

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 454**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 11764561 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2625262**

54 Título: **Proceso para producción de proteínas**

30 Prioridad:

13.10.2010 US 392713 P
05.10.2010 EP 10186545

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

ROBIN, JARNO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 556 454 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para producción de proteínas

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un proceso para la producción de una proteína de la hemostasia por cultivo en perfusión continua de un cultivo de células en suspensión, expresando dicho cultivo de células dicha proteína de la hemostasia en dicha suspensión de cultivo, en donde el cultivo de células fluye a través de un módulo de filtro, módulo de filtro que conduce a una puerta de cosecha, teniendo el módulo de filtro un tamaño de malla de 0,1 a 2,9 µm que permite el paso a su través de la proteína de la hemostasia y en donde el flujo a través del módulo de filtro es un flujo alternativo tangencial. La invención se refiere también a una proteína producida por el proceso de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las proteínas de la hemostasia son componentes de la cascada de coagulación. Las deficiencias en una cualquiera de estas proteínas comprenden desde complicaciones de la salud a complicaciones amenazantes para la vida. Las deficiencias de estas proteínas se remediaban inicialmente por suministro de proteínas de la hemostasia procedentes de fuentes animales.

Típicamente, las proteínas recombinantes de la hemostasia se han producido por un proceso de fermentación continua en perfusión o un proceso de fermentación por lotes repetida. Estos procesos de fermentación proporcionan productos de alta calidad. Sin embargo, existe una necesidad continuada de proporcionar procesos que produzcan una mayor cantidad de producto, sin disminución de los estándares de calidad. La presente invención proporciona un proceso de este tipo.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 De acuerdo con lo anterior, el primer aspecto de la invención proporciona un proceso para la producción de una proteína de la hemostasia por cultivo en perfusión continua de un cultivo de células en suspensión, expresando dicho cultivo de células dicha proteína de la hemostasia en dicha suspensión de cultivo, fluyendo el cultivo de células a través de un módulo de filtro, módulo de filtro que conduce a una puerta de cosecha, teniendo el módulo de filtro un tamaño de malla de 0,1 a 2,9 µm que permite el paso a su través de la proteína de la hemostasia y en el cual el flujo a través del módulo de filtro es un flujo alternativo tangencial. El tamaño de la malla contenida en el interior del módulo de filtro permite el paso a través del módulo de filtro de la proteína de la hemostasia, pero no de las células o residuos celulares.

30 El proceso del primer aspecto de la invención permite la producción de proteínas de la hemostasia de alta calidad con títulos significativamente mayores que los procesos utilizados con anterioridad.

Adicionalmente, las ventajas del mayor título, sin poner en compromiso el crecimiento, la productividad y la calidad del producto se obtienen desde fermentaciones a escala de laboratorio (alrededor de 5 L) hasta fermentaciones en gran escala (al menos 500 L). La presente invención hace posible la producción de las proteínas deseadas en cantidad hasta diez veces mayor que los procesos de la técnica anterior, sin comprometer la calidad del producto.

35 La presente invención hace posible un control cuidadoso de los parámetros de proceso, haciendo factible la realización del proceso con una determinada densidad de células a fin de proporcionar un producto de alta calidad con altas concentraciones dentro de las características físicas del biorreactor.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Figura 1: Concentración de células vivas y viabilidad para Factor IX a escala de laboratorio y escala de planta piloto (>500 L) utilizando ATF realizado con extracción.

Figura 2: Comparación de rendimientos en gran escala (>500 L) entre procesos previos ("proceso semicontinuo") con el proceso ATF para Factor IX (en una escala relativa).

45 Figura 3: Concentración de células vivas y viabilidad para linajes de células de Factor IX en escala de laboratorio utilizando ATF realizado sin extracción.

Figura 4: Concentración de células vivas y viabilidad para Factor VIII a escala de laboratorio utilizando ATF.

Figura 5: Concentración de células vivas y viabilidad para Factor VII a escala de laboratorio utilizando ATF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 En el proceso de la invención, la proteína de la hemostasia es preferiblemente una de Factor VII (FVII), Factor VIII (FVIII) o Factor IX (FIX). Existen en la técnica numerosos documentos que describen la producción de las proteínas

de la hemostasia, tales como FVII, FVIII y FIX. Los linajes de células, el cultivo de células y las tecnologías de producción de proteínas son bien conocidos y se describen en documentos tales como US 2006/0166.915 y WO 2004/000366 para FVII, US 2009/0130060 y WO 2006/018.204 para FVII y FIX, WO 2009/130198 y US 4.770.999 para FIX y US 20100120094, WO 97/43436, WO 88/08035, WO 87/04187, WO 90/02175, US 20050227913 y EP 1707634 para FVIII. Todos estos documentos describen los principios bien conocidos de la producción de proteínas de la hemostasia, cuyos pasos de proceso pueden utilizarse conforme a la presente invención. Para producir las proteínas recombinantemente conforme a la invención, se utiliza un linaje de células que expresa la proteína (en condiciones apropiadas) mientras se encuentra en cultivo. Tales linajes de células (con ácido nucleico recombinante que codifica una proteína de la hemostasia tal como FVII, FVIII o XIX) son conocidos la técnica, tales como células de Riñón de Cría de Hámster (BHK), células humanas, con inclusión de células humanas inmortalizadas (v.g. células PER.C6), y células de rata y ratón. Conforme a la presente invención, el cultivo de células es preferiblemente un cultivo de un linaje de células de ovario de hámster chino (CHO), que expresa la proteína de la hemostasia de interés en cultivo. Más preferiblemente, el cultivo es el linaje de células CHO-K1.

El cultivo de células está presente en suspensión. Ejemplos de medio útil para dicho cultivo y para la producción recombinante de la proteína de interés son bien conocidos. Ejemplos adecuados pueden encontrarse en la técnica anterior, con inclusión de los archivos de patente descritos anteriormente y en la sección de ejemplos de este documento.

La presente invención es un proceso continuo en perfusión para cultivar células. El término proceso en perfusión para cultivar células tiene el significado convencional en la técnica, lo que significa que, durante el cultivo, las células están retenidas por un dispositivo de separación; existe un flujo de salida de líquido (del cultivo) que tiene una densidad de células menor que antes de la separación, existiendo también un flujo de entrada (en el cultivo) del medio de cultivo de células. La presente invención se refiere a la producción de una proteína deseada. El líquido clarificado recogido del proceso tiene una concentración de la proteína deseada comprendida en el mismo intervalo que lo hace el cultivo de células. En la presente invención es preferible que al menos un componente del medio de cultivo de células se añada continuamente. Otros componentes del medio pueden añadirse de manera continua, semicontinua o de otro modo.

El dispositivo de separación conforme la presente invención es un módulo de filtro. El módulo de filtro es preferiblemente un filtro de fibra hueca en forma de una membrana tubular. Filtros/membranas de este tipo son conocidos comúnmente en la técnica, y pueden obtenerse, por ejemplo, de General Electric (anteriormente Amersham). El filtro se selecciona de tal manera que el tamaño de malla es de 0,1 a 2,9 μm . Ésta es una característica importante de la invención, dado que dicho tamaño de malla se selecciona para evitar, en la mayor medida posible, que los restos celulares pasen a través del filtro. Filtros preferidos para uso conforme a la invención incluyen los fabricados a partir de mezclas PS (polisulfona) o PES (polietersulfona).

El flujo alternativo tangencial (ATF) se ha descrito desde hace tanto tiempo como el año 2000. Un sistema ATF está compuesto generalmente por un diafragma además del filtro (como se ha descrito arriba), filtro que puede estar conectado con cualquier tipo de biorreactor (acero inoxidable, vidrio, un biorreactor de un solo uso, etc.). Por cambio del tamaño de poro del filtro, el producto obtenido puede, o bien someterse a aumento de concentración en el biorreactor o retirarse continuamente. ATF significa que se está produciendo flujo alternativo tangencial en el módulo de filtro, es decir, que existe un solo flujo en la misma dirección (es decir, tangencial), en cuanto a las superficies de membrana del módulo de filtro y que existe otro flujo en una dirección sustancialmente perpendicular a dicha superficie del filtro. El flujo tangencial puede obtenerse por métodos conocidos en la técnica, tal como se describen en la patente US número 6.544.424.

El biorreactor preferido es un biorreactor agitado clásico provisto de una puerta de extracción, una puerta ATF (puerta de cosecha), una puerta intermedia, una puerta de base, puertas de gas y puertas adicionales para otras adiciones.

Con anterioridad no se ha creído que pueda útil utilizarse ATF en un proceso para producir proteínas de la hemostasia que tengan cualidades similares a las producidas en otros procesos (cualidades tales como, por ejemplo, perfil GLA o forma activada o perfil de glicol o cadena pesada), como material producido utilizando otros procesos que tengan un rendimiento significativamente menor, por ejemplo niveles de producción diaria o volumétrica o concentración de producto a granel.

Los parámetros del sistema son generalmente los descritos en la técnica. En principio, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo de las no son críticos y dependen de la célula seleccionada y del producto a producir. Los parámetros pueden modificarse para maximizar la calidad y cantidad de producto. Usualmente se requiere una compensación. Conforme a la presente invención, la velocidad en perfusión es preferiblemente de 0,7 a 10 volúmenes por día, más preferiblemente de 0,9 a 4 volúmenes por día.

El proceso puede "sangrarse" para eliminar la suspensión de cultivo de células sin filtrar a fin de compensar el volumen de líquido recogido y el volumen de líquido añadido al cultivo. Esta velocidad de extracción puede modificarse. El líquido sin filtrar se retira preferiblemente del proceso a una velocidad de 0 a 0,2 volúmenes por día (volumen total del proceso). La suspensión de cultivo de células sin filtrar puede retirarse continuamente del proceso

(extracción continua). Alternativamente, la suspensión de cultivo de células sin filtrar puede retirarse del proceso discontinuamente (extracción pulsada). Con respecto al Factor IX, una velocidad de extracción preferida es 0,01 a 0,2) volúmenes por día (volumen total del proceso). Esta extracción se aplica durante la fase de producción a fin de mantener una viabilidad celular alta como por ejemplo, superior a 80 %".

5 La proteína de hemostasia deseada se recoge del sistema por la puerta de cosecha. Muy preferiblemente, la misma se purifica en procesamiento aguas abajo. Pueden combinarse varios pasos de procesamiento aguas abajo. El procesamiento aguas abajo típico de las proteínas de la invención se describe en la técnica, tal como en los registros de patente de la técnica anterior a que se ha hecho referencia anteriormente. En el proceso de la invención, el líquido que pasa a través del módulo de filtro contiene la proteína deseada que se separa de las células y residuos celulares en cultivo de suspensión por el paso a través del filtro. El líquido es una suspensión filtrada y clarificada que contiene la proteína de la hemostasia producida. La suspensión filtrada se recoge preferiblemente a una velocidad de 0,7 a 10 volúmenes por día (volumen total del proceso), con preferencia 0,7 a 1,0, ó 0,8 a 1,4, ó 1,0 a 1,2 volúmenes por día.

15 La productividad del proceso depende en cierto grado de los parámetros del proceso, dependiendo por otra parte de la exposición de la proteína de la hemostasia a los clones de células. El beneficio de la presente invención es la mayor producción comparada con la producción en un proceso distinto de ATF que utilice el mismo clon de células.

La viabilidad celular al comienzo y durante el proceso debería ser mayor que 80 %, preferiblemente mayor que 90 %. La viabilidad celular debería medirse durante el proceso y ajustarse a las condiciones como en todos los cultivos si la viabilidad celular desciende por debajo del nivel deseado.

20 La densidad celular variará. Un inóculo adecuado está comprendido en el intervalo de $3-6 \times 10^5$ células/ml.

La densidad de las células diana en el cultivo es inferior a 80×10^6 células/ml. Una densidad mayor de células produce una cantidad y/o calidad menor de producto. En una realización preferida para FIX, la densidad de células en el cultivo es inferior a 8×10^6 células/ml.

25 La temperatura de la suspensión se mantiene preferiblemente alrededor de 35,5 a 37,5 °C, muy preferiblemente alrededor de 36,5 °C. El pH de la suspensión se mantiene preferiblemente alrededor de $6,95 \pm 0,45$.

30 La concentración de oxígeno disuelto en la suspensión es importante. Preferiblemente, la misma es alrededor de 20 a 120%, con preferencia alrededor de 30 a 70%, con más preferencia alrededor de 45 a 55%, y con más preferencia alrededor de 50%. La aireación puede realizarse por cualquier medio. Medios típicos y preferidos incluyen aireación utilizando una mezcla de aire y oxígeno, preferiblemente 100% de oxígeno a través de un borboteador, en condiciones de entrada de aire constante en el espacio de cabezas.

En particular, la presente invención se refiere a un proceso como se indica en la reivindicación 1, para la producción de proteína Factor VII o Factor VIII o Factor IX.

35 Un segundo aspecto de la invención proporciona una proteína FVII, FVIII o FIX producida por un proceso conforme al primer aspecto de la invención. Todas las características preferidas del primer aspecto son aplicables también al segundo aspecto.

La calidad de la proteína puede medirse conforme a criterios para dicha proteína, dado que las proteínas de la hemostasia son conocidas en la técnica. La medida de la calidad de FVII y FIX se refiere usualmente al perfil GLA (Gla 10 a 12). La medida de la calidad de FVIII se refiere usualmente a las reivindicaciones pesada y ligera combinadas.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1

45 El Ejemplo 1 describe el cultivo de la proteína Factor IX, realizado utilizando el proceso de la invención en un dispositivo en perfusión ATF en un biorreactor de 5 L (escala de laboratorio). El cultivo se realizó utilizando un dispositivo en perfusión ATF. El cultivo dio como resultado densidad de células, viabilidad y rendimiento de producto estables. El intervalo de extracción variaba desde cero a 20 %.

50 Por lo que respecta a la calidad del producto, el FIX activado ("FIXa") se mantiene estable y bajo en el proceso. El perfil de GLA (dominio de ácido gamma-carboxiglutámico de FIX rico en ácido glutámico) con relación a GLA 11 & 12 disminuía ligeramente desde 90-95 % a 80-85% a medida que aumenta la concentración de FIX. El rendimiento de FIX alcanzado es alrededor de 10 veces mayor que en el proceso corriente de la técnica anterior (no ATF) utilizado sin poner en compromiso la calidad del producto.

Detalles de la cepa

El tipo de célula es una cepa CHO-K1 que expresa FIX.

Medio:

El medio utilizado era un medio comercial que soportaba el crecimiento y la producción de las células y el producto. Dicho medio está reforzado usualmente con insulina, vitamina K1, glutamina y glucosa.

Resumen del proceso

- 5 Se siguió un proceso para cultivo de FIX a fin de ajustar el proceso ATF conforme a la invención. El proceso implicaba descongelación de un vial de banco de células y transferencia de las células a matraces en forma de T o matraces de sacudidas con baja agitación (<30 revoluciones por minuto). La expansión de las células se realizó en matraces de sacudidas hasta que se produjeron células suficientes a fin de inocular un biorreactor de 5 L. En todos los pasos del proceso las células se cultivan en suspensión en medio exento de suero. En el biorreactor, el cultivo se realizó en modalidad de lotes durante los 2 ó 3 primeros días. Cuando se cumplieron los criterios para inicio de la perfusión, pulso y recogida, se suministró el medio continuamente. Se añadieron glutamina y glucosa por bolus o continuamente (en caso necesario). La recogida se clarificó de GMO por centrifugación y/o filtración y se transfirió a la recuperación primaria.

Parámetros del biorreactor – Preparación y test de 5 L Biostat B plus

- 15 El electrodo de pH se calibró con tampones 4,0 y 7,4 y se comprobó con tampón 7,0 antes de ensamblar el tanque. El tanque se esterilizó con PBS (9,6 g/l, que se intercambiaba más tarde con medio. El electrodo de oxígeno se calibró con nitrógeno (0%) y aire (100%) en la solución de PBS.

El electrodo de pH se recalibró eventualmente para medidas de pH externas. El tanque, las tuberías y los filtros se testaron respecto a fugas.

20 **Condiciones operativas del proceso**

Los puntos de ajuste de los parámetros del proceso se ajustaron como se especifica en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Condiciones operativas del proceso para 5 L Biostat B plus

Parámetro	Unidades	Punto de ajuste
Temperatura	°C	34-38)
pH		6,7-7,5
DOT (tensión de oxígeno disuelto)	% de saturación del aire	10-90
Velocidad de agitación	rpm	100-150
Volumen de operación	L	4
Base (carbonato de sodio para control del pH)	M	1-3
CO ₂ (espacio de cabezas)	NA	A demanda
O ₂ o aire o mixture (borboteo)	%	0-100%

Inoculación

- 25 La concentración de células de siembra se direccionó en el intervalo de 3-6 x 10⁵ células/ml). La base se conectó hasta 2 días después de la inoculación.

Fase de crecimiento

- 30 La perfusión y la extracción se iniciaron cuando la concentración de células alcanzó la fase de crecimiento experimental. La ratio de velocidades extracción/recogida era 10/90 (%). La botella de recogida se cambió cada día durante el cultivo.

Se aplicó una estrategia de extracción por pulsos tan pronto como la concentración de células era mayor que la concentración de células diana (6 x 10⁶ células/ml). Dependiendo de la concentración de células, el tamaño de la

extracción por pulsos se modificó desde cero a 20% del volumen de operación del biorreactor.

La velocidad de recogida se mantuvo constante y se comprobó diariamente.

Recogida

5 El cultivo de células se recogió desde el tanque a un matraz con tapón azul. El cultivo se filtró en condiciones estériles utilizando un filtro de 0,22 µm. Se transfirió aproximadamente 1 L de recogida a una bolsa estéril y se congeló.

Resultados

La concentración de células se mantuvo estable a alrededor de $7-8 \times 10^6$ células/ml.

10 La viabilidad se mantuvo alrededor de 85% y 90% durante el cultivo. Ello dio como resultado un contenido de FIXa de aproximadamente 0,07%.

Por lo que respecta al perfil de GLA, GLA-11 y GLA-12 se mantuvieron por encima de 80%.

Se obtuvieron también alta productividad y producto estable con extracción continua.

Ejemplo 2

15 El ejemplo 2 describe el cultivo de la proteína Factor IX, realizado utilizando el proceso de invención en un dispositivo en perfusión ATF en gran escala (> 500 L). El proceso en gran escala (Ejemplo 2) se realizó utilizando los mismos cepa, medio y pasos generales de proceso descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Con respecto a los parámetros de proceso (es decir parámetros del biorreactor, condiciones operativas, etc.) éstos fueron también similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1.

20 **Tabla 2: Datos de calidad del producto para Factor IX en escala de laboratorio y gran escala para el proceso anterior (“proceso semicontinuo”) y el proceso ATF**

Biorreactor	Proceso	GLA11+12 (%)	FIXa (%)
Escala de laboratorio	Proceso semi-continuo	90	~0,03
Gran escala (>500L)	Proceso semi-continuo	90-93	0,02-0,06
Escala de laboratorio	ATF	80-90	0,06-0,13
Gran escala (>500L)	ATF	87-96	0,02-0,15

Resultados

25 La tabla 2 muestra que la calidad del Factor IX producido se mantiene utilizando el proceso ATF comparada con el proceso anterior (“proceso semicontinuo”). Sin embargo, el proceso ATF produce cantidad/rendimiento mucho mayores (como se muestra en la Figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de una proteína de la hemostasia por cultivo en perfusión continua de un cultivo de células, en suspensión, expresando dicho cultivo de células dicha proteína de la hemostasia en dicha suspensión de cultivo,
- 5 en donde el cultivo de células fluye a través de un módulo de filtro, módulo de filtro que conduce a una puerta de cosecha, teniendo el módulo de filtro un tamaño de malla de 0,1 a 2,9 μm que permite el paso a su través de la proteína de la hemostasia,
en donde el flujo a través del módulo de filtro es un flujo alternativo tangencial, la proteína de hemostasia es Factor IX, y el proceso se realiza en fermentaciones en gran escala, es decir al menos 500 L.
- 10 2. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la velocidad en perfusión es 0,7 a 10 volúmenes por día.
3. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el que la suspensión de cultivo de células sin filtrar se retira del proceso a una velocidad de 0 a 0,5 volúmenes por día.
4. El proceso conforme a la reivindicación 1, en el que la suspensión de cultivo de células sin filtrar se retira de
15 proceso a una velocidad de 0,01 a 0,2 volúmenes por día.
5. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión de cultivo de células sin filtrar se retira continua o discontinuamente del proceso.
6. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la concentración de células se mantiene por debajo de 80×10^6 células/ml, preferente por debajo de 50×10^6 células/ml.

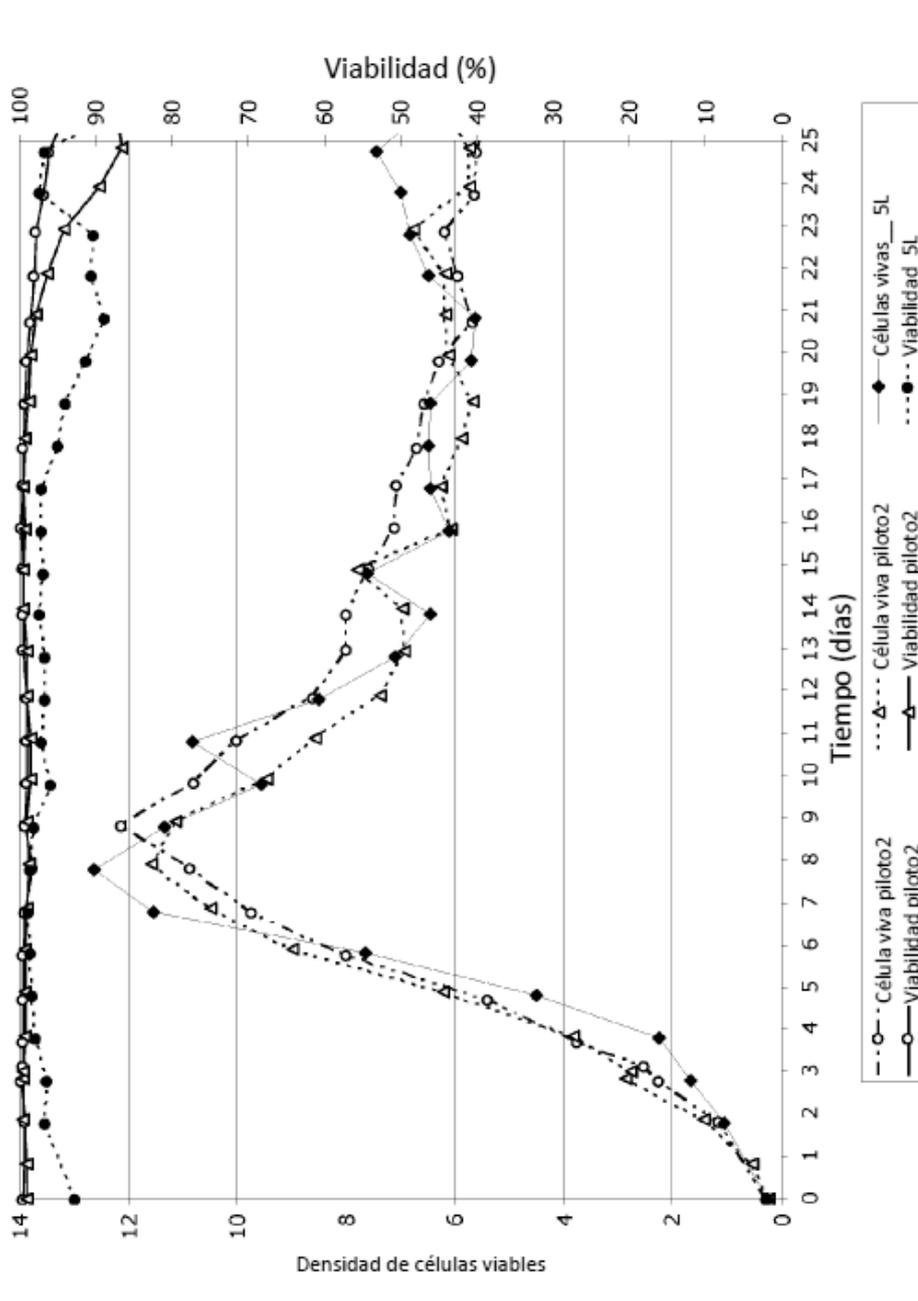


Fig. 1

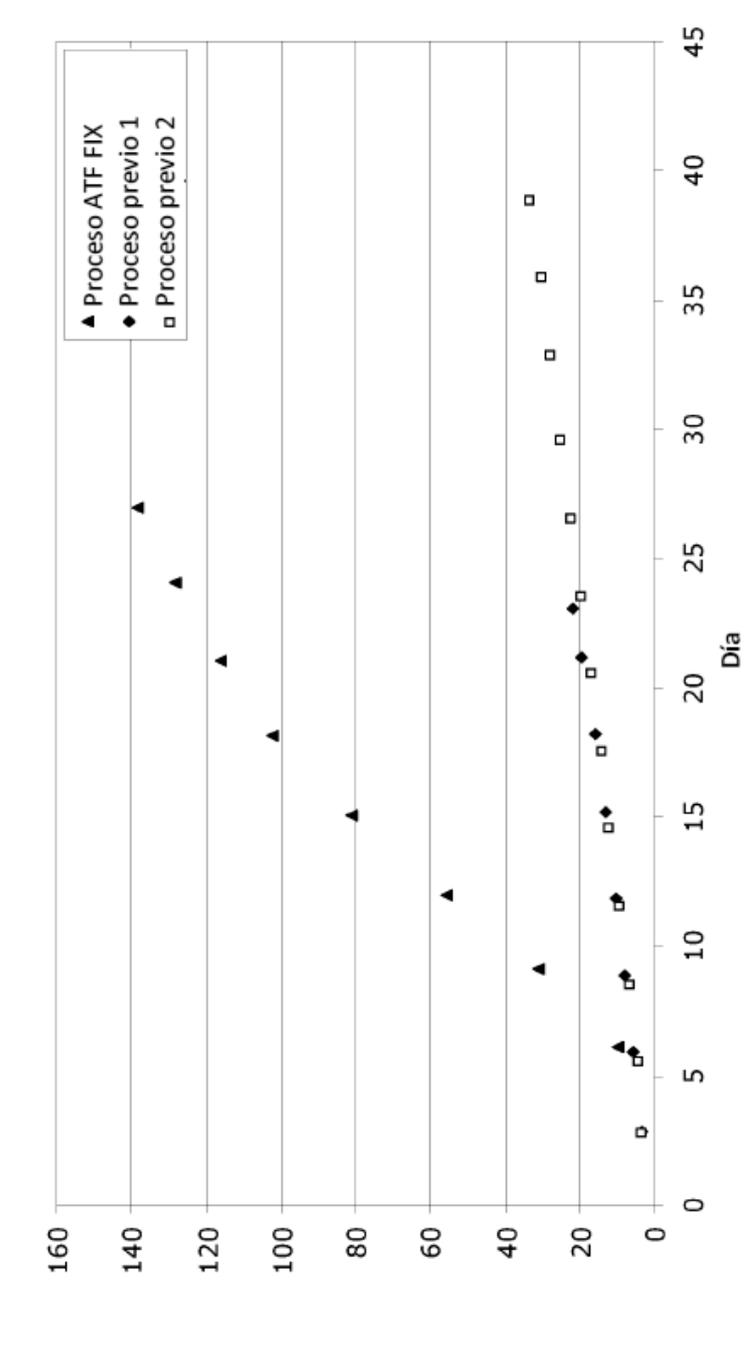


Fig. 2

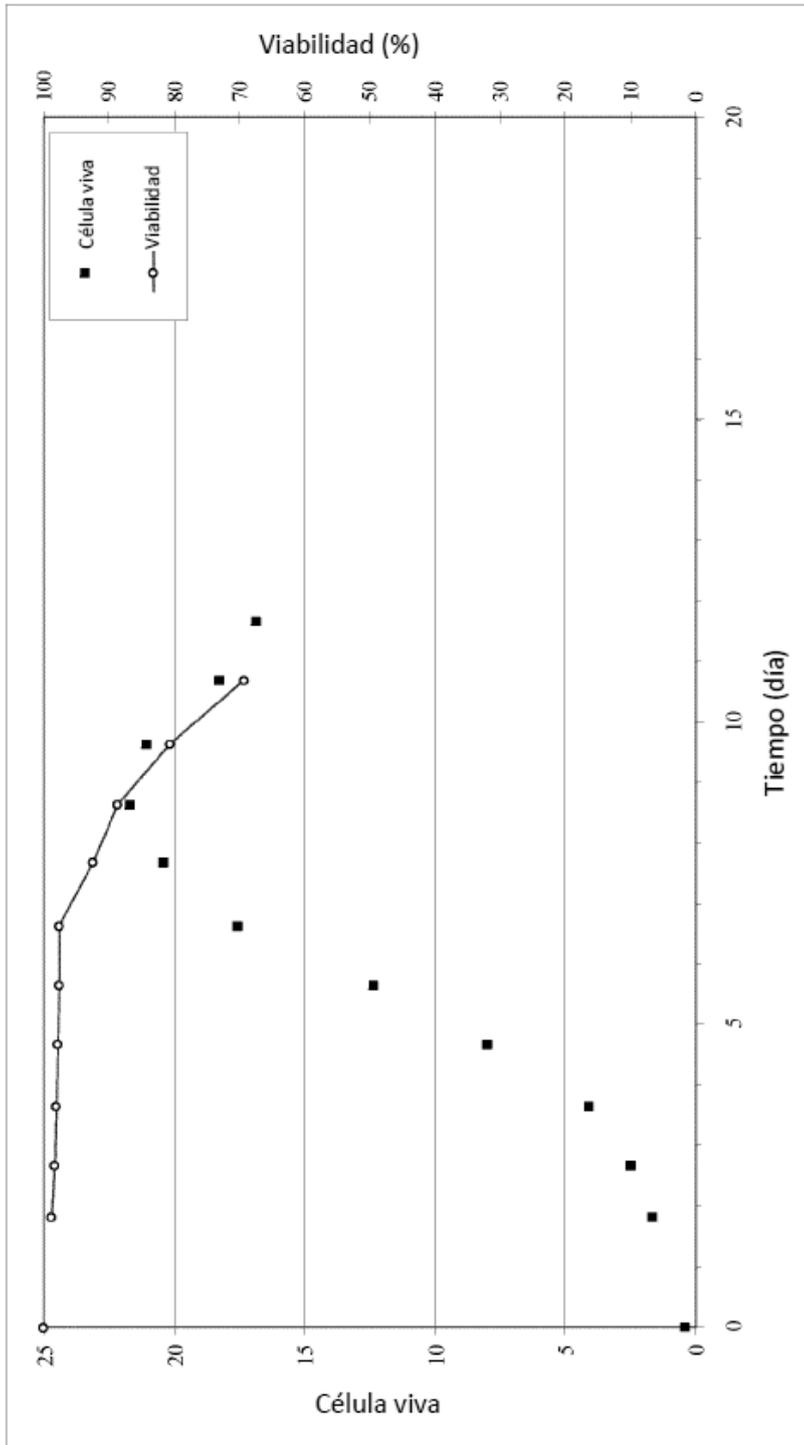


Fig. 3

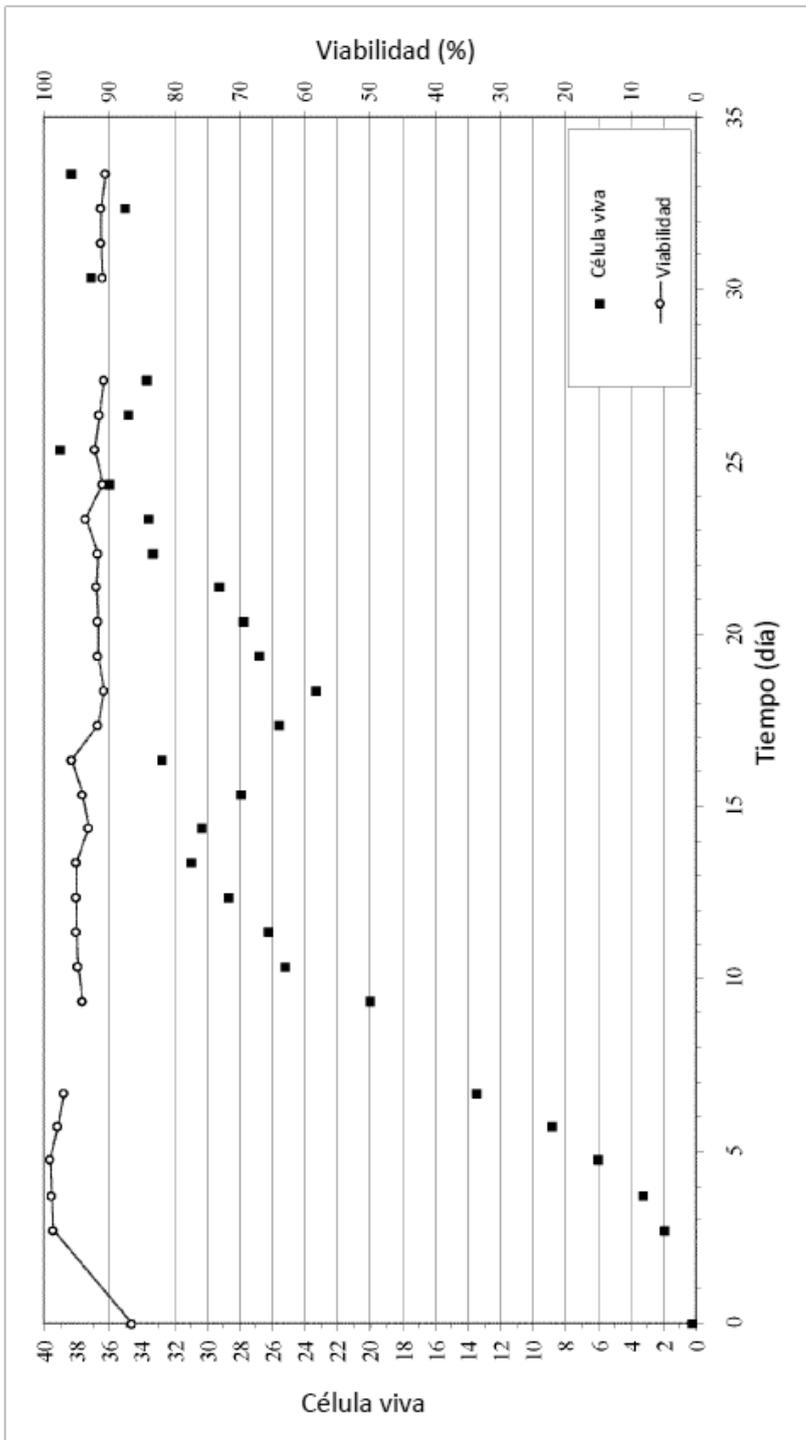


Fig. 4

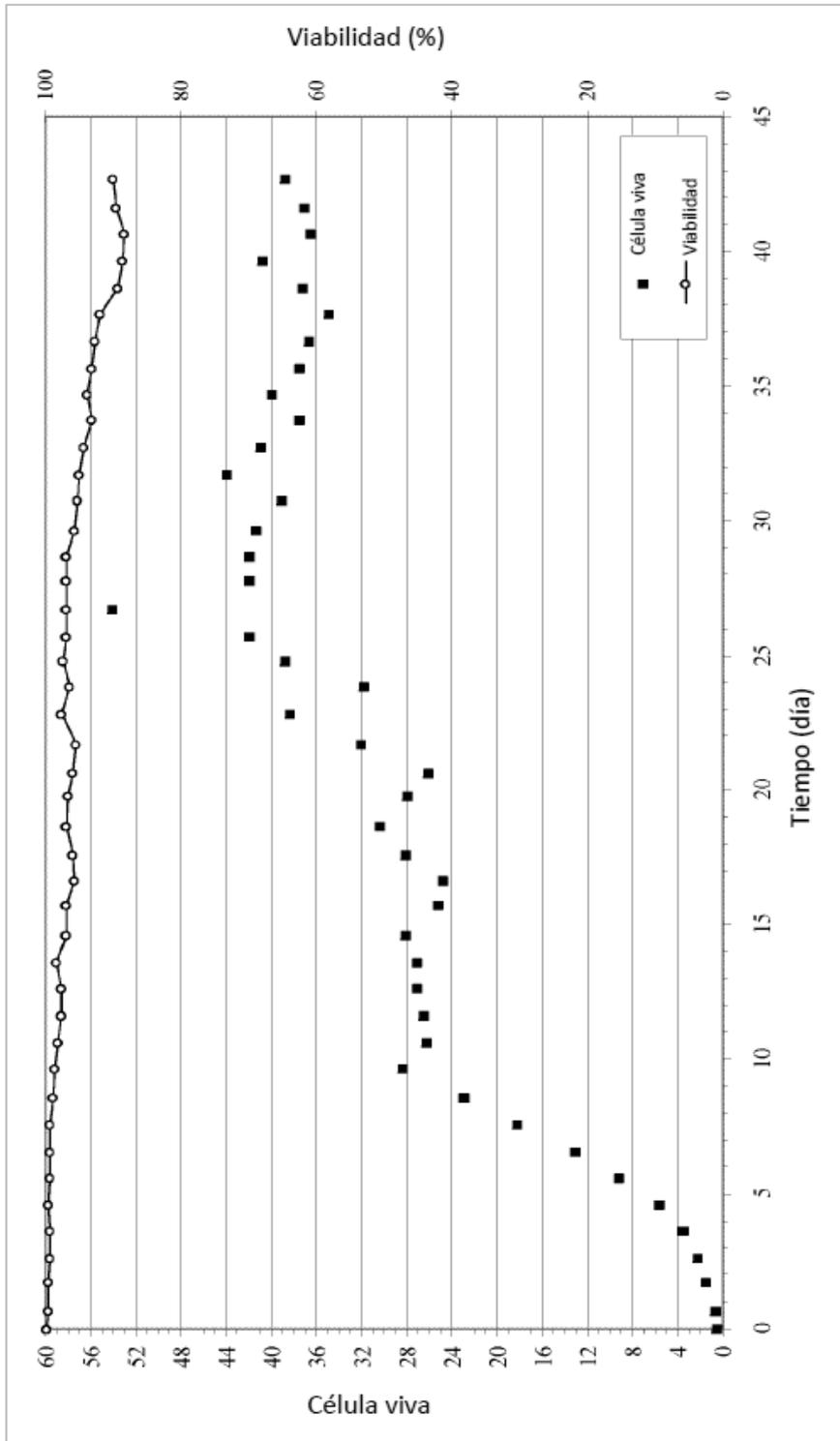


Fig. 5