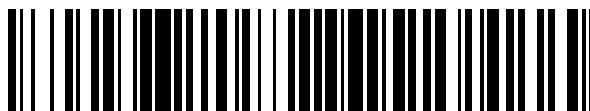


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 230**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2005** **E 05819639 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 1835022**

54 Título: **Método de cultivo celular y utilización del mismo**

30 Prioridad:

05.01.2005 JP 2005000747

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.05.2015

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU
TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**GOTO, SUSUMU;
KISHISHITA, SHOHEI;
TAKUMA, SHINYA y
HIRASHIMA, CHIKASHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 535 230 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

Método de cultivo celular y utilización del mismo

Campo técnico

- 5 La invención se refiere a un método de cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM y a un método para permitir que una célula animal distinta de una célula productora de IgM produzca una proteína utilizando el método anterior.

Técnica anterior

- 10 Al cultivar una célula animal para obtener una proteína natural producida por la célula animal, o al cultivar una célula animal incorporando un gen que codifica para una proteína deseada para producir la proteína deseada, etc., se añaden nutrientes esenciales, tales como bases, azúcares, aminoácidos y vitaminas a un medio de cultivo. Además, se añade habitualmente un extracto derivado de mamífero, concretamente suero, tal como suero bovino fetal, en un intervalo del 5 al 20% para la proliferación de la célula animal. Sin embargo, tal suero derivado de mamífero tiene varias desventajas. Representa del 75 al 95% del coste para el medio de cultivo, y debido a las muchas diferencias
- 15 entre lotes existentes en cuanto a calidad, no se logra proliferación estable. Además, el suero derivado de mamífero no puede esterilizarse en un autoclave o similar, y por tanto puede contaminarse con virus o micoplasmas. Aunque la mayoría de estos virus o micoplasmas no son patógenos, pueden volverse factores desconocidos adicionales desde el punto de vista de la fabricación estable. Además, el suero contiene más de 500 tipos de proteínas, complicando por tanto el aislamiento y la purificación de la proteína deseada, el producto celular, del medio de
- 20 cultivo. Para resolver tales problemas con la fabricación estable, se llevan a cabo métodos que usan una proteína purificada derivada de suero tal como fetuína, insulina o transferrina, en lugar de suero. También se someten a ensayo, desde un punto de vista del coste de producción, métodos que usan componentes de medio de cultivo extraídos de mamíferos.

- 25 Sin embargo, recientemente se ha expresado una inquietud sobre la relación entre los componentes derivados de mamífero y enfermedades tales como la enfermedad de las vacas locas, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) y la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD). Se demanda desde el punto de vista de la seguridad, el desarrollo de un medio de cultivo para cultivar células animales libres de estos componentes derivados de mamífero.

- 30 Al cultivar una célula animal, el no añadir los componentes derivados de mamífero descritos anteriormente en el medio de cultivo provoca una disminución notable en la tasa de supervivencia de las células, y una disminución en el recuento de células viables en el caldo de cultivo en una fase temprana del cultivo. Estos acontecimientos hacen que el cultivo a largo plazo o el cultivo a gran escala sea imposible.

- 35 Para resolver el problema descrito anteriormente, se ha notificado un método en el que se añade un producto de degradación enzimática de carne de pescado o de extracto de carne de pescado al medio de cultivo (documentos de patente 1 y 2). Con este método, se ha hecho posible la alta producción de proteínas sin suero bovino fetal que se creía en general esencial. Además, el documento 3 describe un cultivo discontinuo alimentado de células CHO para la producción de IFN- γ recombinante. El método comprende el cultivo en un medio de cultivo inicial que comprende la peptona de carne de vaca Primatone RL y la adición de un medio de alimentación que también comprende Primatone RL.

- 40 Sin embargo, se desea una mejora adicional porque desde el punto de vista del coste de producción, son preferibles niveles todavía superiores de producción de proteínas.

Documento de patente 1: Publicación internacional WO 99/63058

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa no examinada n.º 2003-334068.

Documento 3: Gu *et al.*, Biotechnology and Bioengineering 5b (1997); 353-360.

45 Descripción de la invención

Problema que va a solucionar la invención

Es un objeto de la presente invención permitir una alta producción celular de proteínas realizando un cultivo discontinuo alimentado usando un medio que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado.

Medios para resolver el problema

- 50 Como resultado de investigaciones exhaustivas e intensivas para solucionar el problema descrito anteriormente, se ha encontrado que es posible permitir que una célula animal distinta de una célula productora de IgM produzca una proteína de interés con un rendimiento todavía superior realizando un cultivo discontinuo alimentado usando un

medio que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo. Así se ha logrado la presente invención.

El contenido de la presente invención es tal como se describe a continuación.

- 5 (1) Un método de cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM que comprende comenzar el cultivo en un medio inicial que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo y alimentar el medio al menos una vez con un medio de alimentación que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado durante el cultivo.
- (2) El método según (1), en el que la célula se cultiva mediante cultivo discontinuo alimentado.
- 10 (3) El método según (1) ó (2), en el que la célula es una célula en la que se ha transferido un gen que codifica para una proteína de interés.
- (4) El método según (3), en el que la proteína de interés es un anticuerpo.
- (5) El método según uno cualquiera de (2) a (4), en el que la célula es una célula de mamífero.
- (6) El método según (5), en el que la célula de mamífero es una célula CHO.
- 15 (7) Un método de producción de una proteína cultivando una célula animal distinta de una célula productora de IgM que comprende comenzar el cultivo en un medio inicial que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo y alimentar el medio al menos una vez con un medio de alimentación que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado durante el cultivo.
- (8) El método según (7), en el que la célula se cultiva mediante cultivo discontinuo alimentado.
- 20 (9) El método según (7) u (8), en el que la célula es una célula en la que se ha transferido un gen que codifica para una proteína de interés.
- (10) El método según (9), en el que la proteína de interés es un anticuerpo.
- (11) El método según uno cualquiera de (7) ó (10), en el que la célula es una célula de mamífero.
- (12) El método según (11), en el que la célula de mamífero es una célula CHO.
- 25 (13) El método según (2) u (8), en el que la concentración del producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido en el medio inicial es de 3 a 20 g/l y en el medio de alimentación de 5 a 150 g/l.
- (14) El método de (4) ó (10), en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

Efecto de la invención

30 En la presente invención, es posible permitir que una célula animal distinta de una célula productora de IgM produzca una proteína de interés con un rendimiento todavía superior añadiendo un producto de degradación enzimática de carne de pescado no sólo al medio al comienzo del cultivo sino también al medio durante el cultivo.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 es un gráfico que muestra las concentraciones (g/l) de un anticuerpo producido en medios de cultivo por células CHO que se cultivaron en un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 5 g/l de hidrolizado de bonito (medio inicial) y un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 30 g/l de hidrolizado de bonito (medio de alimentación).

La figura 2 es un gráfico que muestra las concentraciones (g/l) de un anticuerpo producido en medios de cultivo por células CHO que se cultivaron en un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 15 g/l de hidrolizado de bonito (medio inicial) y un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 75 g/l de hidrolizado de bonito (medio de alimentación).

40 La figura 3 es un gráfico que muestra las concentraciones (g/l) de una proteína producida en medios de cultivo por células CHO que se cultivaron en un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 5 g/l de hidrolizado de bonito (medio inicial) y un medio libre de componentes derivados de mamífero complementado con 30 g/l de hidrolizado de bonito (medio de alimentación).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 A continuación en el presente documento, se describirá la invención en más detalle. En la invención, el cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM se comienza en un medio inicial, al que se alimenta un medio de alimentación al menos una vez durante el cultivo. Al menos uno del medio inicial o el medio de

alimentación contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo.

Además, en una realización preferida de la invención, el cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM se comienza en un medio que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado, y el medio se alimenta al menos una vez con un producto de degradación enzimática de carne de pescado durante cultivo.

Según la invención, es posible cultivar satisfactoriamente una célula animal distinta de una célula productora de IgM en un medio usado generalmente como medio de cultivo convencional para células animales sin añadir componentes derivados de mamífero.

En general, los métodos de cultivo celular se clasifican en cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo discontinuo alimentado. En la presente invención, puede usarse cualquiera de estos métodos. Preferiblemente, se usa el cultivo discontinuo alimentado o el cultivo continuo. Más preferiblemente, se usa el cultivo discontinuo alimentado.

El cultivo discontinuo es un método de cultivo en el que se añade una pequeña cantidad de cultivo de siembra a un medio y se hace crecer la célula en el mismo sin alimentar medio nuevo ni retirar el caldo de cultivo durante cultivo.

El cultivo continuo es un método de cultivo en el que un medio se alimenta continuamente y se retira continuamente durante el cultivo. El cultivo en perfusión también está incluido en el cultivo continuo.

Puesto que el cultivo discontinuo alimentado es intermedio entre el cultivo discontinuo y el cultivo continuo, también se denomina cultivo semicontinuo. Durante el cultivo, el medio se alimenta de manera continua o intermitente, pero no se realiza la retirada continua de caldo de cultivo tal como se observa en el cultivo continuo. El medio que se alimenta en el cultivo discontinuo alimentado (denominado "medio de alimentación" a continuación en el presente documento) puede no ser el mismo medio que ya se usó en el cultivo correspondiente (denominado "medio inicial" a continuación en el presente documento). Puede alimentarse un medio diferente o puede alimentarse un solo componente específico.

En la invención, el término "medio inicial" significa un medio que se usa habitualmente en la primera fase del cultivo celular. Sin embargo, cuando se alimenta un medio de alimentación en porciones una pluralidad de veces, el medio antes de la alimentación de cada porción del medio de alimentación puede considerarse como medio inicial.

Cuando se emplea el cultivo discontinuo alimentado en el método de la invención, un producto de degradación enzimática de carne de pescado puede estar contenido en cualquiera del medio de alimentación o el medio inicial. Preferiblemente, un producto de degradación enzimática de carne de pescado está contenido tanto en el medio de alimentación como en el medio inicial. Además, se prefiere que la concentración de producto de degradación enzimática de carne de pescado en el medio de alimentación sea superior a la concentración correspondiente en el medio inicial. La concentración del producto de degradación enzimática de carne de pescado en el medio inicial puede ser habitualmente de 1-30 g/l, preferiblemente de 3-20 g/l, más preferiblemente de 5-15 g/l. La concentración de producto de degradación enzimática de carne de pescado en el medio de alimentación puede ser habitualmente de 5-150 g/l, preferiblemente de 10-120 g/l, más preferiblemente de 20-90 g/l, todavía más preferiblemente de 30-75 g/l. La razón en volumen entre el medio inicial y el medio de alimentación no está particularmente limitada. Normalmente, cuando se toma el volumen del medio inicial como 1, la razón del medio de alimentación es de 0,01-10, preferiblemente de 0,1-1, más preferiblemente de 0,2-0,3. El medio de alimentación puede alimentarse continuamente o de vez en cuando. Cuando se alimenta de vez en cuando, el número de veces de la alimentación no está particularmente limitado. El medio de alimentación puede alimentarse una vez o una pluralidad de veces.

Con respecto al producto de degradación enzimática de carne de pescado usado en la invención, los ejemplos de carne de pescado incluyen la carne de pescado de pescados de carne roja, tales como bonito, melva, atún, caballa, parpada del Pacífico, sardina, jurel y salmón; y la carne de pescado de pescados de carne blanca, tales como bacalao, lubina japonesa, pleuronéctidos, peludas y besugo. Los ejemplos preferidos son bonito, melva, bacalao, caballa, salmón y sardina.

El producto de degradación enzimática de carne de pescado puede obtenerse, por ejemplo, añadiendo una cantidad adecuada de agua a carne de pescado cocida tal cual, o a carne de pescado picada para dar una pasta o al extracto de la carne de pescado anterior, seguido, si es necesario, por calentamiento para la desnaturalización de proteínas, tratando después el material con una proteasa, y centrifugando o filtrando el material tratado según se desee, para eliminar aceites y componentes insolubles. El extracto de carne de pescado o el producto de degradación enzimática de carne de pescado resultante se ajusta idealmente a pH de 7 a 7,4 antes de usarse.

La proteasa usada en la invención es, por ejemplo, una proteinasa y/o una peptidasa. Tal como se usa en el presente documento, el término "proteinasa" se refiere a una enzima que hidroliza una proteína como sustrato, mientras el término "peptidasa" se refiere a una hidrolasa de enlaces peptídicos para un péptido como sustrato. Es decir, la actividad de la proteasa contra el sustrato proteico puede considerarse actividad proteinasa, mientras que la actividad de la proteasa contra el sustrato peptídico puede considerarse actividad peptidasa. Cuando se cataliza la escisión de una cadena de enlaces peptídicos, en su sitio intermedio, mediante la actividad de la proteasa contra el sustrato proteico, se usa el término "proteinasa". Por consiguiente, en el presente documento se usa endopeptidasa

como una de las proteinasas.

Los ejemplos específicos de las enzimas que van a usarse en la invención incluyen enzimas de origen vegetal, tales como papaína, quimopapaína, bromelina y ficina, y enzimas de microorganismos, tales como mohos, bacterias y levaduras. Incluyen endopeptidasa, exopeptidasa, aminopeptidasa, carboxipeptidasa y dipeptidasa. Estas enzimas pueden usarse solas o en combinación. Cuando se combinan, pueden añadirse al mismo tiempo o progresivamente.

El producto de degradación enzimática de carne de pescado en la invención es preferiblemente un producto de degradación enzimática de carne de pescado obtenido mediante tratamiento con la proteinasa, seguido por tratamiento con la peptidasa.

Las condiciones para el tratamiento con enzimas difieren dependiendo del tipo de enzima usada. Habitualmente, el tratamiento enzimático se realiza a pH de 2 a 12, preferiblemente a pH de 4 a 8, a de 30 a 90°C, preferiblemente de 40 a 65°C, durante de 30 minutos a 72 horas, preferiblemente de 3 a 24 horas. La enzima se usa a aproximadamente del 0,001 al 10% p/p, preferiblemente del 0,1 al 1% p/p, más preferiblemente del 0,2-0,6% p/p, en relación con la proteína como sustrato. La enzima en el producto de degradación enzimática de carne de pescado resultante se inactiva mediante calentamiento o similar, y realizando centrifugación o filtración según se desee, para eliminar aceites y componentes insolubles, mediante lo cual puede prepararse el producto de degradación enzimática.

La carne de pescado comprende vísceras y carne propiamente dicha de pescado. La razón de vísceras con respecto a carne propiamente dicha no está particularmente limitada y puede usarse cualquier razón. Por ejemplo, puede usarse la razón dada a conocer en la publicación de patente japonesa no examinada n.º 2003-334068.

Con respecto a otros componentes del medio de cultivo usados en la invención, pueden usarse de manera apropiada diversos componentes usados normalmente en medios de cultivo celular (preferiblemente de células animales). Incluyen aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía, reguladores osmóticos, fuentes de hierro y reguladores de pH. Además de estos componentes, pueden incluirse oligoelementos metálicos, tensioactivos, cofactores de crecimiento, nucleósidos y similares.

Los ejemplos específicos de tales componentes incluyen aminoácidos, tales como L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, preferiblemente, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; vitaminas, tales como i-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B. sub. 12 y ácido ascórbico, preferiblemente, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxal, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B. sub. 12 y ácido ascórbico; factores lipídicos, tales como clorhidrato de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico y colesterol, preferiblemente, clorhidrato de colina; fuentes de energía, tales como glucosa, galactosa, manosa y fructosa, preferiblemente, glucosa; reguladores osmóticos, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y nitrato de potasio, preferiblemente, cloruro de sodio; fuentes de hierro, tales como EDTA de hierro, citrato férrico, cloruro ferroso, sulfato férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico y nitrato férrico, preferiblemente, cloruro férrico, EDTA de hierro y citrato férrico; y reguladores de pH, tales como bicarbonato de sodio, cloruro de calcio, fosfato sódico monobásico, HEPES y MOPS, preferiblemente, bicarbonato de sodio. Pueden darse como ejemplos medios de cultivo que contengan cualquiera de estos componentes.

Además de los componentes anteriores, pueden añadirse oligoelementos metálicos, tales como sulfato de cobre, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, cloruro de estaño, cloruro de magnesio y subsulfato de sodio, preferiblemente, sulfato de cobre, sulfato de zinc y sulfato de magnesio; tensioactivos, tales como Tween 80 y Pluronic F68; cofactores de crecimiento, tales como insulina recombinante, IGF recombinante, EGF recombinante, FGF recombinante, PDGF recombinante, TGF- α recombinante, clorhidrato de etanolamina, selenito de sodio, ácido retinoico y diclorhidrato de putrescina, preferiblemente, selenito de sodio, clorhidrato de etanolamina, IGF recombinante y diclorhidrato de putrescina; y nucleósidos, tales como desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, adenosina, citidina, guanosina y uridina. En las realizaciones preferidas de la presente invención descritas anteriormente, pueden abarcarse antibióticos, tales como estreptomycin, penicilina G potásica y gentamicina, e indicadores de pH, tal como rojo fenol.

El medio usado en la invención puede prepararse añadiendo un producto de degradación enzimática de carne de pescado o de un extracto de carne de pescado a un medio de cultivo comercial para células animales, tal como D-MEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco), D-MEM/F-12, mezcla 1:1 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12), RPMI1640, CHO-S-SFMII (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH Biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific) o PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich).

En la invención, el medio al que se añade un producto de degradación enzimática de carne de pescado no está particularmente limitado, y puede usarse cualquiera medio. Preferiblemente, puede usarse un medio libre de suero

que no contenga ningún suero derivado de mamífero. En particular, se prefiere un medio libre de componentes derivados de mamífero que no contenga ningún componente derivado de mamífero aislado de mamíferos.

Habitualmente, cuando el medio al que se le añade un producto de degradación enzimática de carne de pescado es un medio libre de suero o un medio libre de componentes derivados de animales, la célula que va a cultivarse se adapta previamente para que la célula pueda crecer en tal medio. El método de acondicionamiento de células lo conocen bien los expertos en la técnica.

Las cantidades de los otros componentes en el medio de cultivo son de 0,05 a 1.500 mg/l para aminoácidos, de 0,001 a 10 mg/l para vitaminas, de 0 a 200 mg/l para factores lipídicos, de 1 a 20 g/l para fuentes de energía, de 0,1 a 10.000 mg/l para reguladores osmóticos, de 0,1 a 500 mg/l para fuentes de hierro, de 1 a 10.000 mg/l para tampones de pH, de 0,00001 a 200 mg/l para oligoelementos metálicos, de 0 a 5.000 mg/l para tensioactivos, de 0,05 a 10.000 mg/l para cofactores de crecimiento y de 0,001 a 50 mg/l para nucleósidos. Estas cantidades pueden determinarse de manera apropiada dependiendo del tipo de célula que va a cultivarse y del tipo de proteína de interés.

El pH del medio de cultivo difiere dependiendo de la célula que va a cultivarse, pero es generalmente un pH de 6,8 a 7,6 y en muchos casos de manera apropiada un pH de 7,0 a 7,4.

El método de cultivo de la invención puede usarse, sin ninguna restricción, para cultivar diversas células (por ejemplo, células bacterianas, células fúngicas, células de insectos, células vegetales, células animales, etc.). Por ejemplo, mediante el método de la presente invención puede cultivarse una célula COS o una célula CHO que tiene un gen que codifica para una proteína de interés incorporado mediante procedimientos de ingeniería genética o una célula de fusión productora de anticuerpos representada por un hibridoma, tal como ratón-ser humano, ratón-ratón o ratón-rata. El método de cultivo de la invención puede usarse también cuando se cultiva una célula animal para obtener una proteína natural producida por la célula animal. El método de cultivo puede usarse también para cultivar células BHK y células HeLa, así como las células mencionadas anteriormente.

Una célula animal particularmente preferible en la invención es una célula CHO en la que se ha transferido un gen que codifica para una proteína de interés. La proteína de interés no está particularmente limitada y puede ser cualquier proteína tal como un anticuerpo (anticuerpo natural, anticuerpo de pequeño tamaño molecular, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, etc.) o una proteína fisiológicamente activa (factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleucina tal como IL-1 o IL-6, t-PA, urocinasa, albumina sérica, factor de coagulación sanguínea, etc.). Entre todos, se prefiere especialmente un anticuerpo.

Los ejemplos de anticuerpos producidos mediante el método de producción de la invención no sólo incluyen anticuerpos monoclonales derivados de animales tales como ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, mono o similares sino también anticuerpos recombinantes modificados artificialmente tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos o similares. La clase de inmunoglobulinas de estos anticuerpos no está particularmente limitada, y puede ser cualquier clase tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, etc.), IgA, IgD, IgE, IgM o similares. Cuando el anticuerpo va a usarse como producto farmacéutico, la clase es preferiblemente IgG o IgM. Además, el anticuerpo de la presente invención no sólo abarca anticuerpos completos sino también fragmentos de anticuerpo (tales como Fv, Fab, F(ab)₂) y anticuerpos de bajo tamaño molecular, por ejemplo, Fv de cadena sencilla (scFV, sc(FV)₂, etc.) monovalentes o divalentes o de valencia superior preparados mediante la unión de las regiones variables de los anticuerpos con un ligador tal como un ligador peptídico.

Las condiciones de cultivo difieren dependiendo del tipo de célula usada, y pueden determinarse condiciones preferibles según se desee. Por ejemplo, cuando la célula es una célula CHO, puede cultivarse habitualmente en una atmósfera con una concentración de CO₂ en fase gaseosa del 0 al 40%, preferiblemente del 2 al 10%, a de 30 a 39°C, de manera preferible a aproximadamente 37°C, durante de 1 a 14 días.

El cultivo puede realizarse usando diversos dispositivos de cultivo para el cultivo de células animales, por ejemplo, un dispositivo de cultivo de fermentador tipo tanque, un dispositivo de cultivo tipo agitación por aire, un dispositivo de cultivo tipo frasco de cultivo, un dispositivo de cultivo tipo frasco giratorio, un dispositivo de cultivo tipo microportador, un dispositivo de cultivo tipo lecho fluidizado, un dispositivo de cultivo tipo fibra hueca, un dispositivo de cultivo tipo frasco giratorio y un dispositivo de cultivo tipo lecho fijo.

Según el método de la presente invención se posibilita una alta producción de proteínas cultivando una célula (preferiblemente una célula animal).

Para producir una proteína en una célula animal, puede ser suficiente con un simple cultivo, o puede requerirse un procedimiento especial. Los procedimientos, condiciones, etc. pueden determinarse, según se requiera, dependiendo de la célula animal que va a cultivarse. Por ejemplo, en el caso de una célula CHO transformada con un vector que contiene un gen que codifica para un anticuerpo quimérico de ratón-ser humano mediante operación de ingeniería genética, el cultivo se realiza en las condiciones mencionadas anteriormente, mediante las cuales puede obtenerse la proteína de interés en el medio de cultivo en aproximadamente de 1 a 14 días, de manera preferible en aproximadamente de 7 a 10 días. Entonces, el medio de cultivo se somete a aislamiento y purificación

mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo, Introduction to Antibody Engineering, Chijin Sho Kan publishing company, págs. 102-104; Affinity Chromatography Principles & Methods, Amersham Pharmacia Biotech, págs. 56-60), mediante los cuales puede obtenerse la proteína de interés.

- 5 Según la descripción, es posible producir un anticuerpo recombinante (anticuerpo natural, fragmento de anticuerpo, anticuerpo de bajo tamaño molecular, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo biespecífico, etc.), una proteína recombinante (factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleucina tal como IL-1 o IL-6, t-PA, urocinasa, albumina sérica, factor de coagulación sanguínea, etc.) o similares con un alto rendimiento.

Ejemplos

- 10 A continuación en el presente documento, la invención se describirá en más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos y al ejemplo de referencia. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención.

[Ejemplo 1] Cultivo discontinuo alimentado usando un hidrolizado de bonito

Las composiciones de los medios y el método de preparación del mismo son tal como se describe a continuación.

- 15 Medio inicial: Se añadió el hidrolizado de bonito preparado en el ejemplo de referencia 1 a un medio libre de componentes derivados de mamífero a 5 g/l. Tras la disolución, se esterilizó por filtración el medio resultante.

Medio de alimentación: Se hizo que las concentraciones de los componentes en el medio libre de componentes derivados de mamífero usado como medio inicial fueran aproximadamente 2 veces superiores en relación con el medio inicial. Se añadió el hidrolizado de bonito (30 g/l) al medio resultante y se disolvió, seguido de esterilización por filtración.

- 20 Células: Variedad de células CHO productora de anticuerpos humanos recombinantes anti-gangliósido GM3 (L612) dada a conocer en la publicación internacional WO 2005/005636. La clase de este anticuerpo es IgM.

- Se añadió el medio inicial a un dispositivo de cultivo tipo jarra. Se añadió al mismo la variedad de células CHO descrita anteriormente a 2×10^5 células/ml. Después, se comenzó el cultivo a 37°C bajo CO₂ al 10%. En el cultivo discontinuo alimentado, se alimentó el medio de alimentación a una velocidad de flujo constante a partir del día 3 de cultivo, y se cultivaron las células hasta el día 14. Se realizó la toma de muestras al comienzo del cultivo y en los días 3, 7, 10 y 14. Se sometió el sobrenadante de cultivo de cada muestra a cromatografía de exclusión molecular para determinar la concentración del anticuerpo producido. Tal como se muestra en la figura 1, cuando no se alimentó el medio de alimentación, la concentración de anticuerpo fue de aproximadamente 0,6 g/l tras 10 días de cultivo. Por otra parte, cuando se alimentó la disolución que contenía el hidrolizado de bonito, pudieron lograrse altas concentraciones de anticuerpo (1,2 g/l o más tras 10 días de cultivo y superando los 1,7 g/l tras 14 días de cultivo).

[Ejemplo 2] Cultivo discontinuo alimentado usando hidrolizado de bonito

Las composiciones de los medios y el método de preparación de los mismos son tal como se describen a continuación.

- 35 Medio inicial: Se añadió el hidrolizado de bonito preparado en el ejemplo de referencia 1 a un medio libre de componentes derivados de mamífero a 15 g/l. Tras la disolución, se esterilizó por filtración el medio resultante.

Medio de alimentación: Se hizo que las concentraciones de los componentes en el medio libre de componentes derivados de mamífero usado como medio inicial fueran aproximadamente 4 veces superiores en relación con el medio inicial. Se añadió el hidrolizado de bonito (75 g/l) al medio resultante y se disolvió, seguido de esterilización por filtración.

- 40 Células: Variedad de células CHO productora del anticuerpo PM-1 humanizado (anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano) preparada usando el promotor del factor de elongación α humano dado a conocer en el ejemplo 10 de la publicación internacional WO 92/19759 basándose en el método dado a conocer en el ejemplo de referencia 2 de la publicación de patente japonesa no examinada n.º H8-99902. La clase de este anticuerpo es IgG1.

- Se añadió el medio inicial a un dispositivo de cultivo tipo jarra. Se añadió al mismo la variedad de célula CHO descrita anteriormente a 1×10^6 células/ml cuando iba a alimentarse el medio de alimentación y a $0,5 \times 10^6$ células/ml cuando no iba a alimentarse el medio de alimentación. Después, se comenzó el cultivo a 37°C bajo CO₂ al 10%. En el cultivo discontinuo alimentado, se alimentó el medio de alimentación a una velocidad de flujo constante a partir del día 2 del cultivo, y se cultivaron las células hasta el día 10. Se realizó la toma de muestras al comienzo del cultivo y en los días 3, 5, 7 y 10. Se sometió el sobrenadante de cultivo de cada muestra a cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A para determinar la concentración del anticuerpo producido. Tal como se muestra en la figura 2, cuando no se alimentó el medio de alimentación, la concentración de anticuerpo fue de aproximadamente 0,5 g/l tras 7 días de cultivo. Por otra parte, cuando se alimentó la disolución que contenía el hidrolizado de bonito, pudieron lograrse altas concentraciones de anticuerpo (1,1 g/l o más tras 7 días de cultivo y superando los 1,4 g/l tras 10 días de cultivo).

[Ejemplo 3] Cultivo discontinuo alimentado usando un hidrolizado de bonito

Las composiciones de los medios y el método de preparación de los mismos son tal como se describen a continuación.

5 Medio inicial: Se añadió el hidrolizado de bonito preparado en el ejemplo de referencia 1 a un medio libre de componentes derivados de mamífero a 5 g/l. Tras la disolución, se esterilizó por filtración el medio resultante. Se usó como control el mismo medio sin el hidrolizado de bonito.

10 Medio de alimentación: Se hizo que las concentraciones de los componentes en el medio libre de componentes derivados de mamífero usado como medio inicial fueran 2 veces superiores en relación con el medio inicial. Se añadió el hidrolizado de bonito (30 g/l) al medio resultante y se disolvió, seguido de esterilización por filtración. Se usó como control el mismo medio sin el hidrolizado de bonito.

Células: Células CHO recombinantes productoras de (Fv)₂ de cadena sencilla (sc(Fv)₂) de unión a MPL preparadas mediante el método dado a conocer en la publicación internacional WO 2005/056604.

Resultados del cultivo:

15 Se añadió el medio inicial a un dispositivo de cultivo tipo jarra. Se añadió al mismo la variedad de células CHO descrita anteriormente a 3x10⁵ células/ml. Después, se comenzó el cultivo a 37°C bajo CO₂ al 10%. Se alimentó el medio de alimentación a una velocidad de flujo constante a partir del día 3 de cultivo, y se cultivaron las células hasta el día 14. Se realizó la toma de muestras de vez en cuando durante el cultivo. Se determinó para el sobrenadante de cultivo de cada muestra, la concentración de proteína mediante el método BIACORE usando la parte de la secuencia de aminoácidos de MPL a la que se une sc(Fv)₂. Tal como se muestra en la figura 3, cuando se alimentó el medio de alimentación sin el hidrolizado de bonito, la concentración de proteína tras 14 días de cultivo era de aproximadamente 450 mg/l. Por otra parte, cuando se alimentó la disolución con el hidrolizado de bonito, pudo lograrse una alta concentración de proteína (superando los 760 mg/l tras 14 días de cultivo).

[Ejemplo de referencia 1] Preparación de un producto de degradación enzimática de bonito

25 Se usó un bonito comercialmente disponible como carne de pescado. A 840 kg de bonito picado, se le añadieron 1.200 kg de agua. Se incubó la mezcla durante 1 hora junto con 3,2 kg de papaína derivada de planta a pH 6,0 y a 65°C para la degradación enzimática. Después, se llevó a cabo adicionalmente la degradación enzimática con 3,2 kg de exopeptidasa derivada de moho durante 15 horas en las condiciones anteriores, tras lo cual se calentó el sistema a 95°C para inactivar las enzimas. Después, se centrifugó el sistema y se filtró para eliminar componentes insolubles y aceites. Se concentró el residuo para obtener aproximadamente 150 kg de un producto de degradación enzimática de carne de pescado (bonito).

Aplicabilidad industrial

35 Según la invención, es posible cultivar una célula animal distinta de una célula productora de IgM de manera estable sin usar proteínas caras, tales como suero bovino fetal, que varían mucho en calidad. Además, cultivando una célula animal distinta de una célula productora de IgM según el método de la invención, pueden eliminarse los riesgos de contaminación por priones o virus anómalos que se han convertido recientemente en problemas graves, y pueden producirse y suministrarse productos biofarmacéuticos seguros en grandes cantidades.

REIVINDICACIONES

1. Método de cultivo de una célula animal distinta de una célula productora de IgM que comprende comenzar el cultivo en un medio inicial que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo y alimentar el medio al menos una vez con un medio de alimentación que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado durante el cultivo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la célula se cultiva mediante cultivo discontinuo alimentado.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula es una célula en la que se ha transferido un gen que codifica para una proteína de interés.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la proteína de interés es un anticuerpo.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la célula es una célula de mamífero.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la célula de mamífero es una célula CHO.
7. Método de producción de una proteína cultivando una célula animal distinta de una célula productora de IgM que comprende comenzar el cultivo en un medio inicial que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido al mismo y alimentar el medio al menos una vez con un medio de alimentación que contiene un producto de degradación enzimática de carne de pescado durante el cultivo.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la célula se cultiva mediante cultivo discontinuo alimentado.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que la célula es una célula en la que se ha transferido un gen que codifica para una proteína de interés.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la proteína de interés es un anticuerpo.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la célula es una célula de mamífero.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la célula de mamífero es una célula CHO.
13. Método según la reivindicación 2 u 8, en el que la concentración del producto de degradación enzimática de carne de pescado añadido en el medio inicial es de 3 a 20 g/l y en el medio de alimentación de 5 a 150 g/l.
14. Método según la reivindicación 4 ó 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

Fig. 1

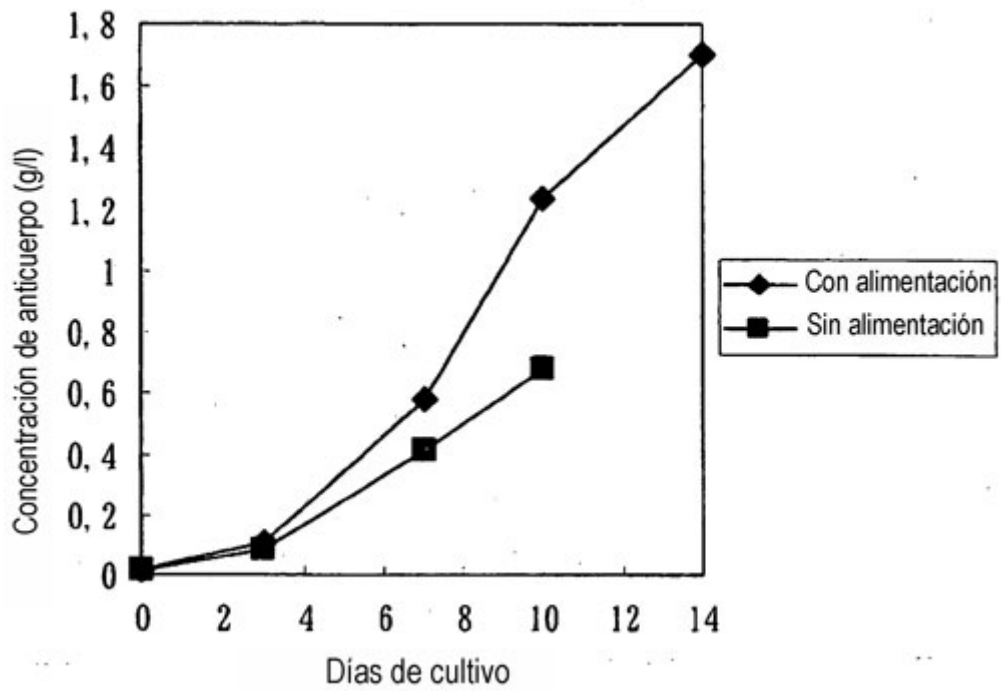


Fig. 2

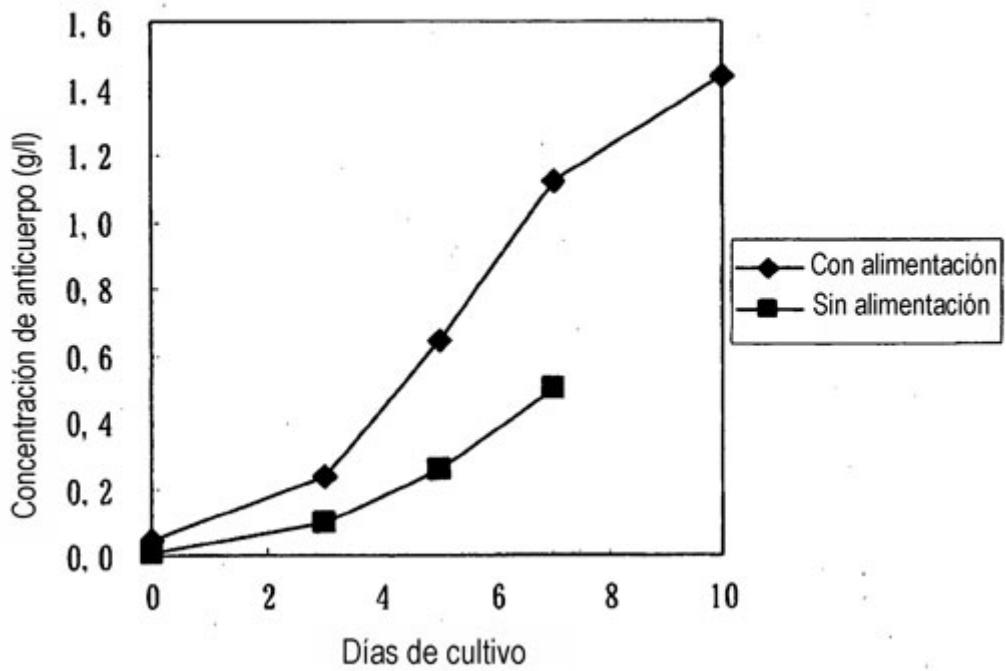


Fig. 3

