

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 781**

51 Int. Cl.:

C07K 14/61 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011 E 11773541 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2619222**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la producción de hormona del crecimiento humana recombinante**

30 Prioridad:

21.09.2010 EP 10177997

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

15.04.2016

73 Titular/es:

**FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

**KANNER, DOV y
SCHMELL, ELI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 566 781 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

Procedimiento mejorado para la producción de hormona del crecimiento humana recombinante

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la producción de hormona del crecimiento humana recombinante (hGH).

ANTECEDENTES

10 La hormona del crecimiento humana (hGH), también conocida como somatropina (INN) o somatotropina, es una hormona proteica producida y segregada por las células somatotrópicas de la pituitaria anterior. La hormona del crecimiento humana juega un papel clave en crecimiento somático en la infancia y en el metabolismo en la edad adulta por sus efectos en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos. La hormona del crecimiento humana es una cadena de polipéptidos única de 191 aminoácidos que presenta dos enlaces disulfuro, uno entre Cys-53 y Cys-165, que forma un gran bucle en la molécula y el otro entre Cys-182 y Cys-189, que forma un bucle pequeño cerca del extremo C-terminal.

15 La tecnología de ADN recombinante ha permitido la producción de un suministro ilimitado de hGH en un número de diferentes sistemas. Uno de estos sistemas es bacterias, por ejemplo, *E. coli*. Si bien tal procedimiento está bien establecido y se usa ampliamente, como cualquier procedimiento de la técnica en cualquier momento, también este último se puede aún mejorar.

20 Cuando la hGH recombinante es expresada en células de *E. coli* como cuerpos de inclusión, los cuerpos de inclusión se disuelven de forma típica en presencia de agentes de reducción y/o agentes caotrópicos con lo que se renaturaliza completamente la hGH y se facilita el plegado apropiado de la hGH en su forma bioactiva y se mitiga la formación agregada.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ahora una reducción significativa en la formación de agregados durante la producción de hGH sin la necesidad de agentes de reducción y/o agentes caotrópicos.

25 A este respecto la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de la hormona del crecimiento humana que comprende:

- (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana (hGH);
- 30 (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGH disuelta;

caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

35 La presente invención proporciona además un procedimiento para la reducción de la cantidad de formas poliméricas de hormona del crecimiento humana formadas durante un procedimiento para la producción de la hormona del crecimiento humana, que comprende:

- (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana (hGH);
- 40 (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGH disuelta;

caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 El procedimiento para la producción de hormona del crecimiento humana de la presente invención comprende las etapas de:

- (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana (hGH);

- (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGh disuelta;

5 caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

El procedimiento para la reducción de la cantidad de formas poliméricas de la hormona del crecimiento humana formadas durante un procedimiento para la producción de la hormona del crecimiento humana de la presente invención comprende las etapas de:

- 10 (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana (hGH);
- (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGh disuelta;

15 caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

“Hormona del crecimiento humana” y “hGH” tal como se usan este documento de forma intercambiable, debería entenderse que engloban hormona del crecimiento humana que presenta 191 aminoácidos o Met-hGH que presenta 192 aminoácidos (es decir, hGH con una metionina adicional en el extremo N-terminal).

20 Una “forma polimérica hGH” tal como se usa en esta invención debería entenderse que engloba cualquier forma de hGH que no sea hGH que presente 191 aminoácidos o 192 aminoácidos (hGH con una metionina adicional en el extremo N-terminal) tal como, pero sin limitarse a, dímeros y oligómeros de hGH.

“Medio de cultivo” tal como se usa en esta invención debería entenderse que comprende medio fermentador y/o medio de producción.

25 Los elementos traza en el medio de cultivo se pueden proporcionar de forma convencional, por ejemplo haciendo uso de sales comercialmente disponibles de los elementos traza, incluyendo ácidos y bases e hidratos de los mismos. Estos se pueden introducir en el medio de cultivo en forma de sales sólidas o en forma de soluciones acuosas que comprenden una o más de las sales. En una realización estos se pueden añadir en forma de una solución de elementos traza que comprende cada uno de los elementos traza a una concentración predeterminada. La solución de elementos traza puede contener adicionalmente un ácido o base para ajustar el pH y por ejemplo, 30 mantener los elementos traza en solución.

Se puede proporcionar manganeso como un elemento traza usando, por ejemplo, sulfato de manganeso monohidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$). Se puede proporcionar cinc como un elemento traza usando, por ejemplo, sulfato de cinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Se puede proporcionar cobalto como un elemento traza usando, por ejemplo, cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$). Se puede proporcionar molibdeno como un elemento traza usando, por ejemplo, molibdato de sodio dihidratado ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$). Se puede proporcionar calcio como un elemento traza usando, por ejemplo, cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Se puede proporcionar cobre como un elemento traza usando, por ejemplo, sulfato de cobre pentahidratado ($CoSO_4 \cdot 5H_2O$). Se puede proporcionar boro como un elemento traza usando, por ejemplo, ácido bórico (H_3BO_3). Se puede proporcionar también hierro como elemento traza.

40 Los elementos traza están presentes en el medio de cultivo en los siguientes intervalos de concentración (en base al volumen total del medio de cultivo) (“intervalo”) y en una realización están presentes a las concentraciones particulares indicadas (“realización”):

Elemento traza	Intervalo (μM)	Realización (μM)
Manganeso	4,4-5,4	4,9
Cinc	7,2-8,8	8,0
Cobalto	6,3-7,7	7,0
Molibdeno	6,2-7,6	6,9

Calcio	15,2-18,6	16,9
Cobre	5,5-6,7	6,1
Boro	6,0-7,4	6,7

En una realización, los elementos traza se usan en una solución de elementos traza que se añade al medio de cultivo. En esta realización, la solución de elementos traza es preferiblemente una solución acuosa concentrada que contiene los elementos traza a una concentración que, cuando se usa en el medio de cultivo, alcance los intervalos de concentración anteriormente citados.

- 5 En una realización, la solución de elementos traza se añade al medio de cultivo en una proporción de 0,1 a 10 ml/l, en base al volumen total del medio de cultivo, o de 0,2 a 5 ml/l o de 0,5 a 1 ml/l o a aproximadamente 0,8 ml/l.

10 Cuando se añade la solución de elementos traza al medio de cultivo a aproximadamente 0,8 ml/l, puede comprender 1 g/l de sulfato de manganeso monohidratado. Esta puede comprender también 2,8 g/l de sulfato de cinc heptahidratado. Puede comprender también 2 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado. Puede comprender también 2 g/l de molibdato de sodio dihidratado. Puede comprender también 3 g/l de cloruro de calcio dihidratado. Puede comprender también 1,85 g/l de sulfato de cobre pentahidratado. Puede comprender también 0,5 g/l de ácido bórico. En una realización la solución de elementos traza comprende cada una de las concentraciones anteriormente citadas de los elementos traza.

- 15 Cuando se lleva a cabo la fase de fermentación en más de una etapa, por ejemplo, cuando se prepara un cultivo de siembra en un fermentador de siembra y se hace avanzar ese cultivo de siembra a un fermentador de producción, se usan los elementos traza de acuerdo con la presente invención en al menos una etapa, o en más de una etapa, o en todas las etapas de fermentación.

“pH alcalino” tal como se usa en esta invención debería entenderse que comprende un pH que varía de 10 a 12,5. En un aspecto el pH alcalino es aproximadamente 12.

- 20 Se concibe además que la etapa (ii), es decir, recuperación de los cuerpos de inclusión y disolución de los cuerpos de inclusión recuperados a pH alcalino, no implica el uso de agentes reductores y agentes caotrópicos.

“Agente de reducción” tal como se usa en esta invención debería entenderse que comprende un agente capaz de reducir los enlaces Cys-Cys proteicos. Ejemplos no limitantes de agentes reductores son ditioneol (DTT), beta-mercaptoetanol, cisteína y glutatión.

- 25 “Agente caotrópico” tal como se usa en esta invención debería entenderse que comprende un agente que altera la estructura tridimensional en macromoléculas tales como proteínas y las desnaturaliza. Ejemplos no limitantes de agentes caotrópicos son urea, guanidina, tiourea y perclorato de litio.

30 La etapa (iii) del procedimiento de la presente invención es una etapa opcional que se puede llevar a cabo en el caso que se desee producir la hGH en forma sólida. En una realización la etapa (iii) comprende una subetapa de purificación de la hGH disuelta antes de la liofilización. Igualmente la subetapa de purificación se puede añadir a la etapa (ii) en caso de que no se lleve a cabo ninguna liofilización.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no se pretende en modo alguno que limiten el alcance de la invención según se reivindica.

- 35 EJEMPLO 1 - Procedimiento para la producción de hGH

La preparación de hGH consiste en procedimientos bien conocidos en la técnica incluyendo la fermentación y la cosecha de células de *E. coli* que producen hGH, la recuperación y la disolución de cuerpos de inclusión y la purificación y la liofilización de hGH.

Procedimiento de fermentación

- 40 El procedimiento de fermentación de hGH consiste en tres etapas llevadas a cabo sucesivamente en un matraz agitador, un fermentador de siembra y un fermentador de producción. Los parámetros de fermentación, temperatura, agitación, aireación, presión, pH y oxígeno se controlan por completo mediante un sistema de control que también controla el consumo de glucosa y amoníaco.

Inóculo

- 45 Se inoculó ~1 ml de *E. coli* que expresa hGH (n.º de ATCC: 39384) en un matraz que contiene 200 ml de medio de cultivo (20 g/l de hidrolizado de caseína, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 100 mg/l de sal sódica de

ampicilina). Se incubó el matraz durante ~6 horas en un agitador rotatorio a ~30° C a ~250 rpm. Al final de este periodo el cultivo presentaba una densidad óptica a 660 nm (D.O.) de ~4. Se inoculó una cantidad calculada de cultivo de siembra en el fermentador de siembra.

Fermentador de siembra.

5 El medio fermentador de siembra contenía:

Hidrolizado de caseína	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
Antiespumante (PPG)	0,4 ml/l
Glucosa	~50 g/l

y de forma opcional:

Solución de elementos traza	0,83 ml/l
-----------------------------	-----------

1 l de solución de elementos traza consistía en:

MnSO ₄ ·H ₂ O	1 g/l
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,78 g/l
CoCl ₂ 6H ₂ O	2 g/l
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	3 g/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	1,85 g/l
H ₃ BO ₃	0,5 g/l
HCl al 32%	100 ml

10 Se inoculó el fermentador de siembra (150 ml) con cultivo de siembra y tuvo lugar la fermentación a aproximadamente 30° C, pH 7. Se mantuvieron los niveles de oxígeno disuelto usando procedimientos bien conocidos por el especialista en la técnica y cuando la D.O. del cultivo estaba por encima de 12, se transfirieron los contenidos del fermentador de siembra, ~120 l, al fermentador de producción de 1500 l.

Fermentador de producción

El medio de producción contenía:

Hidrolizado de caseína	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
Antiespumante (PPG)	0,4 ml/l
Glucosa	~13 g/l

y de forma opcional:

Solución de elementos traza	0,83 ml/l
-----------------------------	-----------

traza

- 5 Se añadió solución de glucosa al 50% durante la fase de producción. La temperatura del fermentador era de aproximadamente 30° C, el pH se mantuvo a aproximadamente 7 con amoníaco y los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron usando procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica. A OD 13-16, se indujo la producción de hGH mediante aumento de la temperatura de fermentación de aproximadamente 30° C a aproximadamente 42° C y la fermentación tuvo lugar durante las siguientes ~2 horas.

Cosecha

Se cosecharon células bacterianas conteniendo hGH mediante microfiltración con fibra hueca. El caldo de fermentación, ~1200 l, se concentró y dializó frente a agua purificada (PuW). Se almacenó la suspensión de -10° C a -30° C.

10 **Recuperación y purificación de hGH**

- 15 Se rompe la suspensión de células cosechadas y se lava en PuW dando lugar a cuerpos de inclusión que comprenden hGH. Se disolvieron los cuerpos de inclusión mediante aumento del pH hasta 12,0 ± 0,1 mediante adición de NaOH 1 N con agitación. Se replegó hGH reduciendo el pH hasta 10,5 ± 0,1 y añadiendo borato 0,5 M a pH 9,0 hasta una concentración final de borato de 10 mM. No se usaron ni agentes de reducción ni agentes caotrópicos en la disolución de los cuerpos de inclusión.

Se purificó luego hGH mediante procedimientos conocidos en la técnica incluyendo una serie de etapas de ultrafiltración y de cromatografía. Se usó aminopeptidasa, la enzima de eliminación de metionina N-terminal durante el procedimiento para eliminar la metionina N-terminal de Met-hGH. La hGH purificada se liofilizó finalmente.

EJEMPLO 2 - Análisis comparativo de hGH producido con y sin elementos traza

- 20 Se produjeron once (11) preparaciones de hGH de acuerdo con el ejemplo 1 con la excepción de que los elementos traza (TE) no se añadieron al medio fermentador de siembra ni al medio de producción.

Se produjeron veintitrés (23) preparaciones de hGH de acuerdo con el ejemplo 1 donde se añadieron TE al medio fermentador de siembra y al medio de producción.

- 25 La tabla 1 demuestra que preparaciones liofilizadas que resultan de la fermentación que contiene elementos traza tenían una cantidad mucho menor de formas poliméricas de hGH. La cantidad de formas poliméricas de hGH se presenta como el porcentaje relativo del área de pico total que corresponde a todos los picos en la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) analítica usada en el análisis. Se llevó a cabo el procedimiento de SEC de acuerdo con la monografía de somatropina en la Farmacopea Europea 6ª edición 2010.

Tabla 1

Preparación	Solución de elementos traza	Formas poliméricas de hGH
I	-	1,4
II	-	1,9
III	-	1,3
IV	-	1,7
V	-	2,0
VI	-	1,8
VII	-	1,9
VIII	-	3,0
IX	-	1,6
X	-	1,3

Preparación	Solución de elementos traza	Formas poliméricas de hGH
XI	-	1,3
XII	+	0,7
XIII	+	0,6
XIV	+	0,8
XV	+	0,7
XVI	+	0,6
XVII	+	0,9
XVIII	+	0,8
XIX	+	0,5
XX	+	1,0
XXI	+	0,7
XXII	+	0,9
XXIII	+	0,8
XXIV	+	0,7
XXV	+	0,8
XXVI	+	0,9
XXVII	+	0,8
XXVIII	+	0,9
XXIX	+	0,9
XXX	+	0,7
XXXI	+	0,7
XXXII	+	0,8
XXXIII	+	0,8
XXXIV	+	0,8

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de hormona del crecimiento humana (hGH) que comprende:

- (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana;
- (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGH disuelta;

caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprende los elementos traza en las siguientes concentraciones:

Manganeso	4,9 μ M
Cinc	8,0 μ M
Cobalto	7,0 μ M
Molibdeno	6,9 μ M
Calcio	16,9 μ M
Cobre	6,1 μ M
Boro	6,7 μ M

en base al volumen total del medio de cultivo.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los elementos traza se añaden al medio de cultivo en forma de una solución de elementos traza.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la solución de elementos traza comprende 1 g/l de sulfato de manganeso monohidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende aproximadamente 2,8 g/l de sulfato de cinc heptahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 2 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 2 g/l de molibdato de sodio deshidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 3 g/l de cloruro de calcio deshidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 1,85 g/l de sulfato de cobre pentahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 0,5 g/l de ácido bórico.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la solución de elementos traza comprende 1 g/l de sulfato de manganeso monohidratado, 2,78 g/l de sulfato de cinc heptahidratado, 2 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado, 2 g/l de molibdato de sodio dihidratado, 3 g/l de cloruro de calcio dihidratado, 1,85 g/l de sulfato de cobre pentahidratado y 0,5 g/l de ácido bórico.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el pH alcalino es de aproximadamente 10 a aproximadamente 12,5.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el pH alcalino es aproximadamente 12.

8. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1 en el que la etapa (ii) no implica el uso de agentes reductores y agentes caotrópicos.

9. Un procedimiento para la reducción de la cantidad de formas poliméricas de hormona del crecimiento humana formadas durante un procedimiento para la producción de hormona del crecimiento humana (hGH) que comprende:

- (i) hacer que realicen fermentación células de *E. coli* que producen hormona del crecimiento humana;
- (ii) recuperar los cuerpos de inclusión a partir de las células de *E. coli* y disolver los cuerpos de inclusión recuperados a un pH alcalino para proporcionar hGH disuelta;
- (iii) de forma opcional liofilizar la hGH disuelta;

caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende

manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, calcio, cobre y boro como elementos traza.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medio de cultivo comprende los elementos traza en las siguientes concentraciones:

Manganeso	4,9 μM
Cinc	8,0 μM
Cobalto	7,0 μM
Molibdeno	6,9 μM
Calcio	16,9 μM
Cobre	6,1 μM
Boro	6,7 μM

en base al volumen total del medio de cultivo.

- 5 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los elementos traza se añaden al medio de cultivo en forma de una solución de elementos traza.
- 10 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la solución de elementos traza comprende 1 g/l de sulfato de manganeso monohidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende aproximadamente 2,8 g/l de sulfato de cinc heptahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 2 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 2 g/l de molibdato de sodio deshidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 3 g/l de cloruro de calcio deshidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 1,85 g/l de sulfato de cobre pentahidratado y/o en el que la solución de elementos traza comprende 0,5 g/l de ácido bórico.
- 15 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la solución de elementos traza comprende 1 g/l de sulfato de manganeso monohidratado, 2,78 g/l de sulfato de cinc heptahidratado, 2 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado, 2 g/l de molibdato de sodio dihidratado, 3 g/l de cloruro de calcio dihidratado, 1,85 g/l de sulfato de cobre pentahidratado y 0,5 g/l de ácido bórico.
- 20 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el pH alcalino es de aproximadamente 10 a aproximadamente 12,5, por ejemplo en el que el pH alcalino es aproximadamente 12.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la etapa (ii) no implica el uso de agentes reductores y agentes caotrópicos.