), se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a GH. Por tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que GH por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter esta muteína, por ejemplo, a un ensayo de competición en emparejado simple para determinar si se une o no a una GHR apropiadamente marcada o células de expresión de GHR, como un radioinmunoensayo o ensayo ELISA.

En una realización preferida cualquiera de estas muteína tiene una identidad u homología de al menos 40% con la secuencia de aminoácidos o DNA de una GH. Estas secuencias son conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir de NeNOto et al., 1981 o Martial et al., 1979.

Más preferentemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferentemente al menos 90% o 95% de identidad u homología respecto al mismo.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que son conocidos como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras para polipéptidos de GH pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tenga propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de forma que la sustitución entre los miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham. 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos se pueden hacer también en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones incluyen solamente unos pocos aminoácidos, por ejemplo, por debajo treinta y, preferentemente, por debajo de diez y no suprimen ni desplazan aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas mediante estas deleciones y/o inserciones entran dentro de las previsiones de la presente invención.

La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende GH, o una muteína o fragmento del mismo, fusionado con otra proteína que tiene, por ejemplo, un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. La GH, por tanto, puede estar fusionada a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma. Las partes de Fc de de la IgG son adecuadas para la preparación de proteínas de fu-

si3n de inmunoglobulinas. Las prote3nas de fusi3n de Ig son descritas, por ejemplo en el documento EP 314.317 A1 (Genentech) o EP 0.325.224 A2 (Zymogenetics Inc.).

Como “fracciones activas” para una GH, o mute3nas y prote3nas fusionadas, la presente invenci3n abarca cualquier fragmento o precursores de la cadena de polip3ptidos o de la mol3cula de prote3na sola o conjuntamente con mol3culas o residuos asociadas conectados a la misma, por ejemplo, residuos de az3cares o fosfatos o agregados de la mol3cula de prote3na o los residuos de az3cares por s3 mismos, con la condici3n de que dicha fracci3n tenga una actividad sustancialmente similar a la GH.

En el caso de que la GH de la invenci3n vaya a ser usada como una composici3n farmac3utica, esta composici3n farmac3utica puede ser usada para el tratamiento y/o prevenci3n de un cierto n3mero de enfermedades o trastornos. Estas enfermedades o trastornos est3n preferentemente relacionadas con una producci3n insuficiente de GH end3gena. La GH purificada puede ser usada, por ejemplo, para el tratamiento y/o prevenci3n de deficiencia de GH, agotamiento por SIDA, lipodistrofia (tambi3n denominada s3ndrome de dismorfia/dismetab3lico asociado a HARS-HIV) o s3ndrome de intestino corto, en particular pedi3trico. Otras enfermedades en las que puede estar indicada la administraci3n de hormona del crecimiento incluyen cirrosis hep3tica, deficiencia de crecimiento en adultos, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, osteoartritis, caquexia card3aca, fallo card3aco congestivo, insuficiencia renal cr3nica, reconstituci3n o movilizaci3n de c3lulas sangu3neas, infertilidad masculina, movilizaci3n de c3lulas madre hematopoy3tica, esclerosis m3ltiple, apoplej3a, atrofia de sistemas m3ltiples o c3ncer.

EJEMPLO: Desarrollo de un nuevo medio de producci3n exento de suero para c3lulas C127 que expresan hGH

1. Introducci3n

Este estudio describe el trabajo experimental que se refiere al desarrollo de un medio de cultivo de producci3n (DMEM, “medio de Eagle modificado de Dulbecco”) mediante la adici3n de elementos met3licos residuales. Como consecuencia de este desarrollo se obtuvo un aumento considerable de la productividad de rhGH en los cultivos de c3lulas C127.

La siguiente Tabla 1 resume la composici3n de DMEM y el desarrollo que se presentar3 en el marco de este ejemplo.

Tabla 1: Formulaci3n de medio de crecimiento, DMEM y medio de producci3n.

COMPONENTES	Medio de crecimiento mg/L	DMEM, mg/l	Medio de producci3n, mg/l
AMINOACIDOS			
L-ALANINA	49,45		
L-ARGININA HCL	227,5	84,0	84,0
L-ASPARAGINA H ₂ O	27,50		
L-ASPARTATO	21,65		
L-CISTEINA HCl H ₂ O	17,56		
L-CYSTINA 2HCl	31,29	62,0	62,0
L-GLUTAMATO	40,35		
L-GLUTAMINA	693,5	584,0	584,0
GLICINA	43,75	30,0	30,0
L-HISTIDINA HCl, H ₂ O	41,48	42,0	42,0
L-HIDROXIPROLINA	6,50		
L-ISOLEUCINA	114,5	105,0	105,0
L-LEUCINA	119,1	105,0	105,0
L-LISINA HCl	151,3	146,0	146,0
L-METIONINA	52,24	30,0	30,0
L-FENILALANINA	70,48	66,0	66,0
L-PROLINA	37,25		
L-SERINA	39,25	42,0	42,0
L-TREONINA	93,45	95,0	95,0
L-TRIPT3FANO	15,02	16,0	16,0
L-TIROSINA 2Na 2H ₂ O	75,79	104,0	104,0
L-VALINA	92,85	93,0	93,0
SALES			
CLORURO DE CALCIO	121,0	200	200
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,050	0,1	0,1
SULFATO FERROSO 7H ₂ O	1,251		

KCl	334,2	400	400
CLORURO DE MAGNESIO	40,94		
MgSO ₄ ANHIDRO	48,84	97	97
Na ₂ HPO ₄	71,02		
SELENITO DE SODIO 5H ₂ O	0,030		
NaCl	7500	6400	6400
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	62,5	125	125
NaHCO ₃	1200	3700	3700
CLORURO DE LITIO	1,00		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,432		0,144
HIDRATOS DE CARBONO			
D-GLUCOSA	3650	4500	4500
VITAMINAS			
ACIDO ASCÓRBICO	0,500		
BIOTINA	0,1035		
CLORURO DE COLINA	11,48	4,00	4,00
VITAMINA B12	1,68		
D-PANTOTENATO DE Ca	2,34	4,00	4,00
ÁCIDO FÓLICO	3,65	4,00	4,00
I-INOSITOL	17,1	7,00	7,00
NIACINAMIDA	2,27	4,00	4,00
ÁCIDO PARA-AMINO-BENZOICO	1,00		
PIRIDOXAL HCl	0,25	4,00	4,00
PIRIDOXINA HCl	4,531		
RIBOFLAVINA	0,419	0,40	0,40
TIAMINA HCl	2,92	4,00	4,00
LÍPIDOS			
ÁCIDO LINOLEICO	0,042		
ÁCIDO LIPOICO	0,205		
LINOLEATO DE METILO	0,1		
PRODUCTOS DIVERSOS			
CITRATO FÉRRICO	122,5		1,22
HEPES	3600		
HIPOXANTINA	2,900		
DIHIDRATO DE d-GLUCONADO DE HIERRO (II)	4,820		
L-GLUTATIÓN	0,500		
MERCAPTOETANOL	0,234		
PIRUVATO DE SODIO	57,00	110,0	110,0
PUTRESCINA 2HCl	0,241		
TIMIDINA	0,505		
DETERGENTES			
ETANOLAMINA (como base)	6,25		
ELEMENTOS RESIDUALES			
CLORURO DE PLATA	0,0000044		
CLORURO DE BARIO 2H ₂ O	0,002		
CLORURO DE COBALTO 6H ₂ O	0,002		
SULFATO CRÓMICO-POTÁSICO	0,001		
BROMURO DE POTASIO	0,0001		
YODURO DE POTASIO	0,0001		
ÁCIDO MOLÍBDICO (MOLIBDATO DE AMONIO 4H ₂ O)	0,0001		
FLUORURO DE SODIO	0,004		
METAVANADATO DE AMONIO	0,0006		
NITRATO DE NIQUEL 6H ₂ O	0,0002		
CLORURO DE RUBIDIO	0,00001		
CLORURO ESTANNOSO 2H ₂ O	0,0001		
SULFATO DE COBRE 5H ₂ O	0,0064		0,0064
CLORURO DE MANGANESO 4H ₂ O	0,0001		
ÓXIDO DE TITANIO	0,001		
COMPLEMENTOS			
INSULINA RECOMBINANTE HUMANA	10 mg/l		

AJUSTES FÍSICOS			
PH	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
OSMOLARIDAD (mosm/kg)	325 ± 25	330 ± 30	330 ± 30

2. Materiales y métodos

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de la empresa *Merck®*: sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cromo-potasio ($[\text{Cr}(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), selenito de sodio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se usó citrato férrico como fuente de hierro ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ número de catalogo de Sigma® F3388).

La mezcla de elementos residuales del medio de crecimiento (100.000 X) fue proporcionada por la empresa JRH® Biosciences.

Todas las soluciones de elementos residuales que iban a ser ensayadas se prepararon en forma de soluciones concentradas en agua destilada y esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 µm.

La adición de los diferentes complementos ensayados (soluciones metálicas, etc.) en diferentes experimentos se llevó a cabo directamente sobre el medio de cultivo de nueva aportación

CULTIVOS CELULARES

Se usaron células de múridos C127 genéticamente modificadas (ATCC CRL 1616) para la expresión de la hormona del crecimiento humano recombinante (rhGH). El vector está basado en BPV69T que comprende el sitio de clonación múltiple pBR322 y que comprende 1,6 kb del minigen rhGH bajo el control de promotor de metalotioneína-1 (MT-1) de ratón. Se usaron en los experimentos cultivos derivados de un banco de células de trabajo obtenidas de diferentes tandas de producción de rhGH.

Los cultivos celulares se mantuvieron incubados a $36^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ y 0,4 rpm en frascos rotativos de 2125 cm² que contenían 375 ml ± 15 ml de medio de cultivo o en frascos rotatorios de 1700 cm² que contenían 300 ml de medio de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo usado para la fase de producción de rhGH era DMEM con 4,5 g/l de glucosa tamponada con bicarbonato de sodio (3,7 g/l).

TITULACIÓN DE rhGH

La medición de rhGH en el medio de cultivo se llevó a cabo diariamente mediante titulación por HPLC de fase inversa:

Materiales

Synchrom RP4, 100 x 4,6 mm d.i. (diámetro interno), 300 Å, Cat. N° C4R103-10 (Eichrom).

Resource RPC 1 ml, 30 mm x 6,4 mm d.i. 15 µm, art 17-1181-01, Amersham Biosciences.

Symmetry 300, 50 mm x 4,6 d.i., C4 5 µm, P/N 186000287 (Waters).

Reactivos

Ácido trifluoroacético (TFA) (Pierce, Cat. N°28904 o equivalente).

Acetonitrilo (ACN) (Merck 1.00030 o equivalente).

Agua purificada, PW (por ejemplo, agua MilliQ o equivalente).

Helio

Soluciones

Fase móvil A: TFA al 0,08% en H₂O (v/v)

Se mide en un matraz aforado el volumen de agua PW y se añade TFA según la Tabla siguiente. Se agita y se marca.

FASE A VOLUMEN	AGUA MILLIQ, VOLUMEN	TFA, VOLUMEN
1 l	1 l	0,8 ml
0,5 l	0,5 l	0,4 ml
0,25 l	0,25 l	0,2 ml

Fase móvil B: TFA al 0,08% en acetonitrilo (v/v)

SE mide en un matraz volumétrico el volumen de agua PW y se añade TFA según la siguiente Tabla. Se agita y se marca.

FASE B VOLUMEN	ACN VOLUMEN	TFA, VOLUMEN
1 l	1 l	0,8 ml
0,5 l	0,5 l	0,4 ml
0,25 l	0,25 l	0,2 ml

Las condiciones de la cromatografía son:

- Elución mediante gradiente partiendo de una mezcla de fase A/ fase B 60/40, terminando con fase A/fase B 20/80. El gradiente se completa en 5 minutos (ligeramente variable dependiendo de la instrumentación en uso).

- Volumen de inyección 50 μ litros

- Detección: absorbancia UV a 215 nm.

- Curva de calibración: patrón de rhGH a 10, 50, 100, 120 y 150 μ g/ml.

La concentración de rhGH de una muestra se determina mediante comparación con concentraciones estándar de rhGH.

PRODUCTIVIDAD DE GH

La productividad se expresa como mg de rhGH por frasco rotativo. Los datos en bruto son de concentración de rhGH en la recolección (medida mediante HPLC) y número total de frascos rotativos recolectados. Normalmente, un frasco rotativo durante la fase de recolección contiene aproximadamente 10^9 células.

3. Resultados

En una primera serie de experimentos, se ensayó el efecto de una concentración elevada de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 μM) al ser añadido de forma intermitente al medio de cultivo. La adición se llevó a cabo durante los dos cambios de medio en la etapa inicial (aclarado y PM = medio de producción, es decir, punto 0 de la fase de recolección) y en la etapa intermedia (recolecciones 6 y 7) de la fase de producción de una tanda. Los resultados (no mostrados) sugirieron que el promotor es activo y puede ser modulado.

La productividad elevada fue adicionalmente confirmada con otros elementos metálicos. Se llevaron a cabo ensayos con concentraciones 10 μM de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{K}[\text{Cr}(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) continuamente añadidos al medio, respectivamente. Los resultados de este experimento se exponen en las Figs. 1 y 2.

La Fig. 1 muestra la cantidad de hGH secretada por hGH que expresa células C127 cuando son cultivadas en un medio que contiene los elementos ensayados a lo largo del tiempo del experimento (14 días). La Fig. 2 muestra los valores medios de productividad alcanzados para cada elemento ensayado. Los porcentajes medios de aumento de la productividad obtenidos en comparación con el valor testigo, sin elementos residuales, variaron en el intervalo entre 1,1% para el bario y 32,4% para el cobalto. Se apreció también que la productividad de rhGH se elevó de 9% a 32,5% en comparación con los valores testigos cuando se ensayó en inducción continua frente a intermitente con cobalto. Ni el bario ni el cobalto mostraron un aumento de la productividad a las concentraciones ensayadas en DMEM.

Medición de elementos residuales individuales

El DMEM fue complementado con elementos residuales de Zn, Cu, Se y Co a las concentraciones recogidas a continuación en la Tabla 2. Estas concentraciones corresponden a las concentraciones de los elementos metálicos en medio de crecimiento. El aumento en la productividad de rhGH conseguida complementando DMEM con los elementos residuales se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Aumento de porcentaje de productividad de rhGH cuando se ensayan los iones metálicos en DMEM a las concentraciones μM indicadas.

Ion	CONCENTRACIÓN (μM)	% DE AUMENTO DE PRODUCTIVIDAD
Zn	1,50300	12,10%
Cu	0,02560	37,50%
Se	0,11400	-3,10%
Co	0,00840	-3,20%

Debe apreciarse que, en el caso del zinc, la concentración ensayada de 1,5 μM provocó un fenómeno de “desprendimiento”, es decir, una separación de la monocapa celular del sustrato de plástico de los frascos rotativos. En algunos casos este desprendimiento condujo a una pérdida de los cultivos en la últimas etapas de recolección (habitualmente entre las recolecciones 12-14). El fenómeno de desprendimiento puede ser evitado usando recipientes de cultivos celulares adecuados, como los frascos rotativos disponibles en la empresa Corning® bajo la marca registrada Cellbind®.

Medición de interacciones entre metales

Basándose en los efectos del cobre el zinc sobre la productividad de la preparación de hGH, se llevaron a cabo experimentos de diseño factoriales para ensayar el posible efecto combinado de los metales.

Los análisis estadísticos de los resultados se muestran en la Tabla 3. Se observó un fuerte efecto sinérgico de la productividad ($p = 0,0001$) usando Cu y Zn conjuntamente.

Tabla 3: Análisis estadístico del ensayo de diseño factorial de factor 3.

Análisis de la varianza para la productividad

Fuente Valor	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Relación F
A: Cobre 0,0000	406,143	1	406,163	350,74
B: zinc 0,0000	84,6308	1	84,6308	73,09
C: Agua testigo 0,4807	0,626472	1	0,626472	0,54
AB 0,0001	47,7896	1	47,7896	41,27
AC 0,1766	2,49008	1	2,49008	2,15
BC 0,5534	0,438906	1	0,438906	0,38
Error total	10,4215	9	1,15795	

--
Total (corr.) 552,541 15
R-cuadrado =98,1139 por ciento
R-cuadrado (ajustado para d.f.) = 96,8565 por ciento

Se observó un desprendimiento en todos los cultivos tratados con zinc a una concentración de 1,5 μM , independientemente de si estaba presente cobre o no.

Se llevaron a cabo experimentos de diseño factorial posteriores con el fin de estudiar el efecto de la adición tanto de zinc como de cobre cuando la concentración de zinc se disminuyó (Zn, 0,5 μM) y añadiendo otros elementos residuales al medio de crecimiento, como manganeso, selenio o citrato férrico, que podrían mejorar la productividad y la adición de los cultivos al sustrato.

Se alcanzó un crecimiento continuo a partir de un punto de partida de productividad común, aproximadamente 20 mg de rhGH por frasco, con valores finales próximos a 70 mg de rhGH/RB en comparación con 30 mg de rhGH de cultivo testigo con DMEM estándar (no mostrado). Los valores medios para el aumento de la productividad de GH (es decir, la productividad medida en mg/RB en el día 14) en comparación con el testigo se muestran en la Fig. 3.

En esta serie de experimentos, se disminuyó el fenómeno de desprendimiento.

Adición de aminoácidos

Se llevó a cabo un análisis de aminoácidos con el fin de determinar si el aumento de la productividad de hGH estaba limitado por la disponibilidad de cualquier aminoácido. La Tabla 4 muestra el porcentaje de aminoácidos en recolecciones después de dos días en cultivo, en un medio y con o sin adición de zinc y cobre.

Tabla 4: Porcentaje de la concentración de aminoácidos en el medio en bruto, recolectado después de dos días en cultivo, originario de cultivos mantenidos con cultivo DMEM estándar o DMEM complementado con Zn 0,7 μM , Cu 0,2 μM y citrato férrico 4,8 μM .

AMINOÁCIDO	DMEM ESTÁNDAR	DMEM COMPLEMENTADO
L-glutamina	31%	13%
L-Serina	28%	11%
L-cistina	20%	13%
L-aminoácidos restantes	50%-100%	39%-86%

Se ensayó una mezcla de cobre, zinc y citrato férrico ($\text{Zn } 0,5 \mu\text{M}$, $\text{Cu } 0,02 \mu\text{M}$ y citrato férrico $4,8 \mu\text{M}$) con combinaciones de los aminoácidos consumidos en la proporción más elevada: L-glutamina (Gln $4,8 \text{ mM}$), L-serina (Ser $0,49 \text{ mM}$) y L-cistina (Cys- $0,29 \text{ mM}$). Los resultados se muestran en la Fig. 4.

No se observó ningún efecto positivo sobre la productividad para ninguno de los aminoácidos ensayados, ni separadamente ni combinados.

Cuando los metales se añadieron conjuntamente con los aminoácidos, se observaron solamente efectos menores sobre la productividad: un ligero efecto positivo de glutamina (de $78,2\%$ a $81,1\%$) y un efecto negativo de cistina (de $78,2\%$ a $69,9\%$). Estas diferencias no se consideraron significativas.

La productividad difiere claramente entre cultivos tratados con una mezcla de metales en DMEM (valor medio de aproximadamente 50 mg de rhGH/RB por recolección) respecto a los que no comprendían los metales aproximadamente 30 mg de rhGH/RB por recolección). Considerando estos resultados, no se consideró necesario modificar la composición original de aminoácidos del medio de producción.

Titulación del efecto del cobre y zinc

Con el fin de medir la concentración óptima de cobre, se realizó un experimento, manteniendo constante la concentración de citrato férrico ($4,8 \mu\text{M}$) y la concentración de zinc ($0,5 \mu\text{M}$) y variando las concentraciones de cobre (Fig. 5).

Como se muestra en la Fig. 5, el experimento de respuesta a la dosis confirmó que la concentración de complemento óptima para el cobre en DMEM es $25,6 \text{ nM}$ al ser ensayada a las concentraciones indicadas de zinc y citrato férrico.

En otro experimento, se mantuvieron constantes la concentración de citrato férrico ($4,8 \mu\text{M}$) y la concentración de cobre ($0,025 \mu\text{M}$) y se varió la concentración de zinc (Fig. 6): se observó un nivel máximo de productividad (plataforma) con concentraciones de zinc por encima de aproximadamente 200 nM , estabilizando la productividad a aproximadamente un 60% por encima del valor testigo medio.

SUMARIO de resultados

La Fig. 7 resume los resultados obtenidos con iones de Zn y Cu en concentraciones residuales, conjuntamente o sin iones férricos.

Se obtuvieron los siguientes valores sobre la base de datos obtenidos para el aumento en la productividad añadiendo elementos residuales metálicos a medio DMEM:

Zinc $1,5 \mu\text{M}$: $10,3\% \pm 5,0\%$, Zinc $0,5 \mu\text{M}$: $16,8\% \pm 1,6\%$
 Cobre $0,02 \mu\text{M}$: $32,1\% \pm 9,4\%$
 Zinc $1,5 \mu\text{M}$ + Cobre $0,02 \mu\text{M}$: $66,3\% \pm 16\%$
 Zinc $0,5 \mu\text{M}$ + cobre $0,02 \mu\text{M}$: $61,2\% (\pm 10\%)$
 Zinc $0,5 \mu\text{M}$ + cobre $0,02 \mu\text{M}$ + citrato férrico $4,8 \mu\text{M}$: $69,4\% \pm 19\%$.

Considerando estos datos, la siguiente mezcla es óptima como un aditivo para el medio DMEM:

- Cobre como sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 25 nM .
- Zinc como sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), entre 50 nM y 1500 nM , con concentraciones preferidas que varían en el intervalo de 200 a 500 nM .
- Citrato férrico a una concentración de $4,8 \mu\text{M}$ hasta una concentración final de aproximadamente $6 \mu\text{M}$ del ion, dado que ya está presente nitrato férrico en el DMEM.

Conclusión:

El uso de iones de cobre, zinc y férricos en cantidades residuales como complementos para el medio DMEM aumentó la productividad de rhGH en más de 50% en comparación con DMEM estándar.

REFERENCIAS

1. Allschul S F et al., J Mol Biol, 216, 403-410, 1990.
2. Arnold et al., US 2003/0153042
3. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§ 6.3 and 6,4 (1987, 1992).
4. Altschul S F et al., Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997,
5. Becker et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 10:326 (1988)
6. Bewly et al., Int. J. Peptide and Protein Res. 4:281-287 (1972)
7. Blum et al. US 6,399,331
8. Bohak et al. 1987 Bohak Z1 Kadouri A et a (1987) "Novel anchorage matrices for suspension culture of mammalian cells" Biopolymers. 26 Suppt: S205-213.
9. Carter MJ, Facklam TJ, Long PC, Scotland RA, Dev, Biol, Stand, 1989; 70:101-7.
10. Chen et al., Genomics 4:479-497 (1989)
11. Ciccarone et al. US 2003/0096414
12. Cleveland et al., US 4,767,704
13. Darfler US 5,045,568
14. DeNoto et al., Nucleic Acids Res. 9:3719 (1981)
15. Devereux J et al., Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984.
16. Gertler et al., Endocrinology 118:720 (1986)
17. Goeddel et al. Nature, 281 :544 (1979)
18. Graff et al., J. Biol. Chem. 257:2365 (1982)
19. Grantham et al., Science, Vol. 185, pp, 862-864 (1974).
20. Hsiung et al, Biotechnology 7:267 (1989)
21. Inlow et al. US 6,048,728
22. Jorgensson et al., Pharmacol. Toxicol. 63:129 (1988)
23. Lewis et al., Endocrinology 101:1587 (1977)
24. Lewis et al., J. Biol. Chem. 253:2679 (1978)
25. Lewis et al., Endocrinology 104:1256 (1979)
26. Lewis et al., Biochem. Biophys. Res. Comm, 92:511
27. Lewis et al., J. Biol. Chem. 256:11645 (1981)
28. Lindner MC 1991, Biochemistry of copper. New York, Plenum Press (textbook)
29. Martial et al., Science 205:602-607 (1979)
30. Moore et al., Endocrinology 122:2920 (1988)
31. Novick, D, Kim, S-H1 Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C. and Rubinstein, M (1999). Immunity 10, 127-136.
32. Oka MS, Rupp RG. Bioprocess Technol. 1990;10:71-92
33. Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98.
34. Petti SA, Lages AC et al. (1994) "Three-dimensional mammalian cell growth on nonwoven polyester fabric disks" Biotechnol Prog. 10(5):548-550.
35. Puck et al., J. Exp. Med. 108, 945, 1958
36. Renner et al., US 5,611 ,299
37. Singh et al., Endocrinology 94:883 (1974)
38. Thorlacius-Ussing, Nauroendocrinology 43:233 (1987)
39. Vallee BL and Falchuk KH 1993. The biochemical basis of zinc physiology. Physiological reviews 73, 79-118.
40. EP 274445
41. EP 314317 A1
42. EP 0325224-A2
43. WO 01/16294

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la producción de hormona del crecimiento, que comprende la etapa de cultivar células de una línea celular que expresa hormona del crecimiento en un medio de cultivo celular exento de componentes derivados de suero animal, comprendiendo el medio zinc en una concentración que varía en el intervalo de 0,2 μ M a 1,75 μ M y cobre en una concentración que varía en el intervalo de 10 nM a 75 nM e iones férricos en una concentración de 5 ó 6 μ M.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que medio comprende zinc a 0,2 μ M.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende zinc a 0,5 μ M.
- 15 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende zinc en forma de sulfato de zinc.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende cobre a 25 nM.
- 20 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende cobre en forma de sulfato de cobre.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende iones férricos en forma de citrato férrico y/o nitrato férrico.
- 25 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio comprende adicionalmente los componentes de un medio básico.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el medio básico es medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM).
- 30 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hormona del crecimiento es expresada bajo el control de un promotor de metalotioneína (MT).
- 35 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el promotor de metalotioneína es el promotor MT-1 de ratón.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente la etapa de recoger la hormona del crecimiento a partir del cultivo celular.
- 40 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente purificar la hormona del crecimiento.
- 45 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente formular la hormona del crecimiento purificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica.
15. El procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hormona del crecimiento es hormona del crecimiento humana.
- 50 16. Uso de un medio como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la producción de hormona del crecimiento.
17. Uso de un medio como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el mantenimiento de células en cultivo durante la fase de producción de hormona del crecimiento.
- 55 18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, en el que la hormona del crecimiento es hormona del crecimiento humana.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que las células son células C127 de ratón.

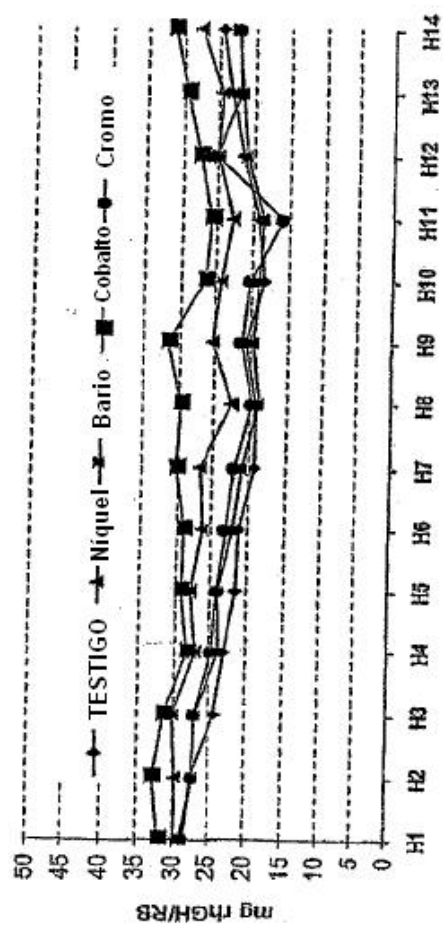


Fig. 1

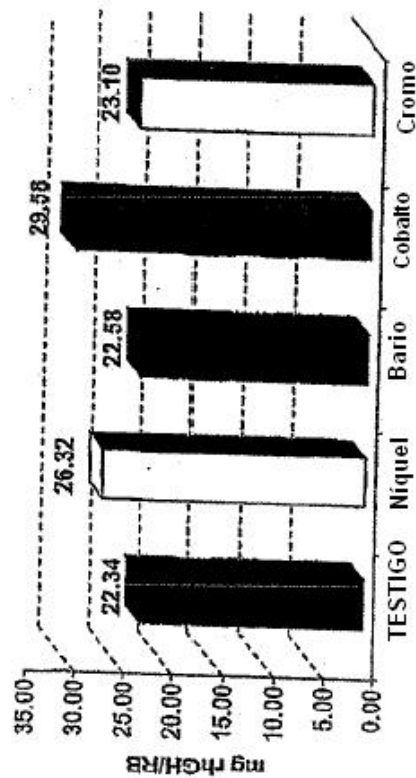


Fig. 2

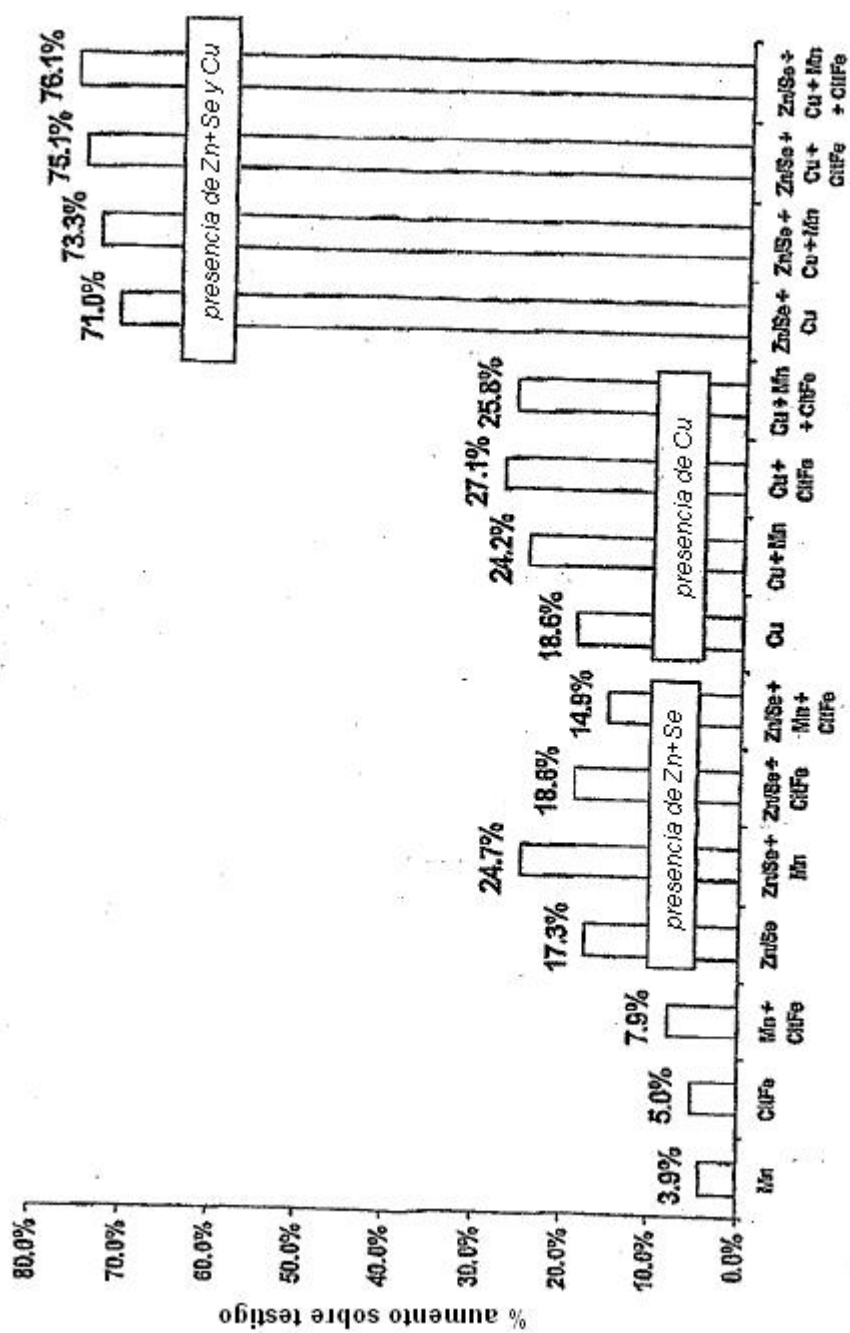


Fig. 3

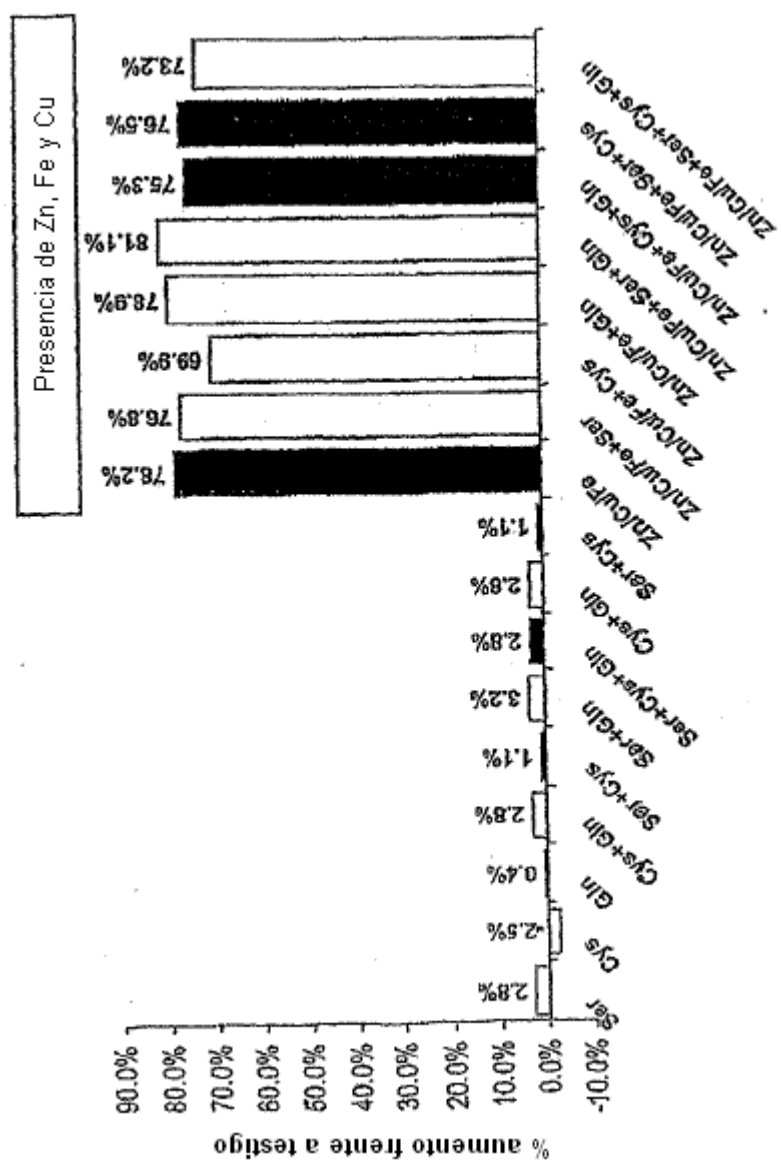


Fig. 4

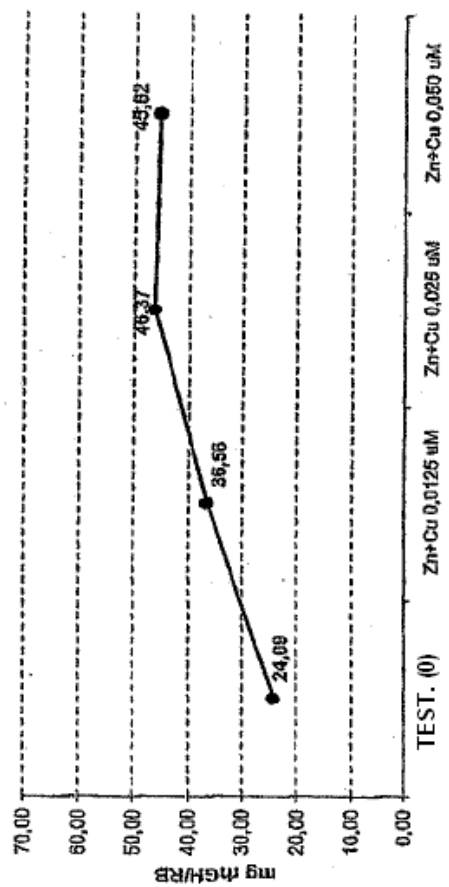


Fig. 5

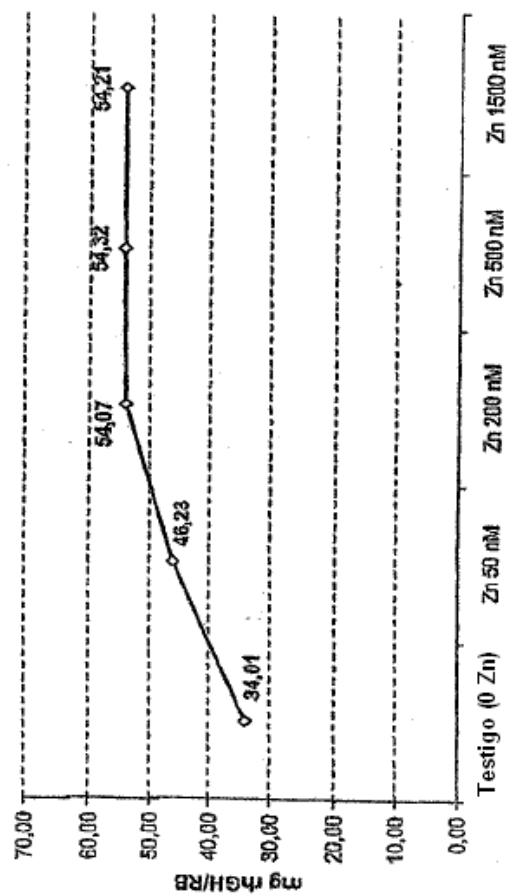


Fig. 6

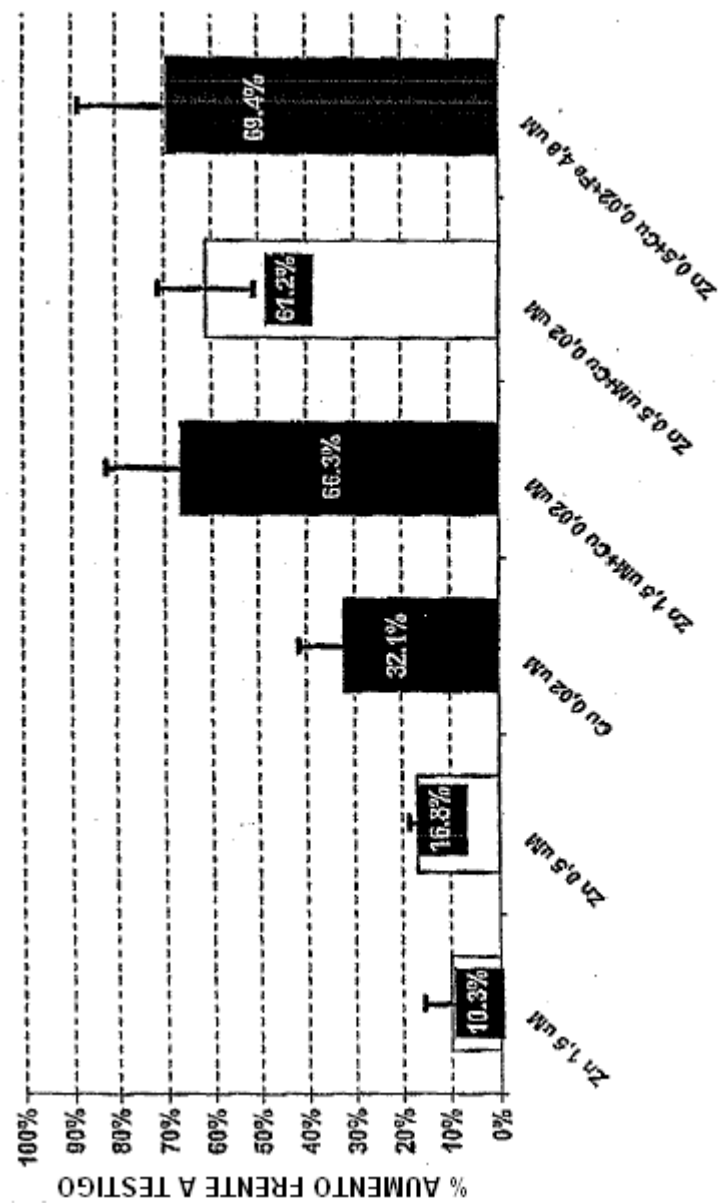


Fig. 7