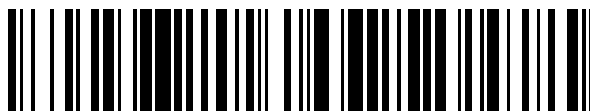


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 924**

51 Int. Cl.:

C07K 14/565 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2005 PCT/EP2005/054220**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2007 WO07022799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2005 E 05784517 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 1917276**

54 Título: **Procedimiento para la preparación del interferón beta glicosilado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2018

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, DINA;
BERNARD, ALAIN;
DUCOMMUN, PAUL y
ROSSI, MARA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 664 924 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 para la preparación del interferón beta glicosilado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para producir el interferón beta humano recombinante en condiciones de cultivo sin suero.

Antecedentes de la invención

Las proteínas se han vuelto comercialmente importantes como medicamentos, también denominados generalmente "agentes biológicos". Uno de los mayores desafíos es el desarrollo de procedimientos rentables y eficientes para la producción de proteínas recombinantes a escala comercial.

10 La industria de la biotecnología hace un uso extensivo de células de mamíferos para la fabricación de glicoproteínas recombinantes para terapia humana.

Las células adecuadas que se usan ampliamente para la producción de polipéptidos han resultado ser las células de ovario de hámster chino (CHO).

15 Las células CHO fueron cultivadas por primera vez por Puck (1958) a partir de una biopsia de un ovario de una hámster chino hembra. A partir de estas células originales, se prepararon varias sublíneas con diversas características. Una de estas líneas celulares CHO, la CHO-K1, requiere prolina y es diploide para el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Otra línea celular derivada de esta línea celular es una línea celular CHO deficiente en DHFR (CHO DUK B11) (PNAS 77, 1980, 4216-4220), que se caracteriza por la pérdida de la función DHFR como consecuencia de una mutación en un gen DHFR y la posterior pérdida del otro gen.

20 Otras células que se usan frecuentemente para la producción de proteínas destinadas a la administración a humanos son líneas celulares humanas tales como la línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 o la línea celular de riñón embrionario humano 293, una línea celular derivada de retinoblastos embrionarios humanos tal como p. ej. PER.C6, una línea de células derivadas de células amnióticas o una línea celular derivada de neuronas.

25 Las células de una línea celular adecuada se transfectan de forma estable con un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de la proteína de interés a producir, junto con secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores o señales poliA que aseguran la expresión estable y correcta de la proteína de interés. Otros genes habitualmente presentes en vectores de expresión son genes marcadores tales como, p. ej., marcadores de selecciones positivas (por ejemplo, el gen neo) que selecciona las células transfectadas de forma estable de las células no transfectadas y transfectadas transitoriamente. Los genes amplificables, tales como el gen DHFR, se usan para la amplificación de las secuencias codificantes.

30 Una vez que se ha establecido un clon que expresa la proteína de interés, se debe establecer un proceso de fabricación a partir de este clon que permita la producción en altas cantidades y una calidad tal como se requiere para las proteínas destinadas a la administración humana.

35 Dichos procesos de fabricación generalmente se llevan a cabo en biorreactores. Hay diferentes modos de operación. En la actualidad, los cultivos alimentados y los cultivos de perfusión son los dos modos dominantes de operación industrial para los procesos de cultivo de células de mamíferos que requieren gran cantidad de proteínas (Hu and Aunins 1997). Cualquiera que sea la tecnología de producción de preferencia, los esfuerzos de desarrollo apuntan a obtener procesos de producción que garanticen una alta productividad volumétrica, consistencia de lote a lote y una calidad de producto homogénea a bajo costo.

40 La decisión entre el modo por lotes alimentados o el modo de producción por perfusión está dictada principalmente por la biología del clon y las propiedades del producto, y se realiza caso por caso durante el desarrollo del nuevo producto farmacológico (Kadouri and Spier 1997).

45 Cuando se selecciona el procedimiento de perfusión, uno de los sistemas de cultivo de elección es el biorreactor de lecho empacado estacionario en el que las células se inmovilizan en vehículos sólidos. Este sistema es fácil de operar y, con transportadores y condiciones de cultivo apropiadas, se puede lograr una densidad celular muy alta (de $\sim 10^7$ - 10^8 células·ml⁻¹).

50 Una consecuencia de esta alta densidad celular es la necesidad de que debe usarse una tasa de perfusión media intensiva (alimentación y cosecha) para mantener las células viables y productivas. Parece que la tasa de perfusión es uno de los parámetros centrales de dicho proceso: impulsa la productividad volumétrica de la proteína, la calidad del producto proteico y tiene un impacto muy fuerte en la economía general del proceso.

Para el proceso de cultivo celular, en el pasado, los medios de cultivo se suplementaban 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 transportadoras,

factores de unión y diseminación, nutrientes, oligoelementos, etc. Los medios de cultivo generalmente contenían hasta aproximadamente 10% de suero animal, tal como suero bovino fetal (FBS), también llamado suero de ternera fetal (FCS).

5 Aunque sea ampliamente utilizado, el suero tiene muchas limitaciones. Contiene altos niveles de numerosas proteínas que interfieren con las cantidades limitadas de la proteína deseada de interés producida por las células. Estas proteínas derivadas del suero deben separarse del producto durante los procesamientos posteriores, tales como la purificación de la proteína de interés, lo que complica el proceso y aumenta los costes.

10 El advenimiento de la BSE (Encefalopatía Espongiforme Bovina), una enfermedad neurodegenerativa transmisible del ganado con un largo período de latencia o incubación, ha planteado problemas regulatorios sobre el uso de sueros derivados de animales en la producción de productos biológicamente activos.

Por lo tanto, existe una gran demanda para el desarrollo de medios de cultivo celular alternativos libres de fuentes animales que apoyen el crecimiento celular y mantengan las células durante la producción de productos biológicamente activos.

15 Generalmente, los medios de cultivo celular comprenden muchos componentes de diferentes categorías, tales 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 usarse 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.

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

25 • Sales: Por ejemplo, el documento US 6.399.381 (Blum et al.) describe un medio que comprende CaCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl , fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico, selenito sódico, CuSO_4 , ZnCl_2 . Otro ejemplo para un documento que describe las sales inorgánicas que pueden usarse en un medio de cultivo es el documento 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 .

30 • Ácidos grasos: Los ácidos grasos que se sabe que se usan en los medios son ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, así como metil-beta-ciclodextrina, véase p. ej. el documento US 5.045.468 (Darfler). Debe observarse que la ciclodextrina no es un lípido per se, pero tiene la capacidad de formar un complejo con lípidos y, por lo tanto, se usa para solubilizar lípidos en el medio de cultivo celular.

35 • Otros componentes, en particular los usados en el marco de los medios de cultivo de células libres de suero, son compuestos tales como glucosa, glutamina, Na-piruvato, insulina o etanolamina (p. ej. el documento EP 274 445), o un agente protector tal como Pluronic F68. Pluronic® F68 (también conocido como Poloxamer 188) es un copolímero de bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO).

La solicitud de patente europea EP 1 482 031 A describe un medio libre de suero que comprende HEPES, prolina y cloruro de sodio. Sin embargo, nunca se ha descrito o sugerido aplicar el medio para cultivar ninguna célula productora del interferón beta humano.

40 Los "medios básicos" estándar también son conocidos por las personas expertas en la técnica. Estos medios ya contienen varios de los componentes medios mencionados anteriormente. Ejemplos de tales medios que se aplican ampliamente son el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), el Medio del Instituto Memorial Roswell Park (RPMI) o el medio de Ham.

45 Después de la producción de la proteína de interés en el biorreactor, la proteína de interés necesita ser purificada de la cosecha del cultivo celular. La cosecha del cultivo celular puede ser, p. ej. extractos celulares para proteínas intracelulares, o sobrenadante de cultivo celular para proteínas secretadas.

Si bien en la actualidad hay muchos métodos disponibles para la preparación de proteínas a gran escala, los productos crudos, tales como la cosecha de cultivos celulares, contienen no solo el producto deseado sino también impurezas que son difíciles de separar del producto deseado.

50 Las autoridades sanitarias requieren altos niveles de pureza para las proteínas destinadas a la administración humana. Como una dificultad adicional, muchos métodos de purificación pueden contener etapas que requieren la aplicación de pH bajo o alto, altas concentraciones de sal u otras condiciones extremas que pueden poner en peligro la actividad biológica de una proteína dada. Por lo tanto, para cualquier proteína es un desafío establecer un proceso de purificación que permita una pureza suficiente mientras se retiene la actividad biológica de la proteína.

Los sistemas cromatográficos de intercambio iónico se han utilizado ampliamente para la separación de proteínas principalmente sobre la base de las diferencias de carga. En la cromatografía de intercambio iónico, los parches cargados en la superficie del soluto son atraídos por cargas opuestas unidas a una matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución generalmente se consigue aumentando la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y, por lo tanto, alterar la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o paso a paso (elución en pasos). Las resinas que se pueden usar en la cromatografía de intercambio iónico pueden contener diferentes grupos funcionales: dietilaminoetilo (DEAE) o dietil-(2-hidroxipropil)aminoetilo (QAE) tienen cloruro como contraión, mientras que carboximetilo (CM) y sulfopropilo (SP) tienen sodio como contraión, por ejemplo.

Los sistemas cromatográficos que tienen una fase estacionaria hidrofóbica ofrecen una base alternativa para las separaciones y también se han empleado ampliamente en la purificación de proteínas. Se incluyen en esta categoría la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y la cromatografía líquida de fase inversa (RPLC). La base fisicoquímica para la separación por HIC y RPLC es el efecto hidrofóbico, las proteínas se separan en una fase estacionaria hidrofóbica en base a las diferencias en la hidrofobicidad.

La cromatografía de fase inversa es un método de purificación de proteínas estrechamente relacionado con HIC, ya que ambos se basan en las interacciones entre grupos no polares accesibles a disolventes en la superficie de biomoléculas y ligandos hidrófobos de la matriz. Sin embargo, los ligandos utilizados en la cromatografía de fase inversa están más altamente sustituidos con ligandos hidrófobos que los ligandos de HIC. Si bien el grado de sustitución de los adsorbentes de HIC puede estar en el intervalo de 10-50 $\mu\text{moles/ml}$ de matriz de ligandos de arilo C2-C8, varios cientos de $\mu\text{mol/ml}$ de matriz de ligandos de alquilo C4-C8 son generalmente usados para adsorbentes de cromatografía de fase inversa.

La columna Source 30RPC es una matriz de fase inversa polimérica. Está basada en perlas de poliestireno/divinilbenceno de 30 micras de diámetro rígidas y monodimensionadas. Sus características se pueden resumir de la siguiente manera: intervalo de pH excepcionalmente amplio (1-12), alta selectividad, alta resistencia química, alta capacidad y alta resolución a altas velocidades de flujo.

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), también llamada cromatografía de permeación en gel (GPC), utiliza partículas porosas para separar moléculas de diferentes tamaños. Generalmente se usa para separar moléculas biológicas y para determinar pesos moleculares y distribuciones de peso molecular de polímeros. Las moléculas que son más pequeñas que el tamaño de poro pueden entrar en las partículas y, por lo tanto, tienen una ruta más larga y un tiempo de tránsito más largo que las moléculas más grandes que no pueden entrar en las partículas. Todas las moléculas más grandes que el tamaño de poro no se retienen y se eluyen juntas. Las moléculas que pueden entrar en los poros tendrán un tiempo de residencia promedio en las partículas que depende del tamaño y la forma de las moléculas. Por lo tanto, diferentes moléculas tienen diferentes tiempos totales de tránsito a través de la columna.

Blue Sepharose es una resina de cromatografía basada en una matriz de afinidad de colorante-ligando. El ligando, Cibacron Blue F3G-A, se acopla covalentemente a Sepharose™ a través del anillo de clorotriazina (Clonis et al., 1987).

Blue Sepharose se ha usado para la purificación del interferón beta (Mory et al., 1981).

El interferón beta (interferón- β o IFN- β) es una glicoproteína soluble natural que pertenece a la clase de las citoquinas, los interferones (IFN) tienen una amplia gama de actividades biológicas, tales como propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras.

Los tres principales interferones se denominan IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma. Estos interferones se clasificaron inicialmente según sus células de origen (leucocitos, fibroblastos o células T). Sin embargo, se hizo evidente que varios tipos podrían ser producidos por una célula. Por lo tanto, el interferón leucocitario ahora se llama IFN-alfa, el interferón de fibroblastos es IFN-beta y el interferón de células T es IFN-gamma. También hay un cuarto tipo de interferón, IFN linfoblastoide, producido en la línea celular "Namalwa" (derivada del linfoma de Burkitt), que parece producir una mezcla de IFN tanto de leucocitos como de fibroblastos.

El interferón de fibroblastos humanos (IFN-beta) tiene actividad antiviral y también se conoce por inhibir la proliferación de las células. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARN de doble cadena. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen del interferón de fibroblastos, clonado mediante tecnología de ADN recombinante, Derynck et al., 1980 dedujeron la secuencia de aminoácidos completa de la proteína, que tiene una longitud de 166 aminoácidos.

El interferón- β también ha sido clonado. La Patente de Estados Unidos N° 5.326.859 describe la secuencia de ADN de IFN- β humano y un plásmido para su expresión recombinante en bacterias tales como *E. coli*. La patente europea No. 0 287 075 describe una línea celular de CHO (ovario de hámster chino), transfectada con la secuencia codificante del interferón- β y capaz de producir un interferón- β recombinante. La proteína se describe como glicosilada con un oligosacárido biantenarico (bi-ramificado), que presenta un único resto de fucosa.

El interferón beta se ha expresado en varias líneas celulares, tales como células CHO, BHK 21 (células de riñón de hámster bebé) y células LTK (L-timidina quinasa de ratón negativas) (Reiser and Hauser, 1987). También se han usado células CHO negativas para DHFR para la expresión del interferón beta (Innis and McCormick, 1982), (ChernaJovsky et al., 1984).

5 Rodriguez et al., *Biotechnol. Prog.* 2005, 21:22-30 describen un estudio que investiga los efectos de varios compuestos químicos en la producción de IFN- β . En este contexto, se describe que al disminuir la temperatura de cultivo de 37°C a 30°C, la agregación de proteínas disminuye y se potencia la producción volumétrica y específica de IFN- β .

10 Han Kyu Oh et al., *Biotechnol. Prog.* 2005, 21:1154-1164 describen la producción de IFN- β humano recombinante. Para aumentar la productividad, las células se cultivan a 33°C. La temperatura se reduce directamente de 37°C durante la fase de crecimiento a 33°C para la fase de producción. No hay una fase de crecimiento intermedio.

15 Al-Fageeh et al., *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, No. 5, 5 de abril de 2006, describen el efecto del cultivo de temperatura subfisiológica sobre la productividad de las proteínas recombinantes en general. Los autores afirman que se observa una mayor producción de proteína recombinante en un cultivo a temperatura reducida. La explicación mecánica para este efecto se ve en la transcripción mejorada del gen recombinante de interés o en el aumento de la estabilidad del ARNm de estos transcritos. Sin embargo, se considera que el efecto de la temperatura depende de la línea celular y de la proteína diana particular.

20 Se sabe que los interferones están glucosilados, a menudo con diferentes glicoformas. Por ejemplo, se demostró que la estructura de sacárido de IFN- β incluye una estructura bi-antena, que presenta un único sacárido de fucosa y una sialilación de galactosa terminal (Conradt et al., 1987). Se demostró que la glucosilación también es importante para la solubilidad, ya que el IFN- β precipitaba después de la desglucosilación con glicopeptidasa F. Además, el IFN- β producido por *E. coli* mostró problemas de plegamiento, debido a la falta de glucosilación en el sistema de expresión bacteriano.

25 La patente europea No. 0 529 300 describe un interferón- β recombinante que tiene un patrón de glicosilación específico, concretamente de glicosilación con estructuras de carbohidratos que presentan una fucosa por unidad de oligosacárido. Estas estructuras de carbohidratos son oligosacáridos biantenarios, triantenarios y tetraantenarios (bi-, tri- y tetra-ramificados, respectivamente).

30 La Solicitud PCT No. WO 99/15193 también describe la glicosilación del interferón- β recombinante que presenta oligosacáridos biantenarios, triantenarios y tetraantenarios. Los monosacáridos constituyentes incluyen manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico.

Diversos estudios han demostrado la importancia de la glicosilación para la estabilidad. Por ejemplo, se demostró que las formas no glucosiladas del interferón- β recombinante tienen una estabilidad significativamente menor y también una actividad biológica más baja (Runkel et al., 1998).

35 Otros estudios han demostrado que las proteínas recombinantes y naturales del interferón- β humano tienen diferentes patrones de glicosilación (Kagawa et al., 1988).

El interferón beta se usa como un fármaco proteico terapéutico, llamado biológico, en varias enfermedades, tales como, p. ej., la esclerosis múltiple, el cáncer o enfermedades virales, tales como, p. ej., SARS o infecciones por el virus de hepatitis C.

40 Por lo tanto, existe una necesidad de procesos para la producción y purificación eficiente de interferón beta y de células que expresen interferón beta en grandes cantidades.

Sumario de la presente invención

La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento para producir el interferón beta humano recombinante en un medio exento de suero.

45 Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación del interferón- β , que comprende una etapa de cultivar una célula CHO productora de interferón- β en un medio libre de suero, comprendiendo el medio libre de suero:

- de 10 a 30 mM de HEPES, preferiblemente 20 mM de HEPES;
- de 0,5 a 3 mM de Prolina, preferiblemente 1 mM de Prolina; y
- de 5500 a 7000 mg/l de cloruro de sodio, preferiblemente 6100 mg/l

50 de cloruro de sodio, en donde el procedimiento comprende una fase de crecimiento I, una fase de crecimiento II y una fase de producción, en donde la fase de crecimiento I se lleva a cabo a 37°C, la fase de crecimiento II se lleva a cabo a 35°C, y la fase de producción se lleva a cabo a 33°C y en el que la fase de crecimiento II tarda 1-2 días.

La presente invención se basa además en un procedimiento para purificar el interferón beta recombinante a partir de un fluido, en particular de la cosecha de cultivos celulares derivada de células que producen interferón beta.

El procedimiento para la purificación de interferón humano recombinante a partir de un fluido, que comprende las etapas de:

- 5
- Someter el fluido a cromatografía de afinidad;
 - Someter el eluato de la cromatografía de afinidad a la cromatografía de intercambio catiónico;
 - Someter el eluato de la cromatografía de intercambio catiónico a cromatografía hidrófoba mediante RP-HPLC.

10 El análisis del interferón beta producido por el procedimiento de la invención reveló que es una composición de interferón beta glicosilado diferencialmente, es decir, un interferón beta que tiene un patrón o perfil de glicosilación único. Por lo tanto, el presente documento también describe

una composición de interferón beta que comprende una estructura de oligosacárido que comprende dos o tres sacáridos de fucosa.

15 Usos del interferón-β humano recombinante producido según los procedimientos de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores, esclerosis múltiple, infecciones virales y usos del medio de cultivo celular libre de suero

para la producción de interferón beta, son también descritos en la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

20 FIG. 1 muestra un diagrama de flujo del método utilizado para generar una línea celular productora de interferón beta.

FIG. 2 muestra un diagrama de flujo del nuevo procedimiento de purificación de IFN-β-1a.

FIG. 3 muestra los espectros transformados de ES-MS de lotes de IFN-β-1a en los que se muestra un dibujo esquemático de la estructura de los oligosacáridos en la parte superior.

25 FIG. 4 muestra el espectro transformado de ES-MS de IFN-β-1a obtenido mediante el nuevo procedimiento en el que:

P= proteína (IFN-β);

Fuc Biant = oligosacárido de complejo biantenario fucosilado;

Fuc Triant = oligosacárido de tipo complejo triantenario fucosilado;

Fuc Tetrant = oligosacárido de tipo complejo tetrantenario fucosilado;

30 SA = ácido siálico.

FIG. 5 muestra estructuras de oligosacáridos en IFN-β-1a; en donde:

Fig5 A muestra los principales oligosacáridos:

I. Biantenario disializado (NeuAc₂.Hex₅.HexNAC₄.Fuc)

II. Biantenario monosializado (NeuAc.Hex₅.HexNAC₄.Fuc)

35 Fig. 5 B muestra los oligosacáridos menores, en los que:

I. Biantenario no sializado (Hex₅.HexNAC₄.Fuc)

II. Estructura triantenaria mono o disializada o biantenario disializado con estructura de repetición de N-acetil-lactosamina (NeuAc₂.Hex₆.HexNAC₅.Fuc)

40 III. Triantenario trisializado con estructura repetida de N-acetil-lactosamina o estructura tetraantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₇.HexNAC₆.Fuc)

Fig. 5 C muestra los oligosacáridos menores con dos o tres residuos de Fucosa:

I. Estructura biantenaria de monosialilo con dos Fucosas

(NeuAc.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂)

II. Estructura biantenaria disializada con dos Fucosas

(NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂)

III. Estructura biantenaria disializada con tres Fucosas

5 (NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃)

FIG. 6 muestra el espectro MALDI del nuevo IFN-β-1a con glicanos permetilados.

Descripción detallada de la invención

10 El primer aspecto de la presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento para la producción de interferón beta en condiciones de cultivo de células libres de suero. De acuerdo con la presente invención, el procedimiento para la fabricación de interferón beta recombinante glicosilado comprende una etapa de cultivo de una célula productora de interferón beta en un medio exento de suero, comprendiendo el medio libre de suero:

- de 10 a 30 mM de HEPES, preferiblemente 20 mM de HEPES;
- de 0,5 a 3 mM de prolina, preferiblemente, 1 mM de prolina; y
- de 5500 a 7000 mg/l de cloruro de sodio, preferiblemente 6100 mg/l

15 de cloruro de sodio, en donde el procedimiento comprende una fase de crecimiento I, una fase de crecimiento II y una fase de producción, en donde la fase de crecimiento I se lleva a cabo a 37°C, la fase de crecimiento II se lleva a cabo a 35°C , y la fase de producción se lleva a cabo a 33°C y en el que la fase de crecimiento II tarda 1-2 días.

20 El medio libre de suero puede, p. ej., comprender 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 mM de tampón HEPES (ÁCIDO 2-(4-(2-HIDROXIETIL)-1-PIPERAZINIL)ETANOSULFÓNICO). También puede comprender, por ejemplo, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8 , 2,9, 3, 3,1 mM de Prolina.

Las concentraciones de cloruro de sodio en el medio exento de suero de la invención pueden ser, p. ej., aproximadamente 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100 mg/L.

25 En una realización preferida, el medio libre de suero comprende además de aproximadamente 10 a aproximadamente 20, preferiblemente aproximadamente 15 mg/l de rojo de fenol. La concentración de rojo de fenol puede ser, p. ej., 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 mg/L.

30 En el marco del procedimiento de la presente invención, los componentes identificados anteriormente se pueden usar en cualquier medio adecuado conocido, libre de suero. Ejemplos de tales medios sin suero se enumeran a continuación:

| Medio | Fabricante | Cat. No. |
|--------------|------------|-------------|
| EX-CELL 302 | JRH | 14312-1000M |
| EX-CELL 325 | JRH | 14335-1000M |
| CHO-CD3 | Sigma | C-1490 |
| CHO III PFM | Gibco | 96-0334SA |
| CHO-S-SFM II | Gibco | 12052-098 |
| CHO-DHFR | Sigma | C-8862 |
| ProCHO 5 | Cambrex | BE12-766Q |
| SFM4CHO | HyClone | SH30549.01 |

| Medio | Fabricante | Cat. No. |
|-------------|-------------------|------------|
| Ultra CHO | Cambrex | 12-724Q |
| HyQ PF CHO | HyClone | SH30220.01 |
| HyQ SFX CHO | HyClone | SH30187.01 |
| HyQ CDM4CHO | HyClone | SH30558.01 |
| IS CHO-CD | Irvine Scientific | #91119 |
| IS CHO-V | Irvine Scientific | #9197 |

La célula a usar en el procedimiento de la invención es un clon de CHO que expresa el interferón beta tal como p. ej., la línea celular descrita por Reiser y Hauser (1987) o las células descritas por Innis and McCormick (1982).

5 La expresión "interferón beta", como se usa en este documento, también se denomina IFN beta o IFN- β , e incluye interferón beta derivado de cualquier especie y preferiblemente interferón beta humano, una glicoproteína de 166 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 22.500 daltons. La expresión "interferón beta", como se usa en el presente documento, también abarca derivados funcionales, muteínas, análogos o fragmentos de IFN-beta. La expresión "interferón beta 1 a" se refiere al interferón beta glicosilado.

10 La actividad del interferón beta puede, p. ej., medirse utilizando un estándar de referencia calibrado contra el estándar natural del interferón beta de la Organización Mundial de la Salud (Segundo Estándar Internacional para el interferón, fibroblasto humano GB 23 902 531). La unidad se expresa en unidades internacionales (UI) de actividad antiviral por mg del interferón beta-1a determinado en un bioensayo de efecto citopático in vitro utilizando células WISH y el virus de la Estomatitis Vesicular.

Tabla de conversión para MIU y meg de IFN-beta

| | | | | |
|------------|----|----|----|----|
| MIU | 3 | 12 | 18 | 24 |
| meg | 11 | 44 | 66 | 88 |

15 "Variantes" o "muteínas", como se usan en el marco de la presente invención, se refieren a análogos de IFN-beta, en los que uno o más de los residuos de aminoácidos del IFN-beta natural se reemplazan por diferentes residuos de aminoácidos, o se eliminan, o se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia natural IFN-beta, sin disminuir considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el IFN-beta de tipo silvestre. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ellas.

20 Los términos "variante" o "muteína" de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN que codifica IFN-beta como se describe, p. ej. en el documento US 4.738.931 bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación y las condiciones de lavado posteriores, que los expertos en la técnica denominan convencionalmente "rigurosas". Véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la Tm calculada del híbrido en estudio en, por ejemplo, 2 x SSC y 0.5% SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y luego, un 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos habituales en esta técnica entienden que las condiciones de rigurosidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o las sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametil amonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

35 La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinadas comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan.

Para secuencias donde no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que se van a comparar están alineadas para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "huecos" en una o ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Se puede determinar un % de identidad en toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma o muy similar longitud, o en longitudes más cortas y definidas (denominadas alineaciones locales), que son más adecuadas para las 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, los programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J et al., 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S F et al, 1990, Altschul S F et al, 1997, accesibles a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990).

Cualquiera de tales variantes o muteínas preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada de la de IFN-beta, tal como para tener una actividad sustancialmente similar a IFN-beta. Un ensayo funcional para evaluar si cualquier variante o muteína tiene una actividad similar a IFN-beta es, p. ej., el ensayo que mide la actividad del interferón sobre el efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular en células WISH, p. ej., el descrito por Youcefi et al., 1985. Por lo tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que IFN-beta por medio de experimentación rutinaria.

Cualquier variante o muteína de este tipo puede tener al menos 40% de identidad u homología con la secuencia de IFN-beta como se describe, p. ej., en el documento US 4.738.931. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología con la misma.

Las muteínas de IFN-beta, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico que codifica para las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse rutinariamente por cualquier experto en la técnica, sin excesiva experimentación, según las enseñanzas y la orientación presentadas en este documento.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos de IFN-beta pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de modo que la sustitución entre los miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos también pueden realizarse en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones solo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan o desplazan los aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, los residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones entran dentro del alcance de la presente invención.

Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de IFN-beta para su uso en la presente invención incluyen cualquier etapa de método conocida, tal como la presentada en las patentes estadounidenses 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al; 5.116.943 de Koths et al., 4.965.195 de Namen et al; 4.879.111 de Chong et al; y 5.017.691 de Lee et al; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de Estados Unidos No. 4.904.584 (Shaw et al).

Un tipo especial de variante de interferón se ha descrito recientemente. Los llamados "interferones de consenso" son variantes de IFN no naturales (documento US 6.013.253). Los interferones de consenso también se pueden producir de acuerdo con la invención.

"Derivados funcionales" de IFN-beta, como se usa en la presente memoria, cubre derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales en los residuos o los grupos N o C terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención siempre que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad biológica de las proteínas como se describió anteriormente, es decir, la capacidad de unirse al receptor correspondiente e iniciar la señalización del receptor, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que lo contienen. Los derivados pueden tener restos químicos, tales como carbohidratos o residuos de fosfato, siempre que tal derivado conserve la actividad biológica de la proteína y permanezca farmacéuticamente aceptable.

Los derivados del interferón beta pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden mejorar otras propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la vida media, la biodisponibilidad, la tolerancia del cuerpo humano o la inmunogenicidad. Para lograr este objetivo, IFN-beta puede estar unido, p. ej. al

polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo. En particular, el PEG-IFN puede prepararse de acuerdo con las enseñanzas del documento WO 99/55377.

5 Un derivado funcional de IFN-beta puede comprender al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que se producen como una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos. Una realización en la que el resto es un resto de polietilenglicol (PEG) es muy preferida. De acuerdo con la presente invención, varios restos de PEG también pueden unirse al IFN-beta.

10 Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los restos de aminoácidos formados por restos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

15 Un "fragmento" de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier subconjunto de IFN-beta, es decir, un péptido más corto, que retiene la actividad biológica deseada como mensurable, p. ej. en el bioensayo descrito anteriormente. Los fragmentos pueden prepararse fácilmente eliminando aminoácidos de cada extremo de la molécula y probando sus propiedades como agonista del receptor. Las proteasas para eliminar un aminoácido a la vez del terminal N o del terminal C de un polipéptido son conocidas, por lo que los fragmentos determinantes, que retienen la actividad biológica deseada, se pueden determinar p. ej., en la prueba descrita por Youcefi et al., 1985, e implica solo experimentación rutinaria.

20 El procedimiento para la producción de interferón beta de la invención comprende una fase de crecimiento I, una fase de crecimiento II y una fase de producción, en donde la fase de crecimiento I se lleva a cabo a

37 °C, la fase de crecimiento II se lleva a cabo a 35 °C, y la fase de producción se lleva a cabo a 33 °C.

25 La determinación del final de las fases está dentro del conocimiento de la persona experta en la técnica y se determina p. ej. sobre la base de la densidad celular, el consumo de glucosa o cualquier otra indicación metabólica. En general, la fase de crecimiento I puede ser, p. ej. de 10 a 12 días. La fase de crecimiento II es generalmente más corta y sirve principalmente para adaptar las células a una temperatura más baja. De acuerdo con la invención, la fase de crecimiento II lleva de 1 a 2 días.

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo como un lote alimentado o un procedimiento de perfusión. De acuerdo con la presente invención, se prefiere la perfusión.

30 Preferiblemente, el procedimiento es un procedimiento de perfusión con una tasa de dilución que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 7 por día.

35 La expresión "tasa de dilución", como se define en este documento, se refiere a la tasa de dilución D, calculada como litro de medio por litro de volumen total de trabajo del sistema por día (volumen total = volumen de lecho fijo + volumen del tanque de acondicionamiento). De acuerdo con la presente invención, la velocidad de dilución puede estar en un intervalo de, por ej. 0,5, 1, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5,4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10, 5.

Más preferiblemente, la velocidad de dilución aumenta dentro de las primeras dos a tres semanas de cultivo celular desde un valor inicial de aproximadamente 1 a 2 por día hasta un valor de aproximadamente 7 a 10 por día, particularmente durante la fase de producción.

40 La etapa de cultivo del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en cualquier entorno adecuado, tal como placas de Petri, matraces T o frascos rotatorios, pero preferiblemente en recipientes que tienen mayores volúmenes tales como p. ej. un biorreactor.

45 Cuando la selección es un procedimiento de perfusión, el sistema puede ser, p. ej., un biorreactor de lecho fijo estacionario en el que las células se inmovilizan en vehículos sólidos. Este sistema es fácil de operar y con vehículos apropiados y condiciones de cultivo se puede lograr una densidad celular muy alta (de $\sim 10^7$ - 10^8 células·ml⁻¹).

50 Un vehículo sólido que puede usarse de acuerdo con la presente invención puede, p. ej., ser un microvehículo. Los microvehículos son pequeñas partículas sólidas sobre las que pueden crecer células en un cultivo en suspensión. Las células son capaces de adherirse y propagarse en la superficie de los microvehículos. Típicamente, los microvehículos consisten en perlas, cuyo diámetro está comprendido entre 90 μ m y 300 μ m. Los microvehículos pueden estar hechos de diversos materiales que han demostrado ser exitosos para la unión y propagación de células tales como, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polietileno, dextrano, gelatina y celulosa. Además, la superficie de los microvehículos se puede recubrir con un material que promueva la unión y el crecimiento de células tales como, por ejemplo, N, N-dietilaminoetilo, vidrio, colágeno o proteínas recombinantes. Existen microvehículos macroporosos y no porosos. Las superficies macroporosas dan a las células un fácil acceso al interior del

microvehículo después de la inoculación, y una vez dentro del microvehículo, las células están protegidas de las fuerzas de cizallamiento generadas por la agitación mecánica y la aireación en el biorreactor.

5 Un vehículo sólido adicional que se puede usar de acuerdo con la presente invención puede ser, p. ej., un disco, tal como un disco compuesto de fibra no tejida de poliéster unida a una lámina de malla de polipropileno (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.266.476). Dichos discos suelen tratarse electrostáticamente para facilitar que las células en suspensión se adhieran a los discos y queden atrapadas en el sistema de fibras, donde permanecen durante todo el procedimiento de cultivo. La densidad celular y la productividad lograda con células cultivadas en discos pueden ser hasta diez veces mayor que con las células que crecen en los microvehículos.

10 El procedimiento para la producción de interferón beta glicosilado preferiblemente comprende además una etapa de recoger la cosecha de cultivo celular que contiene el interferón beta.

En una realización preferida, la cosecha de cultivo celular se somete adicionalmente a un procedimiento de purificación.

15 El procedimiento de purificación puede ser cualquier procedimiento que conduzca al interferón beta de la pureza requerida y puede contener cualquier combinación de etapas de purificación basadas en cromatografía o cualquier otra tecnología de purificación tal como fraccionamiento con sal o similares. La purificación se lleva a cabo preferiblemente mediante un procedimiento para la purificación del interferón recombinante a partir de un fluido, que comprende las etapas de:

a) Someter el fluido a cromatografía de afinidad;

b) Someter el eluato de la cromatografía de afinidad a cromatografía de intercambio catiónico;

20 c) Someter el eluato de la cromatografía de intercambio catiónico a cromatografía hidrófoba mediante RP-HPLC.

La etapa (a) se lleva a cabo preferiblemente en azul Sefarosa, p. ej. en una columna de flujo rápido Blue Sepharose. La etapa (b) se lleva a cabo preferiblemente sobre una resina de carboximetilo, p. ej. en un flujo rápido CM Sepharose.

25 El procedimiento de purificación puede comprender además, antes del paso (b), una etapa de clarificación del fluido mediante microfiltración.

El procedimiento de purificación puede comprender además las etapas de:

d) realizar ultrafiltración y diálisis,

e) someter el dializado a cromatografía de exclusión por tamaño,

f) someter el eluato de la cromatografía de exclusión por tamaño a filtración.

30 El paso (f) puede llevarse a cabo, p. ej., por micro o nanofiltración.

35 La ultrafiltración es útil para la eliminación de componentes de pequeño peso molecular en los eluatos resultantes de los pasos cromatográficos previos. La ultrafiltración, p. ej., permite eliminar el disolvente orgánico, el TFA y las sales del paso anterior, para equilibrar el interferón beta en el tampón requerido, o para concentrar la molécula a la concentración deseada. Dicha ultrafiltración puede realizarse, p. ej., en medios de ultrafiltración, excluyendo componentes que tienen pesos moleculares por debajo de 5 kDa.

Si la proteína purificada de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente está destinada a la administración a seres humanos, es ventajoso incluir además etapas de eliminación de virus. Una etapa de filtración de eliminación de virus puede llevarse a cabo, p. ej. entre los pasos (d) y (e), o después del paso (e). Más preferiblemente, el procedimiento comprende dos etapas de eliminación de virus.

40 La pureza que se puede obtener con el procedimiento de purificación de acuerdo con la invención es preferiblemente > 80%, más preferiblemente > 90 % y lo más preferiblemente > 98%.

El procedimiento de purificar el interferón beta preferiblemente comprende además una etapa de formulación del interferón beta purificado en una composición farmacéutica, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 De acuerdo con la presente invención se prefiere usar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), denominada DUKX-B11, que carece de actividad DHFR (dihidrofolato reductasa), como la célula huésped para la preparación del interferón beta glicosilado. La secuencia de ADN que codifica el interferón- β humano es descrito, p. ej. en la patente de EE.UU. no. 5.326.859.

50 Una realización preferida de la presente invención se refiere a un método para producir interferón- β humano recombinante en células transfectadas capaces de producir al menos aproximadamente 100000 IU de interferón- β

humano recombinante en productividad celular específica (IU/10⁶ células/24 horas). Preferiblemente, las células son capaces de producir al menos aproximadamente 200000 IU o al menos aproximadamente 200000 IU o al menos aproximadamente 300000 IU o al menos aproximadamente 400000 IU o al menos aproximadamente 500000 IU o al menos aproximadamente 600000 IU de productividad celular específica del interferón beta recombinante humano.

5 Preferiblemente, la célula productora del interferón beta es una célula CHO que se transfecta con una construcción de ácido nucleico que comprende al menos un elemento promotor/potenciador unido funcionalmente al gen IFN-β humano. Más preferiblemente, el al menos un elemento promotor/potenciador comprende un promotor/potenciador SV40. Lo más preferiblemente, la construcción de ácido nucleico comprende al menos una primera unidad de transcripción compuesta por el promotor/potenciador de SV40 funcionalmente unido al gen de IFN-β humano, estando el gen de IFN-β humano funcionalmente unido a la región de poliadenilación temprana de SV40 T Ag. También es muy preferido que la construcción de ácido nucleico comprenda además al menos una segunda unidad de transcripción compuesta por un promotor/potenciador de SV40, un gen de DHFR de ratón y una región de poliadenilación temprana que contiene poliA de SV40 T Ag.

10 El presente documento también describe una construcción de ácido nucleico que comprende al menos un elemento promotor/potenciador unido funcionalmente al gen IFN-beta humano para ser transfectado en células, caracterizado porque las células transfectadas son capaces de producir al menos aproximadamente 100000 IU, al menos aproximadamente 200000 IU o al menos aproximadamente 300000 IU o al menos aproximadamente 400000 IU o al menos aproximadamente 500000 IU o al menos aproximadamente 600000 IU del interferón-β humano recombinante en productividad celular específica (IU/10⁶ células/por 24 horas).

20 Preferiblemente, al menos un elemento promotor/potenciador comprende un promotor/potenciador SV40. Más preferiblemente, la construcción de ácido nucleico comprende al menos una primera unidad de transcripción compuesta por el promotor/potenciador SV40 funcionalmente unido al gen IFN-β humano, estando el gen IFN-β humano funcionalmente unido a la región de poliadenilación temprana SV40 T Ag. Lo más preferiblemente, la construcción de ácido nucleico comprende además al menos una segunda unidad de transcripción compuesta por un promotor/potenciador de SV40, un gen de DHFR de ratón y una región de poliadenilación temprana que contiene poli A de SV40 T Ag.

El documento describe además a un interferón beta obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

30 Se describe también una composición de interferón beta que tiene un perfil de glicosilación único. Tal interferón beta se produce preferiblemente mediante un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La proteína de interferón-β humana recombinante glicosilada puede contener una estructura de oligosacárido que tiene dos o tres sacáridos de fucosa. En un aspecto preferido, la estructura de oligosacáridos comprende además un glicano trifucosilado biantenarico disialílico (Neu₂Ac.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃).

35 En un aspecto preferido adicional, el patrón de glicosilación único comprende además una estructura biantenaria no sializada (Hex₅.HexNAc₄.Fuc); estructura triantenaria disializada o biantenaria disializada con estructuras repetitivas de N-acetil-lactosamina (NeuAc₂.Hex₆.HexNAc₅.Fuc); estructura triantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₆.HexNAc₅.Fuc); estructura triantenaria trisializada con estructuras repetidas de N-acetil-lactosamina o tetraantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₇.HexNAc₆.Fuc); estructura biantenaria monosializada y disializada con dos unidades de fucosa (NeuAc.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂,NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂).

40 Preferiblemente, el patrón de glicosilación único comprende glicanos que presentan un nivel similar de ácido N-acetilneuramínico: ácido N-glicolilneuramínico en cuanto a los patrones de glicosilación de proteínas humanas naturales.

45 En un aspecto preferido adicional, la composición del interferón beta se caracteriza por un perfil de sialilación que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 5% de N-glicanos no sializados, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25% de glicanos mono-sializados, de aproximadamente 55 a aproximadamente 75% de N-glicanos disializados, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25% de N-glicanos tri-sializados.

Además se describe en este documento el uso del interferón beta para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, en particular, la esclerosis múltiple, el cáncer o las infecciones virales.

50 La esclerosis múltiple puede seleccionarse del grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente, no recidivante y de inicio temprano.

Un método para tratar a un sujeto que necesita un tratamiento con interferón-β puede comprender administrar al sujeto la proteína del interferón-β tal como se describe en la presente memoria.

Preferiblemente, el tratamiento es para la esclerosis múltiple. Más específicamente, la esclerosis múltiple puede seleccionarse del grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente, no recidivante y de aparición temprana.

Alternativamente, el tratamiento es un tratamiento antitumoral.

En una alternativa más, el tratamiento es un tratamiento antiviral.

5 El presente documento describe además una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, una composición de interferón- β humano recombinante, purificado, aislado como se describe en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración de la composición farmacéutica. Preferiblemente, la composición farmacéutica que tiene actividad antitumoral o antiviral, o actividad contra la esclerosis múltiple, comprende, como ingrediente activo, una proteína de interferón- β humana recombinante, purificada, aislada como se describe en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración de la composición farmacéutica.

10 También se describe en este documento un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de interferón- β recombinante, purificada, aislada, en la que el material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que la proteína de interferón- β humana recombinante como se describe en este documento puede administrarse a un ser humano para el tratamiento del mismo.

15 La proteína o la composición farmacéutica de interferón- β humana, recombinante, purificada, aislada, tal como se describe en la presente memoria, se usa preferiblemente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente, no recidivante y de aparición temprana. Los regímenes de dosificación para un sujeto particular (paciente) pueden ser fácilmente determinados por cualquier experto en la técnica, ya que estos regímenes son bien conocidos en la técnica.

20 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con la descripción anterior, ilustran la invención de una manera no limitante.

25 Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. Nos. 30 4.666.828; 4,683,202; 4,801,531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

35 Si bien esta invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de sufrir modificaciones adicionales. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

40 Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de un clon de ovario de hámster chino (Cho)

que produce ifn-beta a altos niveles

Este ejemplo describe la generación de un clon CHO productor de interferón beta.

45 El procedimiento básico, particularmente con respecto a la preparación del plásmido de expresión, se describe en Mory et al. (1981).

50 Una visión general sobre el procedimiento de generación del clon se representa en la Fig. 1. Se aisló un fragmento de ADN que comprende la región codificante de interferón- β humano a partir de una biblioteca de ADN genómico de células sanguíneas periféricas humanas. Se transfectó una línea celular CHO deficiente en DHFR con un plásmido recombinante que contiene tanto la secuencia codificante de IFN- β humana como el gen de DHFR de ratón como marcador seleccionable y amplificable. Después de la selección en medio exento de timidina, la amplificación génica con metotrexato (MTX) y la clonación, se aisló una célula que producía IFN- β -1a a niveles elevados. Las células se sometieron a caracterización genotípica y fenotípica.

Construcción del plásmido de expresión que porta los genes hIFN-β y mDHFR

Se construyó un vector de expresión que contiene tanto la secuencia codificante de IFN-β humana genómica como el gen de resistencia a DHFR de ratón. Esta construcción eliminó la necesidad de co-transfección de las células hospedadoras de CHO con dos plásmidos separados, uno que comprende la secuencia de codificación de IFN-β y el segundo que comprende la secuencia de DHFR de ratón, como se conoce, p. ej., de Chernajovsky et al., 1984.

El vector de expresión que contiene la secuencia de codificación de IFN-β carecía del IFN-β 3'UTR y, por lo tanto, de la región de poliadenilación de IFN-β.

El vector de expresión contenía, por lo tanto, dos unidades de transcripción, una primera unidad de transcripción de IFN-β compuesta por el promotor/potenciador SV40, la secuencia codificante de IFN-beta humana y la región de poliadenilación temprana de SV40 T Ag, y una segunda unidad de transcripción DHFR compuesta por el promotor/potenciador SV40, el gen DHFR de ratón y la región de poliadenilación temprana que contiene SV40 T Ag poliA.

Estas unidades de transcripción fueron seguidas por secuencias del plásmido pBR322 que porta el origen de replicación bacteriano ColEI y el gen de la resistencia a la ampicilina.

La estructura del vector de expresión se verificó por análisis de mapa de restricción y por secuenciación completa (secuenciación automática de doble cadena). La secuencia correcta de los fragmentos utilizados para su construcción se confirmó en ambas direcciones.

Descripción de la célula huésped

Una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), denominada DUKX-B11, que carece de actividad DHFR (dihidrofolato reductasa), se utilizó como célula huésped. La línea celular se aisló de la línea celular CHO-K1, requiriendo prolina (Kao y Puck, 1968) mediante mutagénesis con metanosulfato de etilo seguido de irradiación gamma. Los mutantes deficientes en DHFR se seleccionaron por exposición a una alta actividad específica [³H] - desoxiuridina (Urlaub and Chasin, 1980).

Los mutantes deficientes completos requieren glicina, hipoxantina y timidina para el crecimiento. El papel central de DHFR en la síntesis de precursores de ácido nucleico, junto con la sensibilidad de las células deficientes en DHFR a análogos como el metotrexato (MTX), presenta dos ventajas principales. En primer lugar, la transfección de dichas células deficientes en DHFR con plásmidos que contienen un gen de DHFR permite la selección de células recombinantes que crecen en medio libre de timidina. En segundo lugar, el cultivo de estas células en medios selectivos que contienen concentraciones crecientes de MTX da como resultado la amplificación del gen DHFR y el ADN asociado (Kaufman and Sharp 1982, and Sambrook, J., Fritsch, E.F., Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Generación del clon

Como se describe en la Fig. 1, las células CHO deficientes en DHFR dependientes de anclaje se transfectaron mediante el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio (Graham FL and Van Der EB, 1973; Busslinger, et al., 1981) con el plásmido que contiene tanto la secuencia de codificación de h-IFN-β como el gen marcador de mDHFR descrito anteriormente. Para amplificar el gen transfectado, los clones seleccionados se sometieron a tratamiento con MTX (metotrexato). Los clones se aislaron después de la selección de MTX.

Transfección

La línea celular DUKX-B11 deficiente en CHO DHFR se cultivó en una mezcla de nutrientes Ham F12 suplementada con 10% de SFB, a 37°C, 5% de CO₂.

El día antes de la transfección, las células CHO DUKX-B11 se sembraron a 5x10⁵ células/placa de 9 cm. Se prepararon coprecipitados de CaPO₄-DNA mezclando el ADN del vector, se disolvieron en 0,45 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, EDTA 0,1 μM, con 0,05 ml de una solución de CaCl₂ 2,5M.

A continuación, se añadieron 0,5 ml de Na₂HPO₄ 280 mM, HEPES 50 mM, pH 7,1, con agitación suave y la mezcla se mantuvo durante 30-40 minutos a temperatura ambiente, para permitir la precipitación. Después de añadir el ADN de CaPO₄ a las células durante 30 minutos, se añadieron 9 ml de medio de cultivo celular y las células se devolvieron a la incubadora durante 4 horas. A continuación, se eliminó el medio y las células se agitaron osmóticamente con glicerol al 10% en medio, durante 4 minutos. Las células se tripsinizaron y se subcultivaron a razón de división de 1: 4 a 1:10 en medio selectivo que consistía en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que carecía de timidina pero suplementado con 150 μg/ml de prolina y 10% de FBS dializado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 8% de CO₂ y el medio selectivo se cambió cada 3-4 días.

Aislamiento de una línea celular productora de hIFN- β constitutiva

5 Las células productoras de interferón beta se aislaron después de 10-12 días mediante tripsinización con discos de papel empapados con tripsina de 3 mm. Se seleccionaron cuarenta y tres clones, se cultivaron clones individuales y se analizaron los sobrenadantes del cultivo celular para la producción de hIFN- β por ELISA. Se seleccionaron tres clones que producían más de 30.000 IFN- β IU/10⁶ células/24 horas para la amplificación génica.

10 Cada uno de los clones se sometió a cultivo con bajas concentraciones de MTX. Toda la población de células que sobrevivió al tratamiento se sometió a mayores concentraciones de MTX. La subclonación y la selección de clones se realizaron solo después de la última etapa de amplificación. Los altos productores seleccionados (más de 400.000 IU/10⁶ células /24 horas) se sometieron a estudios de estabilidad de clones. Se seleccionó un clon altamente productor relativamente estable y se subclonó. A partir de los clones resultantes, se seleccionó un clon estable altamente productor.

La amplificación aumentó los niveles de producción (productividad específica) de IFN- β -1a de 30.000 a 500.000 IU/10⁶ células/24 horas, según lo determinado por ELISA.

15 Se realizaron análisis de transferencia Northern después del aislamiento inicial de los clones de alta productividad de IFN- β -1a. Se expresó un único mRNA de hIFN- β de aproximadamente 0,9 kb, como se esperaba a partir de la construcción de expresión (datos no mostrados).

Para el análisis de transferencia Northern del ARN total a partir de clones primarios, la transferencia se preparó de la siguiente manera.

20 Veinte μ g de ARN total se separaron por electroforesis en geles de formaldehído de agarosa. El ARN se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó a una sonda de ADN de IFN- β . Los marcadores de tamaño (M) son ARNr 28S y 18S, que corresponden a 4700 y 1900 nucleótidos, respectivamente (no mostrados).

Productividad

25 La productividad celular luego se probó de la siguiente manera. El medio de cultivo tisular (crecimiento) fue DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), complementado con prolina (150 mg/l) y 10% de SFB (suero bovino fetal) o en medio exento de suero, p. ej. Ex-Cell 302 de JRH.

30 Las células del clon productor de interferón se sembraron en matraces TC80 (2 x 10⁶ células/matraz) en 30 ml de medio de crecimiento (DMEM y FBS, o medio exento de suero). Cuando se alcanzó la confluencia inicial, según se determinó por examen microscópico, el medio de crecimiento se reemplazó con 20 ml de medio nuevo y los cultivos se incubaron a aproximadamente 32°C durante 24 horas. Se obtuvieron muestras del medio de cultivo de cada matraz. El nivel de IFN- β -1a se determinó mediante ELISA a partir del medio de cultivo con un kit de ELISA comercial (por ejemplo, el kit Toray ELISA de Toray, Japón).

La productividad celular específica se calculó multiplicando la IU/ml de IFN- β -1a producida por 24 horas por el volumen por matraz TC80 y dividiendo por el número total de células (en millones) por matraz.

Resultados y conclusiones

35 El clon de células productoras de interferón beta era una línea celular estable, que tenía una alta capacidad de producción de interferón- β humano recombinante en el intervalo de aproximadamente 100.000 IU en productividad celular específica (IU/10⁶ células/24 horas) y aproximadamente 600.000 UI en productividad celular específica. La productividad media de la nueva línea celular fue de 556.000 \pm 119.000 IU/10⁶ células/24 h.

40 La morfología celular general también se examinó mediante microscopía de contraste de fase de uno a cuatro días después de la siembra. La morfología se documentó con fotomicrografías (no se muestra). Los resultados muestran que a baja densidad (de 24 a 48 horas después de la siembra) las células exhibían una morfología redondeada, en forma de huso (resultados no mostrados). En la confluencia, las células forman monocapas densas que comprenden células similares a epitelio alargadas, en forma de huso y más pequeñas, apretadas (resultados no mostrados). Las características morfológicas exhibidas por estas células eran típicas de las células CHO.

45 **Determinación de la secuencia de ADN de la región de codificación de hIFN- β** en las células del clon

Los productos de ADN de PCR derivados del ARN mensajero de hIFN- β (ARNm) se usaron para determinar las secuencias de nucleótidos de la región de codificación ya que la secuencia de ARNm proporciona una prueba directa de que los transcritos de ARN se procesan correctamente.

Procedimiento para la secuenciación de ADN

50 ADNc y reacciones de PCR

5 El ARN celular total se preparó a partir de las células en la etapa de crecimiento exponencial en cultivos en matraz T (Chomczynski and Sacchi, 1987). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de las muestras de ARNm en una reacción que contenía 2 microgramos (μg) de ARN total, hexámeros aleatorios 0,5 μM , tampón 1X PCR II 2,5 mM [Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM], 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 40 unidades de inhibidor de RNasa y 200 unidades de transcriptasa inversa en un volumen final de 100 μl .

10 La plantilla de ARN, el cebador y el agua exenta de nucleasas se combinaron y se incubaron a 65°C durante 10 minutos y luego se colocaron en un baño de hielo. Los componentes restantes se añadieron y la reacción se incubó a 42°C durante 60 minutos, luego a 70°C durante 15 minutos y luego se mantuvo a 4°C indefinidamente. Los productos de RT (ADNc) se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Como control, se preparó una reacción con todos los componentes excepto la transcriptasa inversa. El control "no RT" excluye la posibilidad poco probable de que las preparaciones de ARN tuvieran contaminación con ADN.

La amplificación por PCR se realizó usando los cebadores SRB1 AP1 y AP2 para las plantillas de ADNc. Las secuencias para estos cebadores son las siguientes:

SRB1 AP1: CCTCGGCCTCTGAGCTATTC (SEQ ID NO: 1)

15 SRB1 AP2: CACAAATAAAGCATT TTTT (SEQ ID NO: 2)

20 Las reacciones PCR consistieron en lo siguiente: 4,0 μl de mezcla de reacción de ADNc, 50 pmol de cada par de cebadores y 25 μl de mezcla maestra HotStarTaq™ en un volumen de reacción de 50 μl . Las reacciones se calentaron a 95°C durante 15 minutos seguido de 30-35 ciclos de: (a) 94°C durante 30 segundos, (b) 55°C durante 30 segundos y (c) 72°C durante 1 minuto. Luego se realizó un ciclo final, idéntico al primero 30-35, pero con un tiempo de incubación de 72°C extendido a 10 minutos.

Los productos de hIFN- β PCR se purificaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) seguido de extracción usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen).

Secuenciación de ADN amplificado

25 Los productos de PCR se secuenciaron directamente con el kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction con ADN Polimerasa AmpliTaq®. Todas las reacciones de secuenciación se analizaron en geles Long Ranger™ al 5,75% en secuenciadores de ADN automatizados ABI373-S. Los datos brutos fueron rastreados y analizados utilizando el software ABD Analysis.

Resultados

30 La amplificación por PCR dio como resultado la generación del fragmento pronosticado de aproximadamente 815 pb. No se observaron productos de PCR para el control "sin RT" ni para los otros controles negativos.

Se obtuvieron datos de secuencia completos para la región de codificación de proteína del gen hIFN- β ; todos los nucleótidos se leyeron en dos o más electroferogramas (datos no mostrados). Cuando las secuencias se compararon con el vector de expresión, no se encontraron diferencias (datos no mostrados).

Conclusiones

35 Los datos de secuenciación demuestran que el gen hIFN- β integrado en las células del genoma del clon se transcribe correctamente en el ARNm de hIFN- β .

Determinación del número de copia del gen

El número de copias del gen se determinó por análisis de transferencia Southern de los extractos de BamHI.

40 Los cebadores específicos utilizados para construir las sondas para el análisis del número de copias del gen son los siguientes:

(i) 5': PR221626: ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 3)

(ii) 3': PR231217 ACTTACAGTTACCTCCGAAAC (SEQ ID NO: 4)

Procedimientos para la preparación de ADN genómico y transferencia Southern

45 Se aisló ADN genómico de cultivos de matraces T en crecimiento exponencial de las células usando una modificación del método de desalinación (Martinez et al., 1998). Brevemente, las células se resuspendieron en un tampón Tris-NaCl-EDTA y luego se lisaron con un tampón Tris-NaCl-EDTA-SDS. Esta suspensión se trató durante la noche con proteinasa K. Después de la adición de una solución saturada de sal y la centrifugación, el ADN genómico se precipitó mediante la adición de isopropanol a la fase acuosa. Después de un lavado con etanol al 70%, el sedimento de ADN se resuspendió en una solución de TE/RNase A (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, RNaseA al 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

50

Se digirieron alícuotas de todas las preparaciones de ADN genómico con AflIII BbsI, BglI, DraI, HincII, PstI, y XmnI. Los patrones se prepararon por digestión de la muestra de ADN del vector de expresión con las mismas endonucleasas de restricción usadas para las muestras genómicas. El ADN se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa y luego se transfirió en 10X SSC a membranas de nailon por acción capilar. La cantidad de ADN genómico cargado fue de 0,5 µg. Las transferencias se prepararon para la hibridación a un fragmento de hIFN-β ³²P-marcado que se amplificó por PCR a partir del plásmido usando los cebadores indicados anteriormente. La prehibridación y la hibridación se realizaron a 65°C.

Las determinaciones de tamaño se realizaron en base a la migración de las bandas visualizadas por ³²P en una autorradiografía. El vector de expresión se utilizó como control.

Las determinaciones del número de copias se basaron en los niveles de ³²P relativos en las bandas cuantificadas en un modelo 445SI PhosphorImager™ (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA). Las autorradiografías se fotografiaron para proporcionar un registro de los resultados (datos no mostrados).

Resultados

Se compilaron las determinaciones de tamaño de los fragmentos generados para las células productoras de interferón beta del clon para todos los extractos.

La digestión enzimática del ADN extraído de la línea celular productora de interferón beta dio como resultado la producción de bandas prominentes que coincidían con las predichas a partir del vector de expresión para las digestiones BamHI, BglI, DraI y HincII. Se observó una banda muy tenue (~1,77 kb) con los ADN genómicos digeridos con BglI, muy probablemente como resultado de una digestión incompleta. Estas enzimas de restricción flanquean la unidad de expresión hIFN-β indicando que una unidad intacta, funcional, de longitud completa se ha integrado en el genoma.

En las digestiones restantes, se observaron diferencias en los patrones de bandas entre el vector de expresión y los ADN genómicos. Esto no es inesperado ya que debe producirse una reorganización cuando el vector circular se integra en el genoma de la célula CHO.

Los niveles de número de copias determinados para las células del clon fueron en promedio de 96-105 copias por célula. Por ejemplo, para un grupo de células, el número de copias del gen promedio (n = 3) fue 105, con una desviación estándar de 23 y un CV (%) de 22.

Determinación del tamaño del ARNm

El ARN total se aisló a partir de células productoras de interferón beta en crecimiento exponencial y células CHO DUKX no transfectadas (Chomczynski and Sacchi, 1987). Las sondas utilizadas incluyeron una sonda de hIFN-β marcada con ³²P preparada como se describe en la sección "preparada como se describe en la sección" y una sonda de ADNc de G3PDH de control (Clontech; Palo Alto, CA).

Procedimiento

El ARN total, 5 µg por línea, se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa que contenían formaldehído como desnaturizante. Las muestras se cargaron en conjuntos duplicados. El ARN se transfirió en 1X SSC a membranas de nailon por acción capilar. La prehibridación y la hibridación se realizaron a 65°C en la solución modificada de Church y Gilbert, descrita en la sección "Análisis de mapa de endonucleasa de restricción". Las transferencias se hibridaron con una sonda de hIFN-β marcada con ³²P y una sonda de ADNc de G3PDH de control. Los tamaños de banda se estimaron a partir de una autorradiografía de las transferencias.

Resultados y conclusiones

Se observó una importante especie de ARNm de IFN-β para las células. El tamaño del ARNm se estimó en 0,9 kb de ARNm. Este tamaño se correlaciona bien con un ARNm que comienza en el sitio de iniciación de la transcripción de SV40 y da como resultado una transcripción de aproximadamente 800 nucleótidos sin considerar la cola de poliA.

Conclusiones generales y resumen

Los estudios fenotípicos y genotípicos en las células productoras de interferón beta confirmaron la identidad y la consistencia de las células.

La integración cromosómica del gen de hIFN-β en el genoma de las células CHO se demostró mediante estudios de hibridación in situ.

La comparación de los patrones de mapeo de las endonucleasas de restricción, las secuencias de ADN y los análisis de ARNm de las células no mostró evidencia de reordenamientos macroscópicos del ADN o mutaciones puntuales del gen de hIFN-β.

Los niveles de número de copias del gen de hIFN- β se midieron mediante análisis de transferencia Southern del ADN extraído de las células del clon descrito. Los resultados mostraron que los niveles de número de copias de genes estaban en los mismos intervalos para todas las células, independientemente de los niveles de duplicación de la población.

- 5 El análisis de transferencia Northern del ARN preparado a partir de las células mostró una única banda de aproximadamente 0,9 kb de tamaño.

Los análisis de secuencia del ADNc de las células confirmaron la exactitud de la secuencia de ARNm, mientras que las secuencias de ADN genómico de las regiones de control 5' y 3' del gen de hIFN- β verificaron la integración de la unidad de transcripción completa de IFN- β .

- 10 En conclusión, se demostró que las células productoras de interferón beta sintetizaban transcritos de ARNm de hIFN- β con la secuencia de la región codificante de la proteína correcta, lo que indica que las células productoras de interferón beta producen IFN- β humano recombinante (IFN- β -1a) con la secuencia de aminoácidos primaria correcta.

- 15 Para la caracterización genotípica, se realizaron análisis de mapas de restricción en las células productoras de interferón beta. Se separaron múltiples digestiones mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfirieron a membranas de nailon y se hibridaron a sondas marcadas específicas para el hIFN- β . Los perfiles consistentes de fragmentos de restricción indicaron la integración de una unidad de expresión funcional de hIFN- β intacta en todos los bancos de células.

- 20 Los números de copias del gen de hIFN- β se determinaron mediante análisis de transferencia Southern del ADN extraído de las células productoras de interferón beta (datos no mostrados). Los resultados muestran que el número de copias de genes es de aproximadamente 100 copias por célula, que es aproximadamente cuatro veces mayor que para el clon descrito en la bibliografía (Chernajovsky et al., 1984).

Mediante análisis de transferencia Northern, se identificó un ARNm de aproximadamente 0,9 kb, que codificaba el gen de hIFN- β para las células del clon (datos no mostrados).

- 25 Los ADNc de hIFN- β preparados a partir de los ARNm de las células se secuenciaron y los resultados mostraron que para las células, la secuencia del gen hIFN- β era 100% idéntica a las secuencias esperadas. Por lo tanto, el gen hIFN- β se transcribe correctamente en ARNm.

La secuencia de ADN genómico de las regiones 5' y 3' que flanquean el gen de hIFN- β se determinó para las células del clon y se encontró que era 100% idéntica con las secuencias correspondientes del vector de expresión y la secuencia publicada del gen de hIFN- β .

- 30 La integración cromosómica individual del gen de hIFN- β también se demostró mediante hibridación fluorescente in situ (FISH, resultados no mostrados).

Los análisis presentados anteriormente también demostraron la estabilidad de la línea de producción.

Por lo tanto, se puede suponer que el gen transfectado está integrado de manera estable en el genoma de las células productoras de interferón beta.

35 EJEMPLO 2 - PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE INTERFERON BETA

El objetivo general de este experimento fue desarrollar un procedimiento para producir IFN beta-1a a partir del clon descrito en el ejemplo 1 en condiciones sin suero.

El procedimiento libre de suero se desarrolló a una escala de biorreactor de 75 l con soportes internos de lecho compacto Fibra-Cel®.

- 40 Las células se descongelaron y se expandieron durante 21 días en un medio sin suero comercialmente disponible que tenía las siguientes modificaciones:

Tabla 1 Modificación del medio sin suero

| Ingredientes | Composición en % (p/p) |
|------------------|------------------------|
| HEPES | 20 mM |
| Prolina | 1 mM |
| Rojo de fenol | 15 mg/L |
| Cloruro de sodio | 6150 mg/L |

Se sembraron 30×10^9 células en el biorreactor 75L (siembra alta).

Los procesos se dividieron en las siguientes fases:

- 5
- una fase de crecimiento I a 37°C (hasta el día laborable 2 o el día laborable 4 o cuando la tasa de consumo de glucosa (GCR) era $\geq 2,0 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
 - una fase de crecimiento II a 35°C (hasta el día de trabajo 7 o cuando $\text{GCR} \geq 8,0 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
 - una fase de producción a 33°C

10 Esta estrategia de temperatura dio como resultado una productividad de aproximadamente $6,0 \times 10^6$ IU /ml de bio por día. Esta productividad es aproximadamente cinco veces mayor que la productividad del clon descrito en la bibliografía (Chemajovsky et al., 1984) en medio que contiene suero.

Se probó además si la adición de N-Actey-Cyteine (NAC) solo o en combinación con Zinc (NAC + Zn) tenía un efecto beneficioso sobre la productividad. La adición de NAC o NAC + Zn aumentó la productividad a aproximadamente 12×10^6 IU/ml de bio por día al final del proceso.

15 También se probó una densidad celular de siembra un 66% menor ($1,3 \cdot 10^9$ células) para evaluar su impacto en la duración de la fase de crecimiento, el metabolismo y la productividad.

El metabolismo y la productividad no se vieron afectados por la baja siembra. El único impacto de la baja siembra fue la adición de dos días a la fase de crecimiento.

En resumen, las condiciones finales utilizadas para la producción de interferón beta fueron las siguientes:

| Temperatura | Crecimiento: | Producción: |
|------------------|---|-------------|
| | 37°C \Rightarrow 35°C | 33°C |
| Tasa de dilución | 1,6 \Rightarrow 7,2 Día ⁻¹ | |
| pH | 7,0 | |
| pO ₂ | 70% | |

20

Ejemplo 3 - Purificación del producto de proteína de interferón

El procedimiento de purificación del IFN- β -1a del sobrenadante del cultivo celular incluyó cuatro etapas cromatográficas y cuatro de filtración, como se muestra en la Fig. 2. Las etapas de purificación se realizaron en el siguiente orden:

- 25
- Etapa I: Clarificación de la cosecha por filtración
 - Etapa II: Cromatografía de afinidad en una columna Blue Sepharose 6 de flujo rápido (6 FF);
 - Etapa III: Ultrafiltración

- Etapa IV: Cromatografía de intercambio catiónico usando preferiblemente una columna CM Sepharose FF;
 - Etapa V: Cromatografía hidrófoba RP-HPLC;
 - Etapa VI: Ultrafiltración y diálisis;
 - Etapa VII: Cromatografía de exclusión de tamaño (SE);
- 5 • Etapa VIII: Microfiltración.

La purificación del ingrediente activo comenzó con cromatografía de afinidad de colorante sobre Blue Sepharose 6 FF (BS 6 FF), que era la etapa de purificación principal. La cantidad de proteínas derivadas de células hospedadoras así como ADN de células CHO rotas se redujo en varios órdenes de magnitud y, por lo tanto, el IFN-β-1a en el eluato BS 6 FF se enriqueció significativamente. Antes de cargar el eluato en la siguiente columna, se realizó una ultrafiltración para reducir el volumen de la solución y excluir el material de bajo peso molecular.

Para obtener IFN-β-1 altamente purificado, se han elegido tres tipos principales de separaciones de proteínas basadas en columnas. La cromatografía de intercambio iónico en resina CM-sepharose FF elimina el ácido nucleico y las proteínas derivadas de FBS/CHO. La HPLC de fase inversa redujo los pirógenos, las proteínas derivadas de las células hospedadoras residuales y las formas degradadas de IFN-β-1a. Se realizó una etapa final de pulido de la filtración en gel usando la resina Sephacryl S-100 HR. El eluido se microfiltró (0,22 μm) y se almacenó a -70°C o menos.

Todos los materiales de partida utilizados para la preparación de tampones y soluciones de limpieza cumplieron con el Ph. Eur. y/o USP o son de grado analítico o reactivo.

Ejemplo 4: Análisis de sialilación

20 El IFN-beta purificado se sometió al análisis del perfil de sialilación por ES-MS (Electrospray-Espectrometría de masas), con los siguientes resultados:

| | Ensayo 1 | Ensayo 2 |
|----------------|----------|----------|
| No sializados | 2% | 4% |
| Mono-sializado | 10% | 22% |
| Di-sializado | 69% | 59% |
| Tri-sializado | 20% | 16% |

Ejemplo 5 - Análisis de glicofomas

25 Para analizar más el IFN-β-1a obtenido del nuevo procedimiento, se analizaron las glicofomas de la proteína. Como se describió previamente, las proteínas glicosiladas a menudo se producen como una mezcla de diferentes glucoformas, o proteínas que tienen diferentes estructuras de sacáridos en su glicosilación. Se usaron diversas técnicas para analizar estas glicofomas, como se describe en mayor detalle a continuación, que incluyen espectroscopía de masas por electrospray, FAB-MS, MALDI-MS, espectroscopía de masas en tándem (MS/MS) y GC-MS (estudios de ligamiento). Todas estas técnicas diferentes mostraron que de las diferentes estructuras de sacáridos estudiadas, una estructura de este tipo estaba recién presente en el IFN-β-1 obtenido del clon.

Determinación de la distribución de glicofoma mediante Electrospray-Espectroscopía de masas

Método

Muestras a granel de IFN-β-1a de interferón beta obtenidas por el clon utilizando espectrometría de masas por electrospray (ES-MS). El método es descrito, p. ej., por Fenn, et al., (1989).

35 MS/MS de glucanos. Esta técnica permitió una monitorización rápida de la distribución de glicofomas de las muestras a granel a nivel de masa molecular. Este método es descrito, p. ej., por Domon, B. and Costello, CE (1988).

Resultados

Los resultados se presentan en las Figuras 3-5. Para todas las figuras, se muestran dibujos esquemáticos de los diversos oligosacáridos en la parte superior de cada pico. Las Figuras 3 y 4 muestran los espectros transformados de ES-MS de varios lotes de IFN- β -1 de interferón beta obtenidos mediante el nuevo procedimiento.

- 5 En todos los lotes evaluados, las principales glicofomas fueron las estructuras biantenarias de hidratos de carbono disialilo con núcleo fucosilado (pico C) y monosialilo (pico B) y las glicofomas menores correspondieron a estructuras complejas biantenarias no sializadas con núcleo fucosilado (pico A), triantenarias trisializado con núcleo fucosilado (pico E) y otras 2 menores con núcleo fucosilado (picos D y F).

- 10 Señales menores a 22524 Da \pm 0,01%, atribuidas a glicanos difucosilados biantenarios de disialilo (NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂), fueron detectadas por ES-MS en muestras de IFN- β -1 derivado de interferón beta obtenido por el nuevo procedimiento. Esta glicofoma también se puede definir como glicano biantenario con antena de sialilo Lewis x (Le^x). Debe notarse que el glicano Lewis x (Le^x), compuesto por la estructura Hex.HexNAc.Fuc se encuentra comúnmente en glicoproteínas en las superficies de ambos linfocitos (L-selectina) y células endoteliales especializadas (Cummings, 1999; Dell and Morris, 2001).

- 15 Otra glicofoma secundaria se centró en un valor de peso molecular medio de 22670 Da \pm 0,01%, con una cantidad promedio del 4% de todas las glicofomas y se atribuyó a un glicano trifucosilado biantenario disialílico (Neu₂Ac.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃) fue detectado por ES-MS en los lotes de IFN- β -1a de interferón beta obtenidos por el nuevo procedimiento, independientemente de la escala de producción. La cantidad promedio de esta glicofoma menor es del 4%, con una desviación estándar de 0,90.

20 Conclusiones

El patrón de la glicofoma de IFN- β -1a derivado de interferón beta obtenido por el nuevo procedimiento se analizó mediante ES-MS.

- 25 Las señales menores, atribuidas a glucanos difucosilados, encontradas por ES-MS en IFN- β -1a del interferón beta obtenido por el nuevo procedimiento, fueron detectadas por MALDI-MS. Una pequeña glicofoma adicional (promedio del 4% de las glicofomas totales), atribuida a una estructura trifucosilada, fue detectada por ES-MS en el producto del interferón beta obtenido por el nuevo procedimiento también.

Análisis de carbohidratos por FAB-MS, MALDI-MS, espectroscopia de masas en tándem (MS/MS) y GC-MS (estudios de ligamiento)

- 30 Las muestras a granel de IFN- β -1a derivadas de interferón beta obtenidas mediante el nuevo procedimiento se sometieron a estudios extensivos de caracterización de carbohidratos. La composición de carbohidratos de IFN- β -1a se obtuvo mediante análisis FAB-MS, MALDI-MS, Nanospray-MS/MS y estudios de ligamiento (GC-MS) de IFN- β -1 permitilizado tras digestión con N-glucosidasa F triptico y péptido. La determinación del sitio de glucosilación se realizó mediante análisis de FAB-MS de péptidos quimiotríticos previamente digeridos con tripsina y N-glicosidasa F.

Método

- 35 La mezcla de glucopéptidos peptídicos escindida tripticamente del IFN- β -1a se trató con la enzima péptido-N-glicosidasa F (por ejemplo, como se describe por Tarentino et al.1985).

Después de detener la reacción (mediante liofilización), el producto de digestión resultante se purificó mediante un cartucho C18 Sep-pak. Los carbohidratos, que eluyeron en la fracción de ácido acético al 5%, se permitilaron usando NaOH/yoduro de metilo, como se describe, p. ej., por Costello (1997).

- 40 Una parte del glicano permitilado se analizó mediante FAB-MS de iones positivos (obtenido en intervalos de baja masa para iones de fragmentos e intervalos de masas elevadas para iones moleculares), como se describe, p. ej., por Barber, et al. (1981) and Taylor (1983).

La espectrometría de masas MALDI se realizó, p. ej., como lo descrito por Hillenkamp, et al., 1991.

La espectrometría de masas con nanopulverización se realizó, p. ej., como lo descrito por Wilm and Mann 1996.

- 45 El resto de los oligosacáridos permitilados se usaron para el análisis de ligamiento por cromatografía líquida de gas/espectrometría de masa (GC/MS), siguiendo la derivatización, como se describe, p. ej., por Gray, 1990.

Finalmente, para observar el péptido que contiene el sitio de glicosilación potencial de Asn 80, los péptidos tripticos se digirieron con péptido N-glicosidasa F y se purificaron por Sep-pak. Las fracciones de propanol (20%-40%) del Sep-pak se subdigerieron con quimotripsina y se analizaron mediante FAB/MS.

50

Resultados

MALDI y FAB-MS de los carbohidratos permetilados

5 El estudio se realizó sobre la proteína del interferón beta obtenida por el nuevo procedimiento. Un espectro MALDI representativo se presenta en la Fig. 6. Un espectro MALDI representativo se presenta en la Fig. 6. La lista correspondiente de señales m/z observadas en los espectros permetilados (MALDI-MS y FAB-MS) se presenta en la Tabla 3.

Los resultados de todos los lotes indicaron la presencia de una estructura biantenaria disializada predominante que tiene la composición de NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc, y una estructura biantenaria de monosialilo que tiene la composición de NeuAc.Hex₅.HexNAc₄.Fuc. Los glicanos no fucosilados no se observaron.

10 También se observaron señales secundarias posiblemente correspondientes a las siguientes estructuras de oligosacáridos en todos los lotes:

- Estructura biantenaria no sializada (Hex₅.HexNAc₄.Fuc)
- Estructura triantenaria disializada o biantenaria disializada con estructuras repetitivas de N-acetil-lactosamina (NeuAc₂.Hex₆.HexNAc₅.Fuc)
- 15 • Estructura triantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₆.HexNAc₅.Fuc)
- Estructura triantenaria trisializada con estructuras repetidas de N-acetil-lactosamina o tetrantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₇.HexNAc₆.Fuc)
- Estructura biantenaria mono sializada y disializada con dos unidades de fucosa (NeuAc.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂, NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂)
- 20 • Cantidades menores de estructuras trifucosiladas (NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃) también se observaron en los lotes derivados del interferón beta obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, pero estaban ausentes en el IFN-β-1a de referencia
- Menor cantidad de ácido N-glicolilneuramínico como parte de los ácidos siálicos de los glicanos.

25 La abundancia relativa de ácido N-glicolilneuramínico se calculó a partir de las alturas de los picos de las señales en los datos de FAB de glicano N-ligado permetilado y MALDI-TOF.

Como se esperaba, las glicofomas de IFN-β-1a contienen principalmente ácido N-acetilneuramínico como la mayoría de las glucoproteínas humanas.

Nanospray MS/MS

30 Con el fin de confirmar adicionalmente las estructuras de las trazas de estructuras oligosacáridas multifucosiladas unidas a N, se llevó a cabo un análisis MS/MS sobre los oligosacáridos permetilados de señales a m/z 919, 1040 y 1098 que son consistentes con los triples iones cargados ([M+3H]³⁺) para NeuAc.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂, NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂ y NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃ respectivamente. Los iones de tipo A observados en el espectro de MS/MS confirmaron las siguientes atribuciones de estructura:

Tabla 2

| Señal MS (m/z) | IFN Beta a partir del nuevo procedimiento | Atribución por MS/MS |
|--|---|---|
| 919 | No observado* | NeuAc.Hex ₅ .HexNAc ₄ .Fuc ₂ |
| 1040 | + | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAc ₄ .Fuc ₂ |
| 1098 | + | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAc ₄ .Fuc ₃ |
| *Una señal correspondiente fue observada, sin embargo, por MALDI | | |

35

Análisis de enlaces por GC/MS

Se obtuvieron cromatogramas de GC complejos para todos los lotes probados de interferón beta obtenidos mediante el nuevo procedimiento con algunos picos de impurezas que se originaron a partir de los reactivos de derivatización. La comparación del tiempo de retención de la GC con una mezcla estándar de acetatos de alditol parcialmente metilados ejecutados en las mismas condiciones de CG permitieron asignaciones provisionales de los picos que contenían azúcares.

Los resultados del análisis de ligamiento de todas las muestras fueron esencialmente los mismos, mostrando la presencia de N-acetilglucosamina 4-enlazado (4-GlcNAc), N-Acetilglucosamina 4,6-enlazado (4,6-Glc-NAc), Mannosa 3,6-enlazado (3,6-Man), Mannosa 2-enlazado (2-Man), terminal Galactosa (t-Gal), Galactosa 3-enlazado (3-Gal) y terminal Fucosa (t-Fuc), apoyando fuertemente los datos FAB-MS. La manosa enlazada por 2,6 también se observó como un componente menor en todas las muestras, lo que indica la presencia de algunas estructuras triantenarias. Las principales estructuras de oligosacáridos postuladas observadas en las muestras a granel de IFN-β-1a se presentan en la Figura 5.

Estos datos sugieren que el resto carbohidrato principal es una estructura biantenaria fucosilada central con uno y dos residuos de ácido siálico.

Sitio de N-glicosilación por FAB-MS de las digestiones quimiotripticas

Para todos los lotes de IFN-β-1a ensayados se observó una señal de FAB-MS menor que se asignó a los residuos de péptido sodiados 80-88 (D.E.T.I.V.E.N.L.L + Na⁺) con Asn-80 convertido en ácido aspártico después de la liberación del carbohidrato con péptido N-glicosidasa F. Este experimento proporciona evidencia de apoyo que Asn-80 está de hecho glicosilada.

La Figura 6 muestra el espectro MALDI de IFN-β-1a con glicanos permetilados (lista de señales en la Tabla 3). De nuevo, como se muestra en la Tabla y la Figura adjunta, el IFN-β-1a obtenido del procedimiento de acuerdo con la presente invención contiene la estructura de trifucosa, NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃ como se describió previamente.

Tabla 3 La lista de señales en los espectros permetilados de IFN-β-1a obtenida por el nuevo procedimiento después de la digestión triptica y del péptido N-glicosidasa F

| Señales m/z (G6E001) | Posible asignación |
|-------------------------|--|
| Masa baja | |
| 344,2 | NeuAc+ (-metanol) |
| 376,2 | NeuAc+ |
| 406,3 | NeuGc+ |
| 432,3 | Hex.HexNAc+ (-metanol) |
| 464,3 | Hex.HexNAc+ |
| 793,5 | NeuAc.Hex.HexNAc+ (-metanol) |
| 825,5 | NeuAc.Hex.HexNAc+ |
| 855,5 | NeuGc.Hex.HexNAc+ |
| 999,5 | NeuAc.Hex.HexNAc(Fuc)+ |
| Masa alta | |
| 2142,6 | |
| 2227,8 | Fragmento ión |
| 2244,8 | Hex ₅ .HexNAc ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 2387,8 | Hex ₄ HexNAc ₄ .Fuc ₃ [M+Na] ⁺ |
| 2417,8 | Hex ₅ HexNAc ₄ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |

| | |
|--------|--|
| N/D | NeuAc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ (-metanol) |
| N/D | NeuAc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ (débilmente metilado) |
| 2605,8 | NeuAc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 2635,9 | NeuGc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 2779,9 | NeuAc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |
| 2911,0 | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc ⁺ (ion tipo A) |
| 2952,9 | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ (débilmente metilado) |
| 2966,9 | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 2996,9 | NeuAc.NeuGc.Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 3055,0 | NeuAc.Hex ₆ .HexNAC ₅ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 3140,9 | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |
| 3315,9 | NeuAc ₂ .Hex ₅ .HexNAC ₄ .Fuc ₃ [M+Na] ⁺ |
| 3416,1 | NeuAc ₂ .Hex ₆ .HexNAC ₅ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 3590,9 | NeuAc ₂ .Hex ₆ .HexNAC ₅ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |
| 3779,0 | NeuAc ₃ .Hex ₆ .HexNAC ₅ .Fuc [M+Na] ⁺ |
| 3810,9 | NeuAc ₂ .NeuGc.Hex ₆ .HexNAC ₅ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |
| 3866,1 | NeuAc ₂ .Hex ₇ .HexNAC ₆ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |
| 4227,9 | NeuAc ₃ .Hex ₇ .HexNAC ₆ .Fuc ₂ [M+Na] ⁺ |

Conclusiones

5 El análisis MALDI-MS y FAB-MS de los N-glicanos permetilados de las muestras a granel de IFN-β-1a obtenidas mediante el nuevo procedimiento mostró las siguientes estructuras de carbohidrato núcleo-fucosilado (no se observaron glicanos no fucosilados):

Glicoformas principales:

- Estructura biantenaria monosializada (NeuAc Hex₅.HexNAC₄.Fuc)
- Estructura biantenaria disializada (NeuAc₂ Hex₅.HexNAC₄.Fuc)

Glicoformas menores:

- 10
- Estructura biantenaria no sializada (Hex₅.HexNAC₄.Fuc)
 - Estructura triantenaria disializada o biantenaria disializada con estructuras repetitivas de N-acetil-lactosamina (NeuAc₂.Hex₆.HexNAC₅.Fuc)
 - Estructura triantenaria trisializada (NeuAc₃.Hex₆.HexNAC₅.Fuc)
- 15
- Triantenaria trisializada con estructuras repetidas de N-acetil-lactosamina o estructuras tetraantenarias trisializadas (NeuAc₃.Hex₇.HexNAC₆.Fuc)
 - Estructura biantenaria disializada y monosializada con dos unidades de fucosa (NeuAc.Hex₅.HexNAC₄.Fuc₂, and NeuAc₂.Hex₅.HexNAC₄.Fuc₂)
 - Estructura biantenaria disializada con tres unidades de fucosa (NeuAc₂.Hex₅.HexNAC₄.Fuc₃)

Nanospray MS/MS de los glicanos permetilados confirmó la detección de niveles traza de oligosacáridos NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₂ en todas las muestras, mientras que trazas de NeuAc₂.Hex₅.HexNAc₄.Fuc₃ se observaron solo en IFN-β-1a del procedimiento de la presente invención.

Los análisis de ligamiento confirmaron los monosacáridos esperados detectados con los datos de FAB-MS.

- 5 Finalmente, en el producto de IFN-β-1a obtenido del nuevo procedimiento, el análisis detallado de FAB-MS de los péptidos tripticos y quimiotripticos indicó la presencia del enlace de N-glicano en Asn-80.

La abundancia relativa de ácido N-glicolilneuramínico se calculó a partir de las alturas de los picos de las señales en los datos de FAME y MALDI-MS de glicano N-ligado permetilado.

- 10 La relación de ácido N-acetilneuramínico: ácido N-glicolilneuramínico fue de 31,7:1,0 en una muestra y sugiere que el 3,1% del ácido siálico es ácido N-glicolilneuramínico. Estos resultados están de acuerdo con niveles similares (5%) obtenidos para el interferón humano natural producido por fibroblastos humanos. Como se esperaba, las glicofomas de IFN-β-1a contienen principalmente ácido N-acetilneuramínico como la mayoría de las glucoproteínas humanas.

Referencias

- 15 1. Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410,1990
 2. Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997
 3. Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D. y Tyler A.N. (1981) Chem.Commun., 325-327
 4. Morris, H.R., Panico, M. y Taylor W. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun., 117, 299-305.
 5. Chernajovsky et al., Efficient Constitutive Production of Human Fibroblast interferon by Hamster Cells Transformed with the IFN-β Gene Fused to an SV40 Early Promoter, DNA, vol. 3, 1984, pp. 297-308
 20 6. Chomczynski, P. y Sacchi, N. Anal. Biochem. 162:156-159,1987
 7. Clonis, Y.D., Atkinson, A., Bruton, C.J., y Lowe, C.R. (1987). "Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology." stockton Press, New York.
 8. Conradt et al., Structure of the carbohydrate moiety of human interferon beta secreted by a recombinant chinese hamster ovary cell line, jbc, vol 262, pp. 14600-14605, 1987.
 25 9. Costello, C.E. (1997) Biophys. Chem., 68, 173-188
 10. Cummings, R.D. 1999. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 519-528.
 11. Dell A. y H. Morris 2001. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. Science 291: 2351-2356
 30 12. Derynk R. et al., Nature 285, 542-547, 1980;
 13. Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984
 14. Domon, B. y Costello, CE (1988), Biochemistry 27, 1534-1543.
 15. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. y Whitehouse, C.M., (1989) Science, 246, 64-70.
 16. Grantham et al., Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974)
 35 17. Graham FL and Van Der EB AJ A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52:456-467, 1973; Busslinger M, Moschonas N, and Flavell RA b+ Thalassemia. Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. Cell 27:289-298, 1981
 18. Gray, G.R., (1990) Methods Enzymol. 193, 573-587.
 19. Harvey D.J., (2000) J. Mass Spectrom., 35, 1178-1190
 40 20. Hillenkamp, F., Karras, M., Beavis, R.C., Chait, B.T. (1991) Anal. Chem. 63, 1193-1203.
 21. Innis MA, McCormick F. Procedures for expression, modification, and analysis of human fibroblast interferon (IFN-beta) genes in heterologous cells. Methods Enzymol. 1986;119:397-403.
 22. Kao, F.-T., y Puck, T.T., Genetics of Somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1275-1281, 1968

23. Kaufman R y Sharp P. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *Journal of Molecular Biology* 159:601-621, 1982
24. Martinez G, Shaw EM, Carillo M y Zanuy S. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24(2): 238-239, 1998.
- 5 25. Mory et al. *European J. Biochem.* 120, 197-202 (1981)
26. Puck, *J.Exp,Med.* 108, 945, 1958
27. Reiser W y Hauser H. Recombinant human interferon beta from mammalian cell lines. *Arzneimittelforschung/Drug Research* 37 (I), 4,482-485 (1987)
- 10 28. Runkel et al., Structural and Functional Differences Between Glycosylated and Non-glycosylated Forms of Human interferon beta (IFN-beta), *Pharm. Res.*, vol 15, 1998, pp. 641-9.
29. Sambrook, J., Fritsch, E.F., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 30, Smith and Waterman *J Mol Biol*, 147,195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981.
31. Tarentino, A.L., Gomez, C.M., y Plummer, T.H.Jr (1985) *Biochemistry*, 24, 4665-4671.
- 15 32. Urlaub G y Chasin LA Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(7):4216-4220, 1980).
33. Wilm, M., Mann, M (1996), *Anal. Chem.* 68, 1-8.
34. Youcefi et al., *Am J Clin Pathol.* 1985 Jun;83(6):735-40

Listado de secuencias

- 20 <110> APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.
- <120> PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INTERFERÓN BETA GLICOSILADO
- 25 <130> WO941-2
- <160> 4
- <170> Patente en versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Cebador
- <400> 1
- 40 cctcggcctc tgagctattc 20
- <210> 2
- <211> 20
- 45 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador
- 50 <400> 2
- cacaaataaa gcattttttt 20
- 55 <210> 3
- <211> 22

ES 2 664 924 T3

<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 3

10 atgaccaaca agtgtctcct cc 22

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 4

20 acttacaggt tacctccgaa ac 22

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la fabricación de interferón beta recombinante humano glicosilado, que comprende una etapa de cultivar células CHO productoras de interferón beta humano en un medio sin suero, comprendiendo el medio libre de suero:
- 5 - HEPES de 10 a 30 mM, preferiblemente 20 mM de HEPES;
- Prolina de 0,5 a 3 mM, preferiblemente 1 mM de Prolina; y
- de 5500 a 7000 mg/L de cloruro de sodio, preferiblemente 6100 mg/l de cloruro de sodio
- en donde el procedimiento comprende una fase de crecimiento I, una fase de crecimiento II y una fase de producción, en donde la fase de crecimiento I se lleva a cabo a 37°C, la fase de crecimiento II se lleva a cabo a 35°C, y la fase de producción se lleva a cabo a 33°C y en el que la fase de crecimiento II tarda 1-2 días.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio libre de suero comprende además de 10 a 20 mg/l de rojo fenol, preferiblemente 15 mg/l de rojo fenol.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento es un procedimiento de perfusión con una tasa de dilución que varía de 1 a 10, preferiblemente de 1,5 a 7 por día.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la velocidad de dilución aumenta dentro de las primeras dos a tres semanas de cultivo celular desde un valor inicial de 1 a 2 por día hasta un valor de 7 a 10 por día.
5. El uso de un medio de cultivo celular libre de suero que comprende
- de 10 a 30 mM de HEPES, preferiblemente 20 mM de HEPES;
- 20 - Prolina de 0,5 a 3 mM, preferiblemente 1 mM de Prolina; y
- de 5500 a 7000 mg/l de cloruro de sodio, preferiblemente 6100 mg/l de cloruro de sodio para el cultivo de una célula CHO que produce interferón beta humano recombinante en un procedimiento que comprende una fase de crecimiento I, una fase de crecimiento II y una fase de producción, en donde la fase de crecimiento I se lleva a cabo a 37°C, la fase de crecimiento II se lleva a cabo a 35°C, y la fase de producción se lleva a cabo a 33°C, y en donde
- 25 la fase de crecimiento II dura 1-2 días.

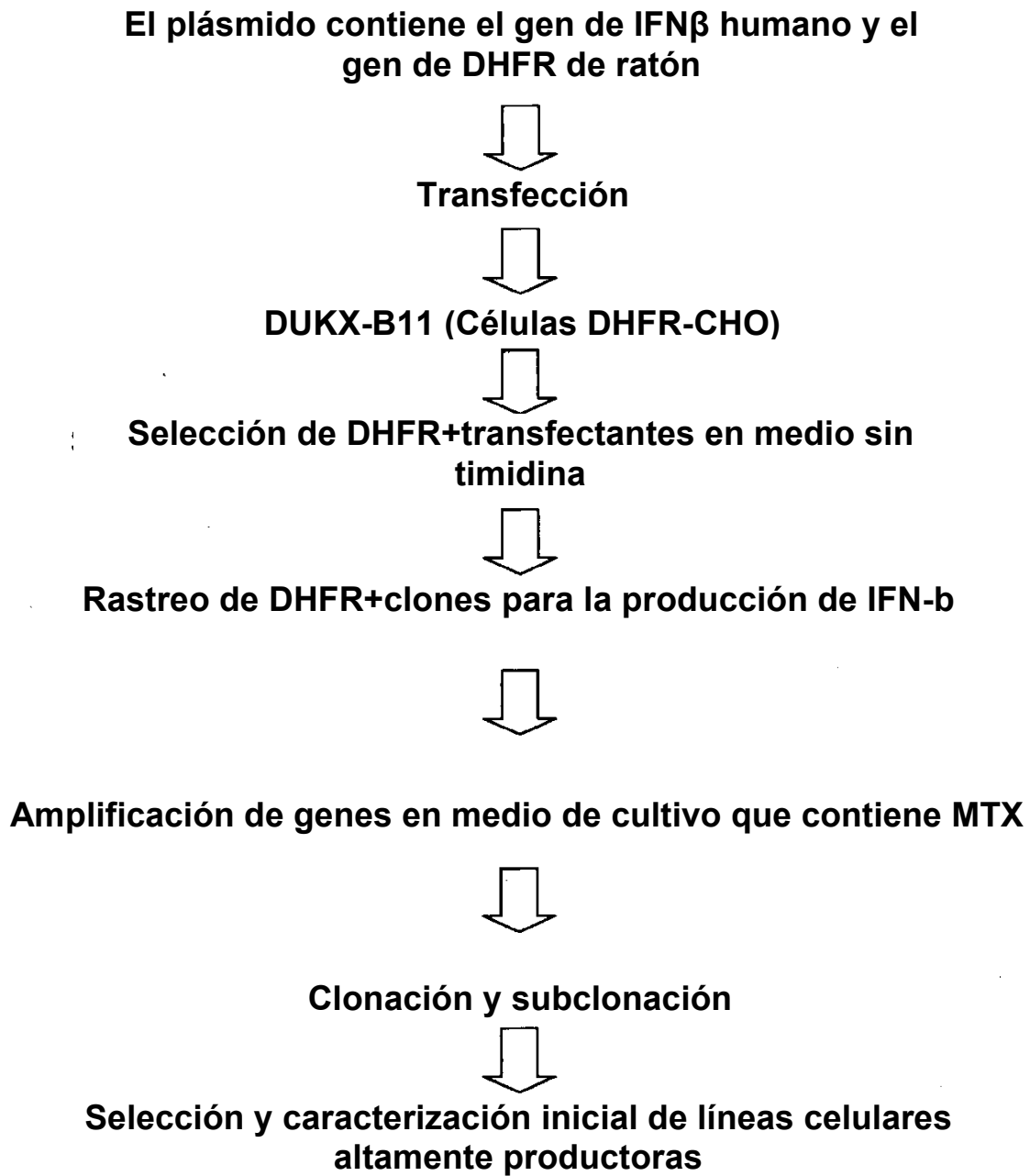


Fig. 1

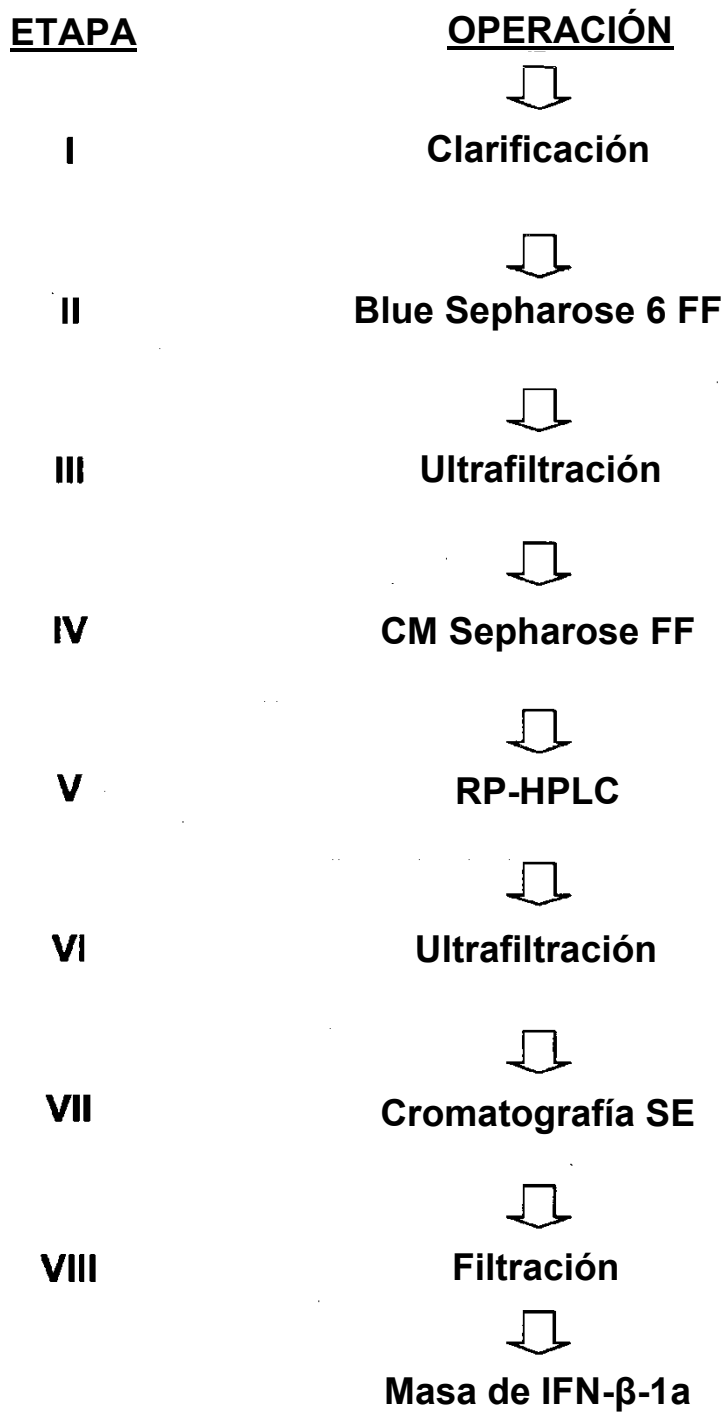


Fig. 2

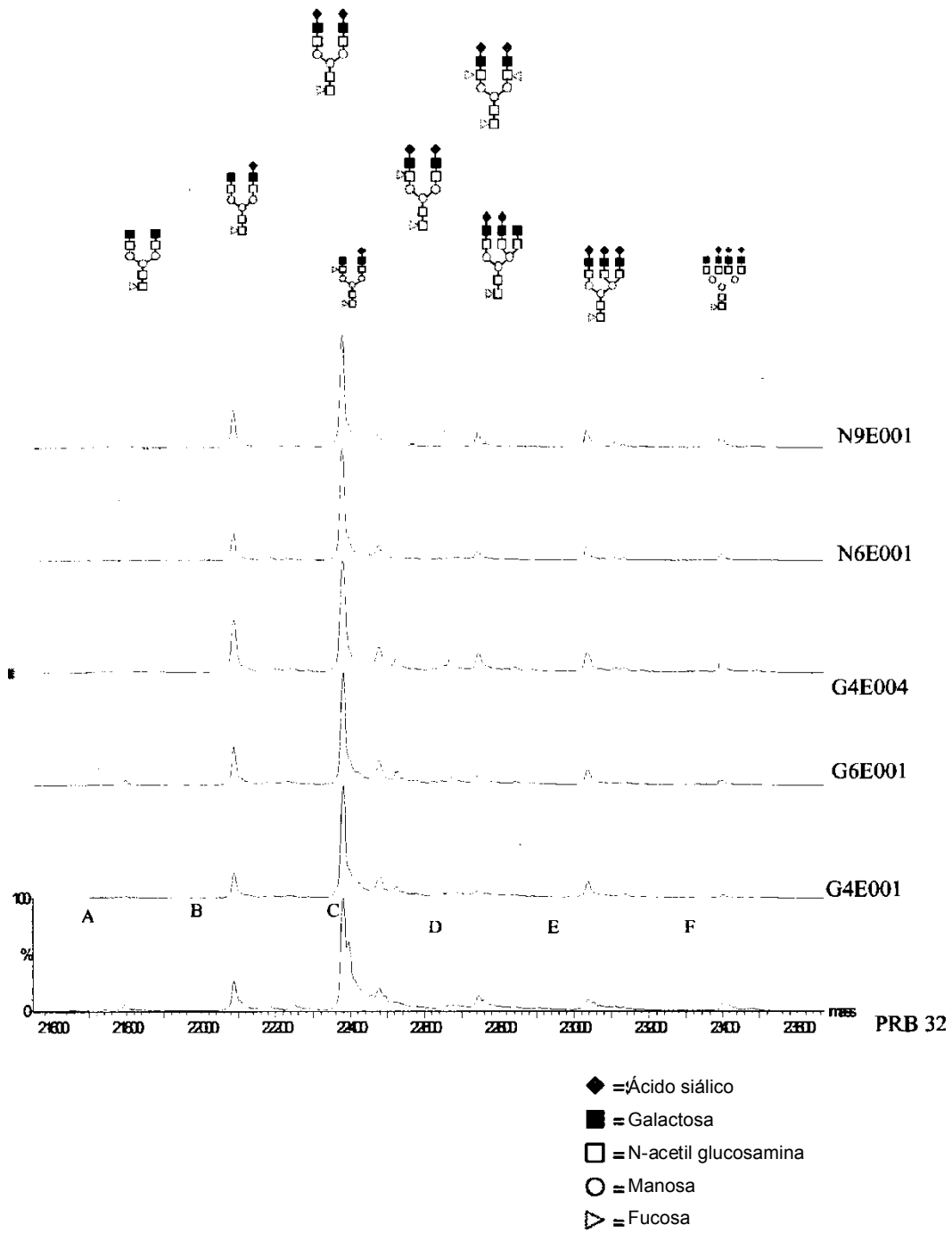
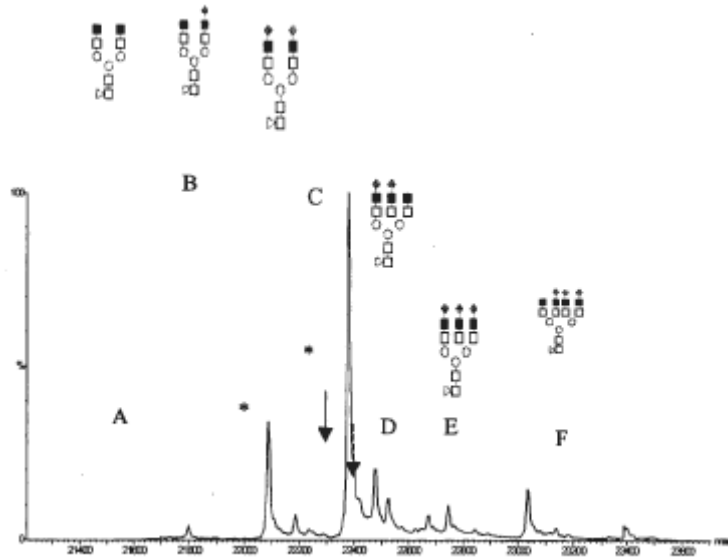


Fig. 3



| Especies | Masa observada | Atribución | As. esperada |
|----------|----------------|--|--------------|
| A | 21796 | P + 1 Fuc Biant | 21793 |
| B | 22088 | P + 1 Fuc Biant + 1SA | 22084 |
| B* | 22186 | P + 1 Fuc Biant + 1SA+aducto de fosfato | 22182 |
| C | 22380 | P + 1 Fuc Biant + 2SA | 22375 |
| C* | 22478 | P + 1 Fuc Biant + 2SA+aducto de fosfato | 22473 |
| → | 22526 | P + 2 Fuc Biant + 2SA | 22521 |
| --→ | 22672 | P + 3 Fuc Biant + 2SA | 22667 |
| D | 22746 | P + 1 Fuc Triant (o Fuc Biant con una repetición de lactosamina) + 2SA | 22739 |
| E | 23036 | P + 1 Fuc Triant + 3SA | 23031 |
| F | 23390 | P + 1 Fuc Tetrant (o Fuc Triant con una repetición de lactosamina) + 2SA | 23400 |

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 5A Oligosacáridos principales

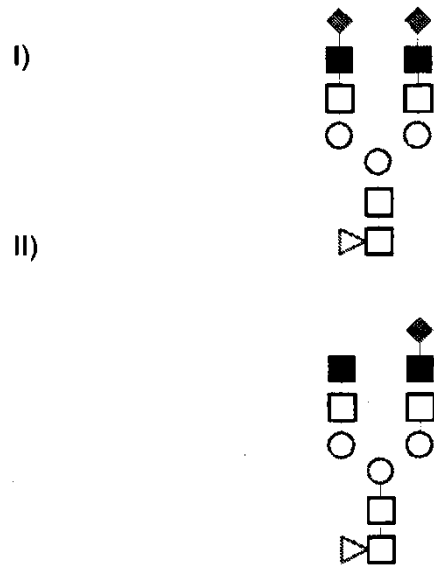


Fig. 5B Oligosacáridos secundarios

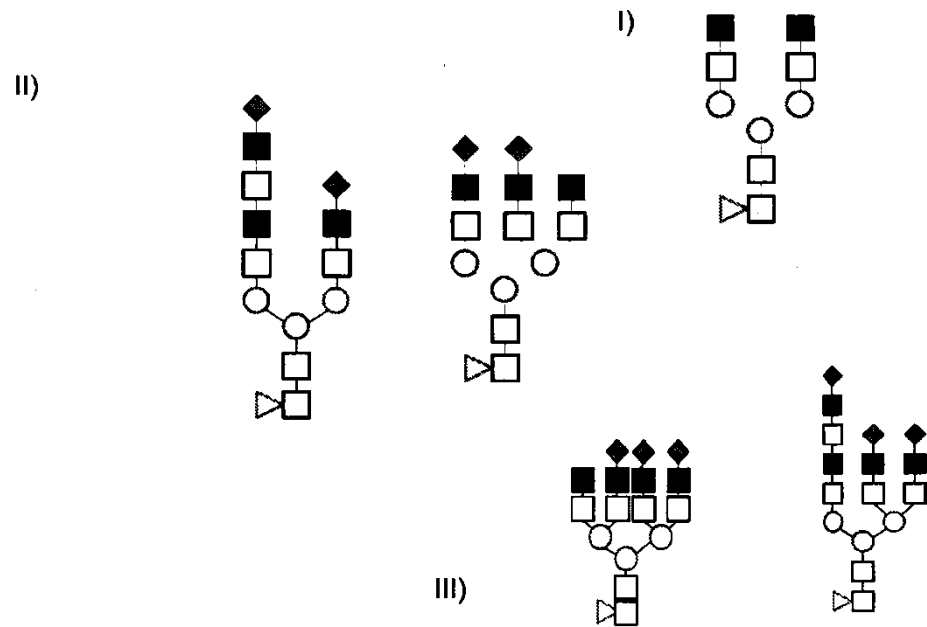
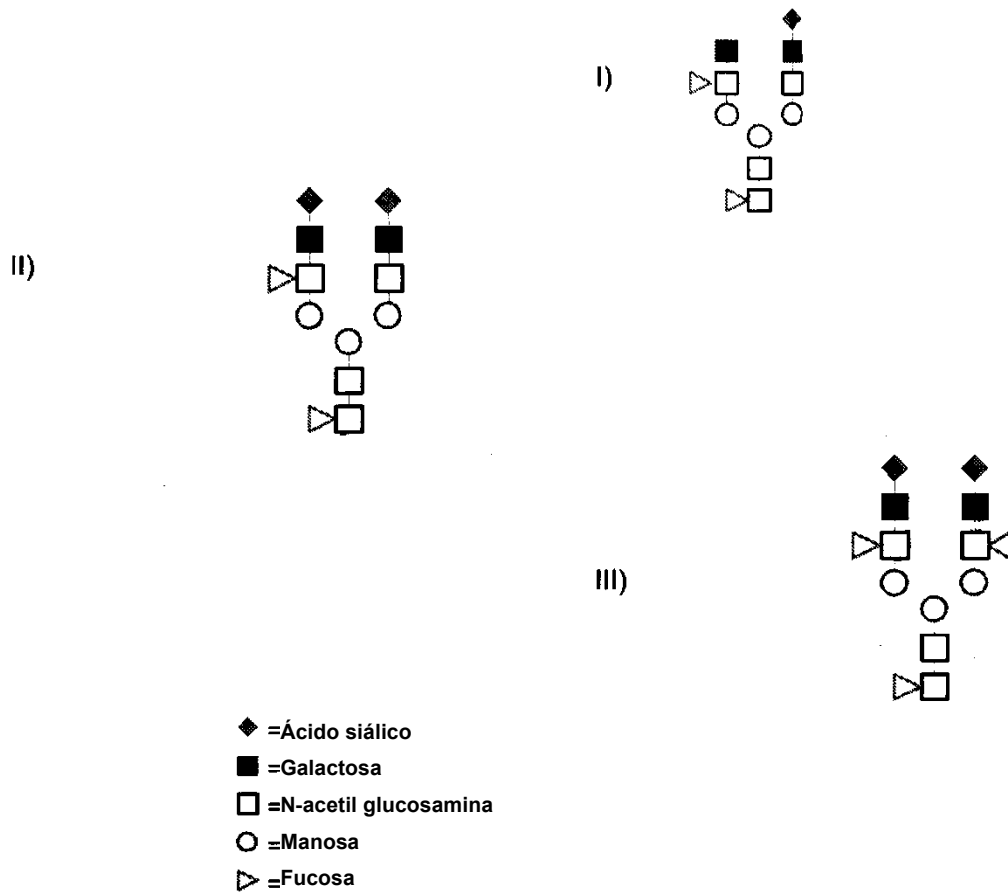


Fig. 5C Oligosacáridos secundarios con dos o tres fucosas :



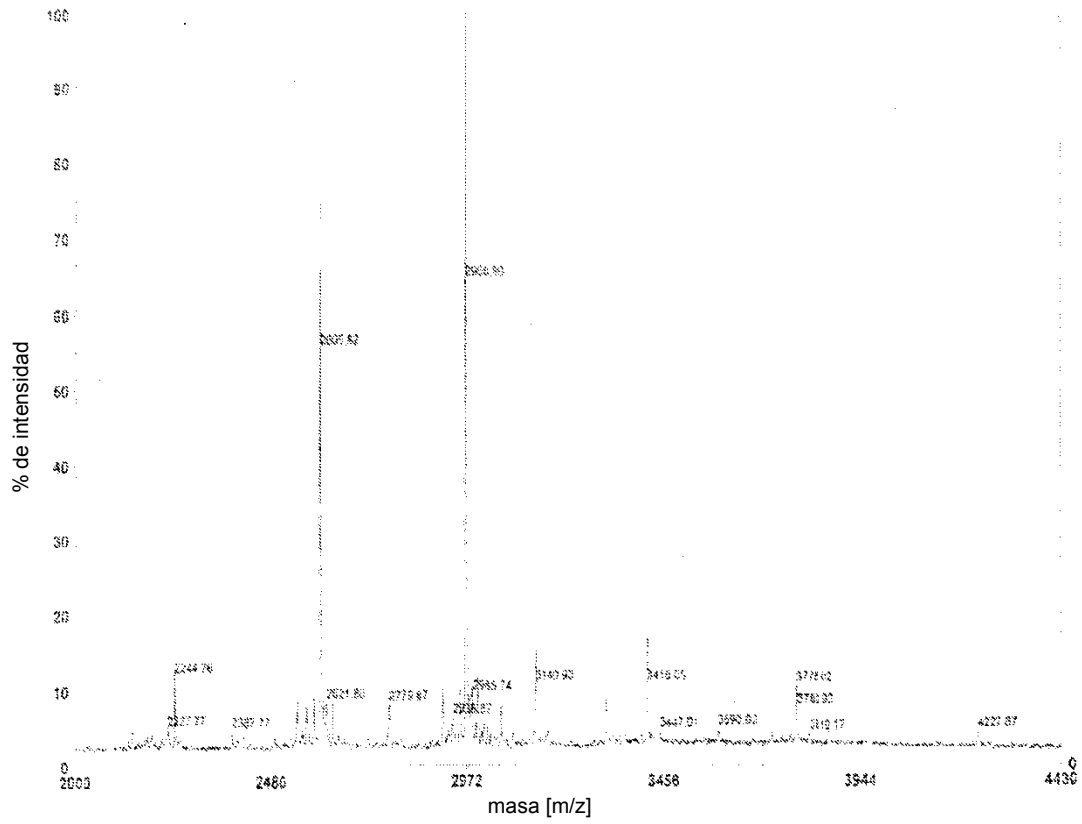


Fig. 6